

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Babesiose canina

Revisão da literatura científica e apresentação de casos clínicos

-Versão Final-

Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária

Daniela Filipa Nunes Barbosa

Orientador:

Professor Doutor Luís Cardoso



Vila Real, Julho de 2017

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Babesiose canina

Revisão da literatura científica e apresentação de casos clínicos

Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária

Versão final

Daniela Filipa Nunes Barbosa

Orientador:

Professor Doutor Luís Cardoso

Composição do Júri:

Vila Real, Julho de 2017

O conteúdo deste trabalho é da inteira responsabilidade do autor

AGRADECIMENTOS

“Era uma vez uma menina que sonhava ser veterinária. Sonhou, acreditou e alcançou”. Desde cedo prometi aos que me rodeavam um dia vir a tratar de cada um dos seus bichinhos. A persistência e determinação nortenha trouxeram-me até aqui.

Queria começar por agradecer ao Prof. Dr. Luis Cardoso por toda a sua disponibilidade e apoio prestados antes e durante a elaboração desta dissertação.

Agradeço a toda a equipa do Hospital Veterinário de Gaia e do Hospital Veterinário de Trás-os-Montes que sempre se mostraram disponíveis para me ensinar, crescer e preparar-me para o mundo do trabalho.

Agradeço ainda à família fantástica que me acolheu na chegada à UTAD, os Mariu Auberto (Rufino, Bia, Chico, Helga, Raquel e Tavares), que desde sempre me apoiaram quando precisei, fazendo destes últimos anos de curso o melhor que “bila” me podia dar. Agradeço também à linda e maravilhosa Pilão, à minha companheira de turismo Tuga e ao nosso pastor João pelas longas e memoráveis noites de estudo passadas no CC, e por todas as danças, “reggeatton”, risos e choros partilhados no Duplex. Voltaria para repetir cada uma delas. A todos vocês “levo-vos comigo para a vida”.

Um especial agradecimento à minha mãe por ser o meu muro das lamentações, mas sobretudo por ser a minha melhor amiga e a melhor confidente que eu poderia ter na vida. Ao meu pai por me dar todo o apoio e “mimo” do mundo, prometendo-lhe continuar a ser a sua menina, e ao meu irmão por, apesar de ser um chatinho, ser para sempre o meu mais pequenino. Ao resto da minha família, um enorme obrigado por nunca me deixarem desistir do que me faz feliz e me incentivarem sempre a perseguir os meus sonhos. Um obrigada também à minha princesinha de 4 patas que faz e fará sempre os meus dias muito melhores.

Por último, mas não menos importante, quero agradecer ao meu namorado, melhor amigo, companheiro de aventuras e confidente Luís por me aturar nos momentos complicados, me orientar nos momentos de indecisão, me dar na cabeça quando faço asneiras e me confortar sempre que preciso de um abraço apertado. Um obrigado do tamanho do mundo!

Agradeço também aos seus pais por me acolherem sempre tão bem e pelo grande apoio que me têm prestado.

NOTA INTRODUTÓRIA

O gosto pela Parasitologia começou há cerca de 3 anos aquando do exame da unidade curricular de Parasitologia I. Depressa surgiu o interesse pelos protozoários havendo sempre uma “estranha” inclinação para os hemoparasitas. O género *Babesia* foi, sem dúvida alguma, a minha preferida desde então.

O presente trabalho de revisão bibliográfica vem no seguimento de um período de estágio final do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, o qual teve começo no mês de setembro e término no mês de abril deste ano letivo (2016/2017).

A primeira parte do estágio foi realizada no Hospital Veterinário de Gaia (HVG), localizado nos Carvalhos, sob a orientação do Dr. Sérgio Alves, diretor clínico da instituição, durante um período de três meses (04/09/2016 a 30/11/2016).

No decorrer do tempo lá passado tive a possibilidade de acompanhar as mais variadas situações no contexto clínico. Desde casos clínicos na área das doenças parasitárias e infecciosas, passando um pouco por todas as áreas como a neurologia, dermatologia, endocrinologia, ortopedia e ainda áreas como a acupuntura que estão cada vez mais a expandir-se e a dar cartas no mundo da medicina veterinária.

A segunda e última parte deste estágio final foi cumprida no Hospital Veterinário de Trás-os-Montes e Alto Douro (HVTM), localizado em Vila Real, sob orientação do diretor clínico, Dr. Paulo Pimenta, durante um período de quase quatro meses (04/01/2017 a 28/04/2017).

Durante esta fase final do meu estágio pude contactar com uma realidade diferente da que tinha anteriormente experienciado em Gaia. Desde os diferentes métodos de trabalho e abordagem clínica, à maneira como temos que nos adaptar e aprender a lidar com um tipo de população “alvo” diferente.

Tal como na primeira parte do estágio, foi-me permitido presenciar casos clínicos das mais variadas áreas da medicina veterinária. Muitos deles passaram pela oftalmologia, neurologia, oncologia, sendo que a maior parte se concentrava na área das doenças infecciosas e parasitárias.

Foi no decorrer deste período passado no HVTM, que devido à elevada casuística na área das Doenças Parasitárias transmitidas por vetores, como é o caso da Babesiose canina, que decidi aprofundar o meu fascínio pelo estudo dos hemoparasitas e dedicar por isso, o tema da minha dissertação de mestrado a eles.

O HVG e o HVTM tratam-se de dois locais com dinâmicas bastante próprias, em que fatores externos como a população, as condições climáticas e geográficas, representam uma elevada importância, influenciando muito o tipo de trabalho realizado em cada um destes hospitais.

RESUMO

A babesiose canina, também denominada de piroplasmose, trata-se de uma hemoparasitose provocada por um protozoário que apresenta tropismo para as células sanguíneas, mais especificamente para os eritrócitos. A transmissão deste agente etiológico ao seu hospedeiro ocorre pela sua inoculação através de artrópodes, sendo, neste caso, os ixodídeos os principais responsáveis.

As espécies *Babesia canis* e *Babesia gibsoni* são responsáveis por provocar babesiose canina um pouco por todo o mundo, representado respetivamente formas intraeritrocitárias grandes (3-5 μm) e pequenas (0,5-2,5 μm). Anteriormente a primeira podia ser subdividida em 3 subespécies: *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli* e *Babesia canis rossi*, sendo agora consideradas espécies individualmente.

As espécies *B. canis* e *B. vogeli* são as mais frequentemente encontradas em Portugal e Europa em geral, e são transmitidas por vetores como o *Dermacentor reticulatus* e *Rhipicephalus sanguineus* respetivamente.

A doença pode manifestar-se sob quatro formas: subclínica, aguda, hiperaguda e crónica, uma vez que a gravidade dos sinais clínicos está intimamente relacionada com o estado do hospedeiro (incluindo idade e condição imunitária) e com a espécie de *Babesia* envolvida.

O tratamento da babesiose canina passa essencialmente pelo uso de anti-protozoários, mas acima de tudo, o mais importante baseia-se numa boa prevenção, através do uso de desparasitantes externos, administrados externamente ou *per os*.

A presente dissertação inclui uma descrição de alguns casos clínicos acompanhados durante o período de estágio decorrido no Hospital Veterinário de Trás-os-Montes, Vila real.

Palavras-chave: babesiose canina, *Babesia canis*, cão, tratamento, prevenção.

ABSTRACT

Canine babesiosis, sometimes referred to as piroplasmosis, is a hemoparasitosis caused by a protozoan that presents tropism to blood cells, more specifically to erythrocytes. The transmission of this etiological agent to its host occurs by its inoculation through vectors, being, in this case, the ixodídeos the main responsible ones.

The species *Babesia canis* and *Babesia gibsoni* are responsible for causing canine babesiosis around the world, represented respectively large (3-5 µm) and small (0.5-2.5 µm) intraerocyte forms. Previously the first could be subdivided in 3 subspecies: *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli* and *Babesia canis rossi*, being now considered species individually.

The species *Babesia canis* and *Babesia vogeli* are most frequently found in Portugal and Europe in general and are transmitted by vectors such as *Dermacentor reticulatus* and *Rhipicephalus sanguineus* respectively.

This disease can manifest itself in 4 forms: subclinical, acute, hyperacute and chronic, since the severity of the clinical signs is closely related to the state of the host (immune condition, age, etc.) and with the *Babesia* species involved.

The treatment of canine babesiosis is essentially through the use of anti-protozoa, but above all, the most important is based on good prevention through the use of external parasites.

This study refers and describe some case reports of dogs with clinical babesiosis that were observed during the practice period at the Hospital Veterinário de Trás-os-Montes.

Keywords: canine babesioses, *Babesia canis*, dog, treatment, prevention.

ÍNDICE GERAL

INTRODUÇÃO	1
1. Etiologia	4
1.1. Morfologia celular	7
2. Epidemiologia	8
2.1. Babesiose Humana	9
2.2. Babesiose Canina.....	10
2.2.1. Distribuição geográfica	11
3. Transmissão.....	14
3.1. Transmissão vetorial.....	14
3.1.1. Ciclo de vida	16
3.2. Transmissão não vetorial	18
4. Patogénese e Manifestações clínicas.....	18
4.1. Patogénese	18
4.2. Manifestações clínicas.....	21
4.2.1. Insuficiência Renal Aguda (IRA)	22
4.2.2. Babesiose Cerebral.....	23
4.2.3. Síndrome de stress agudo respiratório (SSAR)	23
4.2.4. Hepatopatia	24
4.2.5. Anemia Hemolítica Imunomediada (AHIM).....	24
4.2.6. Disfunção cardíaca.....	25
4.2.7. Pancreatite.....	26
4.2.8. Hemoconcentração (“red biliary syndrome”).....	27
4.2.9. Choque	27
5. Alterações hematológicas e Laboratoriais.....	28
6. Diagnóstico.....	29
6.1. Métodos de deteção microscópica	30
6.2. Métodos serológicos	31
6.2.1. IFAT.....	32
6.2.2. ELISA	32
6.3. Métodos moleculares	32
7. Tratamento	34
7.1. Fármacos anti-babesiais.....	34
7.2. Outras combinações farmacológicas	36

7.3. Tratamento de suporte	37
8. Prognóstico.....	38
9. Prevenção	39
CASOS CLÍNICOS.....	41
Caso clínico nº 1: Lord.....	41
Caso clínico nº2: Nilo.....	46
Caso clínico nº3: Jamaica.....	51
DISCUSSÃO.....	54
CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Possíveis apresentações morfológicas de <i>Babesia</i> spp. A- Presença de anéis pleomórficos de <i>Babesia</i> spp. ; B- Piroplasmas grandes de <i>Babesia canis</i> (“forma de pêra”); C- Piroplasmas pequenos de <i>Babesia microti</i> -like em forma de cruz de Malta	7
Figura 2: Representação esquemática de um protozoário do filo <i>Apicomplexa</i>	8
Figura 3: Mapa de distribuição de zonas endêmicas de babesioses canina (a vermelho) e zonas não endêmicas (a verde).....	11
Figura 4: Mapa de distribuição geográfica de espécies de <i>Babesia</i> capazes de provocar doença em cães na Europa.	12
Figura 5: Distribuição sazonal de babesioses canina na Europa Central entre 2000 e 2006.	13
Figura 6: Principais vetores de babesiose canina na europa. À esquerda uma vista dorsal de uma fêmea de <i>Dermacentor reticulatus</i> , e à direita uma vista dorsal de uma fêmea de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	15
Figura 7: Ciclo de vida de <i>Babesia</i> spp	17
Figura 8: Resposta imunitária em infeções por <i>Babesia</i> spp.	20
Figura 9: Animal com marcada icterícia evidente pela coloração das mucosas, característico de anemias hemolíticas.....	25
Figura 10: Eletrocardiograma (derivação II, 50 mm/s, 1cm/1mV) de uma fêmea com 4 anos de idade com bloqueio sinoatrial (A) e complexo prematuro ventricular (B)..	26
Figura 11: Trofozoítos de <i>B. gibsoni</i> (A), piroplasmas de <i>B. canis</i> (B) e formas extraeritrocitárias de <i>B. canis</i> (C).....	30
Figura 12: Algoritmo diagnóstico para a babesiose canina..	33
Figura 13: Esfregaço sanguíneo realizado no dia em que o Lord deu entrada no HVTM (01/01/2017).	43
Figura 14: Esfregaço sanguíneo realizado no dia em que o Lord deu entrada no HVTM (01/01/2017).	43
Figura 15: Urina colhida por cistocentese evidenciando uma marcada hematuria. Colheita realizada no dia em que o Lord deu entrada no HVTM (01/01/2017).	44
Figura 16: Teste rápido de deteção das 4 principais hemoparasitoses (negativo) realizado no dia em que o Lord deu entrada no HVTM (01/01/2017).	44

Figura 17: Esfregaço de buffy-coat. Colheita realizada no 2º dia de internamento do Lord no HVTM (02/01/2017). Observação de merozoítos de <i>Babesia</i> dentro dos eritrócitos.	45
Figura 18: Esfregaço de buffy-coat. Colheita realizada no 1º dia de internamento do Nilo no HVTM (18/03/2017).	48
Figura 19: Urina colhida na manha do 2º dia de internamento do Nilo evidenciando uma marcada hematúria (19/03/2017).	49
Figura 20: Esfregaço de buffy-coat. Colheita realizada no 2º dia de internamento do Nilo no HVTM (19/03/2017). Observação de merozoítos de <i>Babesia</i> intra e extraeritrocitários.....	50
Figura 21: Esfregaço de buffy-coat. Colheita realizada no 1º dia de internamento da Jamaica no HVTM (10/04/2017). Observação de merozoítos de <i>Babesia</i> intraeritrocitários.	52
Figura 22: Esfregaço de buffy-coat. Colheita realizada no dia de reavaliação da Jamaica no HVTM (28/04/2017).	53

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Espécies de <i>Babesia</i> que afetam animais domésticos, mamíferos selvagens e aves.	2
Tabela 2: Espécies de piroplasmas que afetam cães domésticos.	6
Tabela 3: Espécies de <i>Babesia</i> que podem infectar o Homem.	9
Tabela 4: Principais alterações laboratoriais provocadas pelas várias espécies de <i>Babesia</i> ...	29
Tabela 5: Principais linhas de tratamento para as várias espécies de <i>Babesia</i>	36
Tabela 6: Resultados do hemograma do Lord obtidos no dia de entrada no HVTM (01/01/2017). Os parâmetros alterados encontram-se assinalados a vermelho.....	42
Tabela 7: Resultados da bioquímica sérica do Lord no dia de entrada no HVTM (01/01/2017). Os parâmetros alterados encontram-se assinalados a vermelho.....	42
Tabela 8: Resultad das provas de coagulação do Lord no dia de entrada no HVTM (01/01/2017).....	42
Tabela 9: Resultados do hemograma do Nilo obtidos no dia de entrada no HVTM (18/03/2017). Os parâmetros alterados encontram-se assinalados a vermelho.....	47
Tabela 10: Resultados da bioquímica sérica do Nilo no dia de entrada no HVTM (18/03/2017). Os parâmetros alterados encontram-se assinalados a vermelho.....	47
Tabela 11: Resultados do hemograma da Jamaica obtidos no dia de entrada no HVTM (10/04/2017). Os parâmetros alterados encontram-se assinalados a vermelho.....	52
Tabela 12: Resultados da bioquímica sérica da Jamaica no dia de entrada no HVTM (10/04/2017). Os parâmetros alterados encontram-se assinalados a vermelho.....	52

ABREVIATURAS

AHIM	anemia hemolítica imunomediada
ALT	alanina-amino-transferase
AST	aspartato-amino-transferase
FA	fosfatase alcalina
BID	administração duas vezes por dia (<i>bis in die</i>)
BUN	ureia nitrogenada sérica
CPV	complexo prematuro ventricular
CID	coagulação intravascular disseminada
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético (“ethylenediamine tetraacetic acid”)
ELISA	ensaio imunoenzimático (“enzyme-linked immunosorbent assay”)
GGT	gama-glutamil-transferase
IFAT	teste de imunofluorescência indireta (“indirect fluorescent antibody test”)
IFN-γ	interferão gama
Ig	imunoglobulina
IM	via intramuscular
IRA	insuficiência renal aguda
IV	via intravenosa
MODS	síndrome de disfunção orgânica múltipla (“multiple organ dysfunction syndrome”)
NK	células “natural killer”
NO	óxido nítrico (“nitric oxide”)
PO	via oral (<i>per os</i>)
PPT	proteínas plasmáticas totais
PCR	reação em cadeia da polimerase (“polymerase chain reaction”)
PCR-RFLP	polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (“Restriction Fragment Length Polymorphism”)
RLB	hibridação reversa em membrana (“reverse line blot”)
SC	via subcutânea
SID	administração uma vez por dia (<i>semel in die</i>)
SNC	sistema nervoso central

SPA	antigénios solúveis de parasitas (“soluble parasite antigens”)
SRIS	síndrome de resposta inflamatória sistémica
SSAR	síndrome de stress agudo respiratório
TID	administração três vezes por dia (<i>ter in die</i>)
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa (“tumor necrosis factor alfa”)
VIH	vírus da imunodeficiência humana



INTRODUÇÃO

O género *Babesia* compreende protozoários hemoparasitas transmitido por um vetor invertebrado, a carraça, que apresenta um grande impacto económico, veterinário e de saúde pública em todo o mundo. Este é considerado o segundo parasita sanguíneo mais frequente nos mamíferos a seguir aos tripanossomas, tendo também sido descritos em aves infetadas (Telford, 1993).

A primeira epidemia relatada de babesiose remonta ainda a tempos bíblicos, sendo descrita no Livro do Êxodo como uma “praga divina” que se apoderou de todo o gado do Faraó Ramsés II (Boustani e Gelfand, 1996).

Foi no fim do século XIX, decorria o ano de 1888, que o bacteriologista Victor Babeş, relatou a presença de microrganismos intraeritrocitários, que pensava inicialmente tratarem-se de bactérias. Estes teriam sido responsáveis pela morte de 30 000 a 50 000 cabeças de gado bovino na Roménia, na altura com a conhecida hemoglobinúria bovina, também denominada de “red water fever”, tendo descoberto mais tarde os mesmos microrganismos nos eritrócitos de gado ovino (Babes, 1888).

Cinco anos mais tarde nos Estados Unidos, em 1893, Smith e Kilbour estabeleceram o *Pyrossoma* como o agente causador da febre de gado do Texas (“Texas cattle fever”), doença esta que há muito atingia o gados dos estados mais a sul dos Estados Unidos. Esta foi uma descoberta com significado histórico uma vez que, foi a primeira descrição de uma transmissão de um protozoário ao seu hospedeiro vertebrado através de um vetor artrópode (Smith e Kilbourne, 1893).

No mesmo ano (1893), Starcovici deu a estes parasitas os nomes de *Babesia bovis*, *Babesia ovis* e *Babesia bigemina* respetivamente (Starcovici, 1893; Mihalca, 2010). Desde então outras designações foram sendo propostas, sendo que “piroplasma” foi a mais conhecida. O nome “piroplasma” advém da forma característica deste protozoário, e tem sido utilizado ainda hoje para designar o grupo das babesioses e theilerioses como “piroplasmoses” (Uilenberg, 2006).

Pouco tempo depois, novas descobertas de parasitas intraeritrocitários foram feitas em animais domésticos como cães (*B. canis*) e cavalos (*B. caballi*) por Piana e Galli-Valerio em



1895 e por Koch em 1904, respetivamente. Depois destas, muitas mais espécies diferentes de *Babesia* foram descobertas graças aos avanços das técnicas de biologia celular e molecular e microscopia (Uilenberg, 2006; Schnittger et al., 2012).

Tabela 1: Espécies de *Babesia* que afetam animais domésticos, mamíferos selvagens e aves. Adaptado de (Schnittger et al., 2012)

Animais domésticos	Espécie	Mamíferos selvagens e aves	Espécie
Cão	<i>B. canis</i> <i>B. vogeli</i> <i>B. rossi</i> <i>B. gibsoni</i> <i>B. conradae</i> <i>T. annae</i> <i>B. vitalli</i> <i>Babesia sp.</i>	Leão e leopardo (<i>Panthera leo</i> , <i>P. pardus</i>)	<i>B. leo</i>
Gato	<i>B. felis</i> <i>B. (canis) presentii</i>	Chita (<i>Acinonyx jubatus</i>)	<i>B. lengau</i>
Equinos/ asininos	<i>T. equi</i> <i>B. caballii</i>	Veado, veado-de-cauda-branca, rena (<i>Cervus elaphus</i> , <i>Odocoileus virginianus</i> , <i>Rangifer Tarandus</i>)	<i>B. odocoilei</i>
		Morcego (<i>Pipistrellus sp.</i>)	<i>B. vesperuginis</i>
Suínos	<i>B. trautmanni</i>	Gaivota (<i>Larus cachinnans</i>)	<i>B. bennetti</i>
Ovinos/ caprinos	<i>B. crassa</i> <i>B. ovis</i> <i>B. motasi</i>	Corço (<i>Capreolus capreolus</i>)	<i>B. capreoli</i>
Bovinos	<i>B. bovis</i> <i>B. bigémina</i> <i>B. major</i> <i>B. occultans</i> <i>B. ovata</i> <i>B. divergens</i> <i>B. sp. Kashi</i>	Rinoceronte preto (<i>Diceros bicornis</i>)	<i>B. bicornis</i>



A nível taxonómico, o género *Babesia* pertence ao reino Protista, filo *Apicomplexa* (também denominado *Sporozoa*), classe *Piroplasma* (*Aconoidasida*), ordem *Piroplasmida* e família *Babesiidae* e subsequentemente ao género *Babesia* (Levine 1971, 1988).

Geralmente, infeções provocadas por *Babesia* apresentam vários graus de severidade estando muitas vezes associada à idade do hospedeiro, infeções simultâneas com outros agentes patogénicos, fatores genéticos e estado imunológico do hospedeiro, dependendo também da espécie nela envolvida. Serve de exemplo as infeções por *B. rossi* que são altamente virulentas, provocando quadros clínicos de anemia hemolítica imunomediada, sintomatologia neurológica e insuficiência renal aguda (IRA), enquanto que infeções por *B. vogeli* normalmente são subclínicas em animais adultos (Irwin, 2009).

O tratamento desta hemoparasitose passa, na maioria dos casos, pela administração de duas doses de dipropionato de imidocarb intervaladas por 15 dias, existindo outros protocolos cuja aplicação varia com cada caso. Tratamento de suporte como fluidoterapia e transfusão sanguínea é necessário nos casos mais complicados.

A melhor maneira de travar as infeções por *Babesia* é sem dúvida a prevenção. Esta passa sobretudo por combater o vetor através da aplicação de desparasitantes tópicos como spot-on (soluções para unção puntiforme) e coleiras, desparasitantes orais com efeito sistémico ou ainda administração de vacinas, existindo, de momento, duas disponíveis no mercado português.



1. Etiologia

Taxonomicamente, o género *Babesia* encontra-se no filo *Apicomplexa*, podendo também ser denominado de *Sporozoa*, na classe *Aconoidasida (Piroplasmae)* e na ordem *Piroplasmida* (Levine, 1971).

Duas das famílias que se incluem na ordem *Piroplasmida* são a *Babesiidae* e *Theileriidae*. É particularmente a forma de transmissão e a existência ou ausência de esquizontes que serve de distinção entre a *Babesia sensu strictu* (s.s) e a *Theileria* (Uilenberg, 2006). A *Babesia s.s.* tem sido definida pela ausência de esquizontes e por apresentar uma transmissão transovárica, enquanto que a existência de esquizontes (ausência de um ciclo pré-eritrocitário) e uma transmissão transtádial é característica de protozoários do género *Theileria* (Mehlhorn, 1994; Kakoma e Mehlhorn 1994).

Os protozoários do género *Babesia* e *Theileira* são normalmente denominados de piroplasmídeos ou piroplasmas devido à sua morfologia característica em forma de pêra aquando da sua multiplicação no sangue do hospedeiro vertebrado. Sendo estes hemoparasitas que não formam pigmento, uma vez que “digerem” melhor a hemoglobina não deixando resíduos, podem facilmente ser distinguidos de outros parasitas intraeritrocitários como o *Plasmodium* e o *Haemoproteus*, que em contrapartida formam pigmento nas células parasitadas (hemozoína) (Uilenberg, 2006).

Antes do uso de métodos moleculares, e até há relativamente pouco tempo, as espécies de *Babesia* era identificadas com base em parâmetros morfológicos das formas intra-eritrocitárias (trofozoítos) visíveis ao microscópio nas lâminas de sangue. Este tipo de análise juntamente com a especificidade do hospedeiro permitiu classificar cerca de 111 espécies de *Babesia* e 39 espécies de *Theileria* válidas (Levine, 1988; Reichard, 2005). No entanto, suspeita-se que muitas dessas descrições possam ser de espécies idênticas ou semelhantes, que os métodos de diagnóstico tradicionais não consigam distinguir. Estes foram sendo gradualmente substituídos por métodos mais recentes e precisos (moleculares), tendo-se verificado bastante úteis na diferenciação entre protozoários semelhantes, confirmando assim essas distinções baseadas em características subjetivas (Persing, 1995).



Foram vários os motivos para recorrer ao uso de métodos moleculares para classificar protozoários do género *Babesia* em vez de continuar com os métodos tradicionais baseados em parâmetros morfológicos e especificidade de hospedeiro:

- No mesmo hospedeiro, diferentes parasitas podem apresentar-se morfológicamente semelhantes (Ex: algumas espécies de *Babesia* e *Plasmodium*);
- O mesmo parasita pode ter diferentes apresentações microscópicas em diferentes hospedeiros, devido a fatores específicos deste como a condição imunológica e a função esplénica (Ex: *B. divergens* apresenta o seu especto característico quando infecta eritrócitos de bovinos, mas quando infecta eritrócitos de humanos apresenta um extenso pleomorfismo, dificultando o diagnóstico);
- A classificação de espécies de *Babesia* com base na especificidade do hospedeiro deixou de ser tão usada, uma vez que algumas espécies (Ex: *B. microti*) apresentam uma ampla gama de hospedeiros (Brandt, 1977).

As espécies de *Babesia* são normalmente agrupadas em dois grandes grupos: as pequenas cujo diâmetro varia entre 1 a 2.5 μm e inclui espécies como *B. gibsoni* e *B. microti*, e as grandes com um diâmetro a variar entre 2.5 e 5 μm que incluem *B. canis* e *B. bovis*, entre outras. Estas classificações morfológicas são consistentes com a caracterização filogenética baseada no estudo do gene 18s rRNA, que mostra que as espécies “pequenas” estão mais relacionadas com a *Theileria* spp. do que as “grandes”, com a exceção da *B. divergens* que parece morfológicamente pequena nos esfregaços sanguíneos mas esta geneticamente relacionada com as formas grandes (Persing e Conrad, 1995).

A primeira sugestão de que todos os isolados de *B. canis* não correspondiam à mesma espécie, foi dada pelo alemão Eduard Reichenow que verificou diferenças na patogenicidade de isolados de *B. canis* de França e do Norte de África (Reichenow, 1935).

Com o surgimento dos métodos moleculares a *Babesia canis* foi reclassificada em três subespécies, sendo estas *B. canis canis*, *B. canis vogeli* e *B. canis rossi*, tendo esta “divisão” sido baseada em testes serológicos, especificidade do hospedeiro, imunidade cruzada e filogenia molecular (Irwin, 2009). Atualmente, estes parasitas são consideradas espécies propriamente ditas e separadas como indica a tabela 2. No que diz respeito às formas



pequenas destes piroplasmas, três espécies clinicamente e geneticamente distintas são conhecidas por provocar doença em cães, sendo estas *B. gibsoni*, *B. conradae* e *B. microti-like* também denominada de *Theileria annae* ou *Babesia vulpes* (Rinder et al., 2000; Camacho et al., 2001; Baneth et al., 2015).

Tabela 2: Espécies de piroplasmas que afetam cães domésticos. Adaptado de (Irwin, 2009).

Tamanho	Espécies	Sinónimos	Vetor
Grande	<i>Babesia vogeli</i>	<i>Babesia canis vogeli</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>
	<i>Babesia canis</i>	<i>Babesia canis canis</i>	<i>Dermacentor spp.</i>
	<i>Babesia rossi</i>	<i>Babesia canis rossi</i>	<i>Haemophysalis elliptica</i>
Pequeno	<i>Babesia gibsoni</i>	<i>Babesia gibsoni</i> (estirpe asiática)	<i>Haemophysalis longicornis</i>
	<i>Theileria annae</i>	<i>Babesia microti-like</i> (isolado espanhol)	<i>Ixodes hexagonus</i>



1.1.Morfologia celular

Dois grandes grupos são facilmente distinguíveis dentro do gênero *Babesia*: as formas piriformes pequenas (1-2,5 μm) e as grandes (2,5-5 μm). Este parasita é geralmente reconhecido pela sua forma de pêra ou piriforme, muitas vezes dispostos em pares ou em quadras formando cruzes, podendo também apresentar-se com formas circulares (“rings”), ovais, mais alongadas ou ameboides dentro dos eritrócitos (Kreir, 2012).

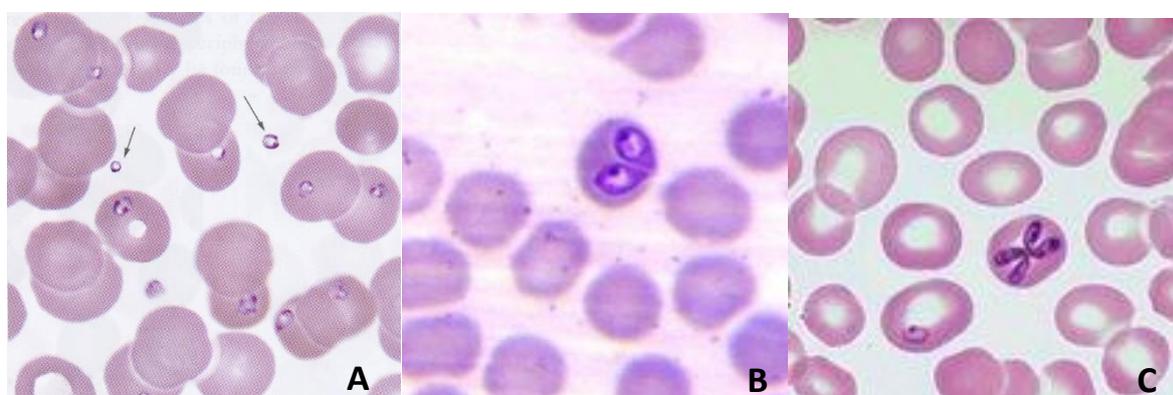


Figura 1: Possíveis apresentações morfológicas de *Babesia* spp. A- Presença de anéis pleomórficos de *Babesia* spp. ; B- Piroplasmas grandes de *Babesia canis* (“forma de pêra”); C- Piroplasmas pequenos de *Babesia microti*-like em forma de cruz de Malta. Disponível em: <https://clinicalgate.com/microorganisms>

O corpo piriforme é rodeado por uma película composta por três camadas distintas: uma fina membrana externa, uma membrana interna espessa, provavelmente composta de três camadas e interrompida por poros e uma camada de microtúbulos (Buttner, 1968; Scholtyseck e Friedhoff, 1970). A membrana interna termina na extremidade romba do parasita num anel polar juntamente com um número de organelos formando o complexo polar ou apical.

Os organelos presentes são de dois tipos: os maiores com forma de lágrima chamados roptrias, e numerosas vesículas elípticas chamadas micronemas. Logo após a entrada no eritrócito, o corpo piriforme perde a sua membrana interna, a camada de microtúbulos e o complexo polar. Este fenómeno deu origem à crença de que estas estruturas estão relacionadas com a locomoção e penetração celular.



A hemoglobina pode ser observada em vacúolos no citoplasma do parasita e é completamente digerida não deixando vestígio de pigmento residual. Estes protozoários possuem mitocôndrias semelhantes aos das células dos mamíferos e um núcleo como é possível verificar na Figura 2 (Simpson, 1967; Frerichs e Holbrook, 1974).

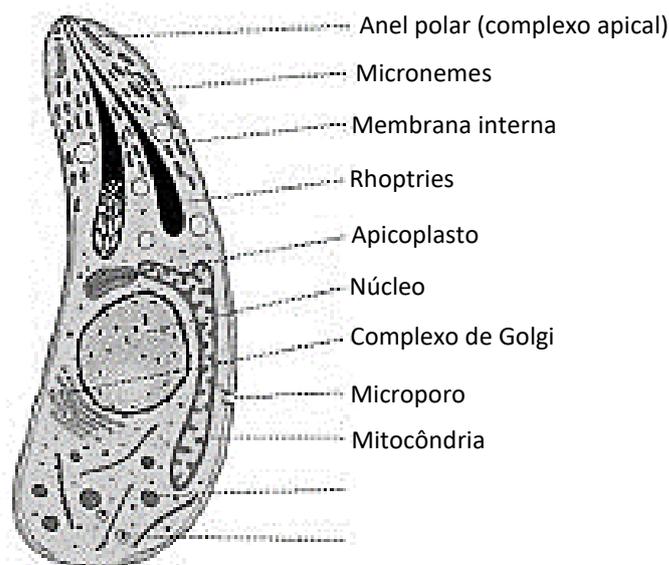


Figura 2: Representação esquemática de um protozoário do filo Apicomplexa. Adaptado de Jan Sapleta, 2011.

2. Epidemiologia

A babesiose é uma doença transmitida por vetores artrópodes, as carrças, com *B. canis* sendo transmitida por *Dermacentor reticulatus*, *B. vogeli* e *B. gibsoni* por *Rhipicephalus sanguineus*, e *B. rossi* por *Haemaphysalis elliptica*. Em estudos experimentais, foi demonstrado que *Hyalomma marginatum* e *Dermacentor andersoni* são capazes de transmitir *B. canis*. *Babesia canis* pode infetar cães de todas as idades podendo também infetar outros canídeos, como por exemplo chacais (*canis adustus*) e lobos (*canis lupus*). Foi relatada uma variação sazonal no número de casos, com maior incidência nos meses de verão (setembro a abril) e pico em novembro (Leschnik et al., 2008). Esta variação sazonal também tem sido descrita na América do Norte, com a maioria dos casos de babesiose ocorrendo entre março e outubro. Segundo relatos, a seroprevalência de *B. canis* em galgos do sudeste dos Estados Unidos é maior do que a da população geral de animais de estimação. Na Califórnia, até 13%



dos cães em abrigos de animais são seropositivos para *B. canis* e 3% positivos para *B. gibsoni* (Yamane et al., 1994).

2.1. Babesiose Humana

A primeira evidência de que os humanos podiam ser infetados por protozoários de *Babesia* spp. foi relatada por Wilson e Chowning em 1908 (Wilson e Chowning, 1979), que observaram e descreveram inclusões piriformes intra-eritrocitárias, como as que tinham sido anteriormente descritas por Smith e Kilbourne, em amostras de sangue de pacientes com a chamada febre das Montanhas Rochosas. Estes chamaram-lhe de *Pyroplasma hominis*.

O primeiro caso certo de babesioses em humanos, foi documentado num agricultor Jugoslavo, submetido a uma esplenectomia, em 1957, cujo agente implicado foi *B. divergens* (Skrabalo e Deanovic, 1957). Em 1969 foi detetado um caso de babesiose humana num paciente com o baço intacto em Nantucket Island, Massachusetts (Western et al., 1970).

Até há relativamente pouco tempo, verificou-se a existência de sete espécies distintas de *Babesia* capaz de provocar doença em humanos (ver Tabela 3) (Gorenflot, 1998; M. J. Homer et al., 2000; Hildebrandt et al., 2008).

Tabela 3: Espécies de *Babesia* que podem infetar o Homem. Adaptado de (Schnittger et al., 2012)

Espécie	Distribuição geográfica
<i>B. microti</i>	EUA, Japão, Alemanha, Taiwan
<i>B. venatorum</i>	Áustria, Itália, Alemanha, Bélgica
<i>B. divergens</i>	China, Europa
<i>B. duncani</i>	EUA
<i>B. sp.</i> CA1, CA3, CA4	EUA
<i>B. divergens-like</i>	EUA (MO1)
<i>B. sp. (ovina)</i>	Coreia do Sul

A maioria dos pacientes infetados partilhavam o facto de serem esplenectomizados, o que constitui um grande fator de risco, assim como a idade avançada e estados imunodeprimidos. O aumento do número de indivíduos com vírus da imunodeficiência humana (VIH)



conjuntamente com outros imunocomprometidos pode servir para aumentar o número de casos de babesioses em humanos (Kjemtrup e Conrad, 2000; Häselbarth et al., 2007; Karp e Auwaerter, 2007).

Os seres humanos, assim como os restantes mamíferos adquirem a doença através da picada de ixodídeos, podendo também haver transmissão por transfusão sanguínea (Homer et al., 2000). Existe também a possibilidade, embora rara, de ocorrer transmissão transplacentária, sendo que até à data apenas dois casos foram documentados, e numa situação em que haja infeção maternal, se for aplicado tratamento evita-se que haja infeção do feto (Raucher, 1984).

Os picos de transmissão ocorrem entre os meses de maio e setembro e o período de incubação pode variar de 5 a 33 dias após a picada da carraça (Homer et al., 2000; Häselbarth et al., 2007).

2.2. Babesiose Canina

Tradicionalmente, a morfologia deste protozoário (merozoítos) dentro dos eritrócitos foi utilizada como o principal determinante taxonómico. Esta avaliação, feita através de observação microscópica de um esfregaço sanguíneo, pode ser usada para classificar estes piroplasmas como grandes (*Babesia canis*), ou pequenas formas (*Babesia gibsoni*). Mais tarde, técnicas moleculares permitiram a identificação de várias espécies de *Babesia* que podem infetar cães (Solano-Gallego et al., 2016).

As formas grandes de *Babesia* spp., anteriormente considerada apenas como *B. canis*, atualmente inclui *B. canis*, *Babesia rossi* e *Babesia vogeli* como espécies distintas. A sua morfologia idêntica levou inicialmente a que *B. rossi* e *B. vogeli* fossem considerados subespécies de *B. canis*, embora diferenças significativas na sua apresentação clínica, distribuição geográfica, testes serológicos (IFAT e ELISA) e especificidade vetorial agora nos levem a considerar o contrário (Zahler, 1998; Carret et al., 1999; Cacciò et al., 2002; Irwin, 2009; Solano-Gallego e Baneth, 2011).

Até agora, apenas três espécies de formas pequenas de *Babesia* com importância clínica foram descritas: *B. gibsoni*, *Babesia conradae* e a recente "*Babesia vulpes*" (Baneth et al., 2015) sugerida para a anteriormente conhecida *Babesia* "Spanish Dog Isolate", *Babesia*



"microti-like", "*Babesia (Theileria) annae*" e *Babesia cf. Microti*, com base nos seus hospedeiros naturais e numa aparente falta de qualquer fase pré-eritrocitária de infeção nos linfócitos. No entanto, nenhum tipo foi fixado para ambos, "*Theileria annae*" e "*Babesia vulpes*", portanto, estas denominações devem ser consideradas *nomina nuda* e portanto, indisponíveis (Zahler et al., 2000b; Camacho et al., 2001).

2.2.1. Distribuição geográfica

Ao avaliar a distribuição geográfica desta doença, Irwin considerou útil classificar a prevalência e a incidência regional em dois níveis distintos: (i) regiões onde o parasita específico está bem estabelecido, as chamadas zonas endémicas (Figura 3), e clinicamente reconhecido e (ii) regiões onde infeções autóctones esporádicas ou casos associados a cães itinerantes foram relatados (Irwin, 2009).



Figura 3: Mapa de distribuição de zonas endémicas de babesioses canina (a vermelho) e zonas não endémicas (a verde). Disponível em: www.cvbd.org



A distribuição geográfica de infeções por *Babesia* spp. é altamente variável e na sua maioria dependente da distribuição do vetor competente. Para além disso, a prevalência de babesiose varia devido às várias técnicas de diagnóstico utilizadas para deteção, varia consoante o país e/ou população a ser analisada e as espécies de *Babesia* a serem estudadas (Solano-Gallego e Baneth, 2011b). Relativamente às formas grandes de *Babesia* spp., mais especificamente *B. canis*, esta tem sido diagnosticada em vários países do norte, centro e sul da Europa, bem como *B. vogeli* (Davitkov et al., 2015). *B. rossi*, originalmente descrita na África do Sul, foi mais tarde descoberta noutros países africanos como a Nigéria e o Sudão. Quanto às formas pequenas, isolados de *B. microti*-like sp. tem sido detetados em cães na Croácia (Beck et al., 2009), Sérvia (Gabrielli et al., 2015), Suécia (Falkenö, 2013), França (René-Martellet et al., 2015) e especialmente na Península Ibérica, mais especificamente a norte de Portugal e Galiza, em Espanha (Camacho et al., 2001; Garcia, 2006; Simões et al., 2011; Miró et al., 2015). Outras espécies como *B. conradae* e *B. gibsoni* são frequentemente encontradas nos Estados Unidos e Ásia respetivamente, sendo que no caso da *B. gibsoni* tem sido encontrada em cães da raça Pit Bull em países não asiáticos (Zahler et al., 1998; Uilenberg, 2006).

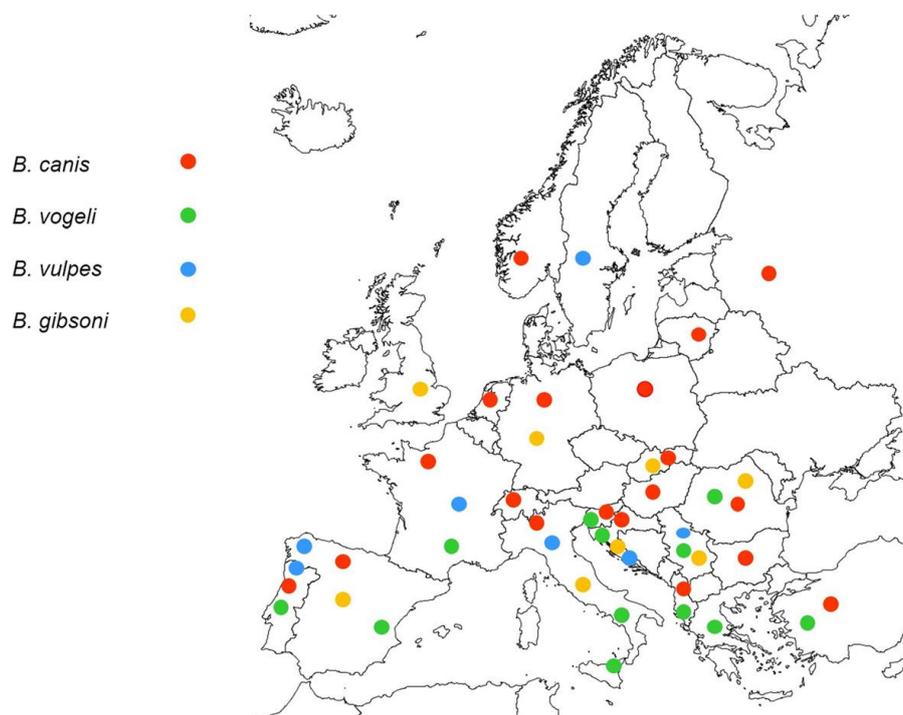


Figura 4: Mapa de distribuição geográfica de espécies de *Babesia* capazes de provocar doença em cães na Europa. Fonte: (Solano-Gallego e Baneth, 2011b).



No entanto, o mapa de distribuição geográfica destas formas pequenas ainda não é tao detalhado uma vez que as descrições são baseadas em casos clínicos isolados.

O aquecimento global e seu efeito sobre as condições climáticas locais é uma das causas presumíveis de mudanças na distribuição temporal e espacial de doenças transmitidas por vetores (Leschnik, 2008). A extensão da distribuição geográfica dos vetores e a crescente incidência de doenças transmitidas por vetores estão intimamente relacionadas com uma mudança global no clima e na composição atmosférica (Randolph, 2004), bem como nas mudanças na ocupação terrestre humana, na globalização do comércio e transporte, na disseminação de espécies exóticas de plantas e animais, saúde humana e tecnologia (Sutherst, 2001).

As doenças transmitidas por vetores e o risco que representam para os animais domésticos tem ganho uma crescente atenção pública nos últimos anos. A extensão de novas áreas endêmicas, bem como a maior sensibilidade dos meios de diagnóstico e a consciencialização dos proprietários e veterinários contribuiu muito para estes desenvolvimentos.

Um estudo levado a cabo por Leschnik em 2000 durante um período de 6 anos na Europa Central demonstrou que a ocorrência bianual de babesiose canina (ver figura 5), que deve ser correlacionada com a atividade da forma adulta do *D. reticulatus*, está relacionada com as alterações climáticas locais sazonais específicas. Este estudo demonstra o efeito da temperatura média do ar e do solo, humidade relativa e precipitação na ocorrência de babesioses canina durante um período de 7 anos. Segundo o mesmo estudo, outros fatores como o comprimento do dia e a temperatura do solo pela manha, influenciam a atividade sazonal do *D. reticulatus* (Leschnik et al., 2008).

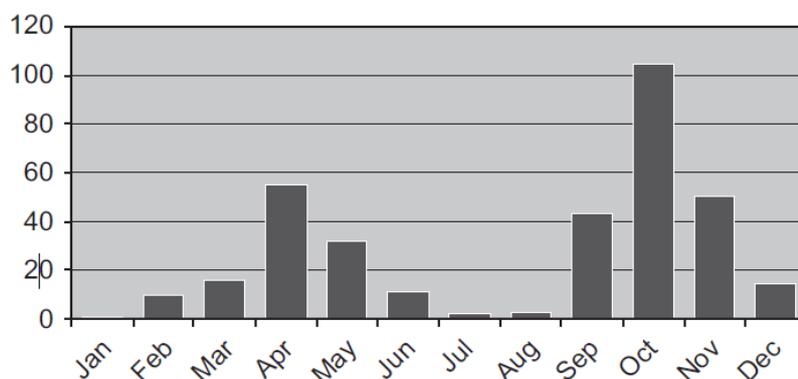


Figura 5: Distribuição sazonal de babesioses canina na Europa Central entre 2000 e 2006. Fonte: (Leschnik et al., 2008)



3. Transmissão

3.1. Transmissão vetorial

Os vetores responsáveis pela transmissão da babesiose canina são os ixodídeos, pertencentes à família *Ixodidae*, que infetam os cães através da inoculação esporozoítos presentes na sua glândula salivar.

Para ser considerado um vetor ideal é necessário que este apresente uma elevada taxa reprodutiva, boa capacidade de sobrevivência, capacidade de se adaptar a diferentes habitats e ainda uma apresentar uma grande gama de hospedeiros e de agentes patogénicos que pode transmitir.

No caso da *B. canis*, o principal vetor é o *Dermacentor reticulatus*. A elevada adaptabilidade desta espécie é comprovada pela grande área em que esta espécie se estabeleceu, nomeadamente em muitos dos países da Europa, preferindo climas frios e húmidos (Petney et al., 2015). As formas adultas parasitam normalmente em cães enquanto que as formas jovens imaturas alimentam-se em roedores selvagens (Rubel et al., 2014). Os adultos tornam-se mais ativos durante os meses de inverno, com picos em Setembro/Outubro e Abril, caso a estação não seja muito agressiva, sendo menos abundantes durante a estação quente (Földvári e Farkas, 2005; Duscher et al., 2013). A sua ativação relativamente adiantada, após o período de hibernação no inverno, está associada à sua capacidade de suportar baixas temperaturas, resultando numa vantagem evolutiva relativamente a outros ixodídeos (Sonenshine, 1991). Embora alguns autores se refiram a estes vetores como tendo habitats restritos, verificou-se que estes possuem em leque muito diversificado de locais que podem habitar tais como prados, florestas de carvalhos, clareiras, bacias hidrográficas, terrenos pantanosos, margens de rios, áreas suburbanas e zonas costeiras (Jongejan et al., 2015; Mierzejewska, 2015).

Relativamente a *B. vogeli*, esta é principalmente transmitida por *Rhipicephalus sanguineus*, que é muito abundante em áreas mediterrânicas, bem adaptado a climas temperados, podendo também tolerar regiões mais frias da Europa central (Hansford et al., 2014). A sua habilidade para sobreviver em ambientes fechados vem complicar a determinação das suas áreas na natureza (Dantas-Torres, 2010).



No caso da *B. rossi*, esta apenas se encontra até ao momento restrita no continente africano e é transmitida por *Haemophysalis elliptica* também denominada de *H. leachi* (Solano-Gallego e Baneth, 2011b).



Figura 6: Principais vetores de babesiose canina na europa. À esquerda uma vista dorsal de uma fêmea de *Dermacentor reticulatus*, e à direita uma vista dorsal de uma fêmea de *Ripicephalus sanguineus*. (fonte: Online Photographic Guide to Ticks, Bristol University tick ID).

Os ixodídeos da espécie *Ripicephalus sanguineus* são potenciais vetores de *B. gibsoni* em território europeu enquanto que, em território asiático, o vetor responsável pela sua transmissão é *Haemophysalis longicornis* (Hatta et al., 2013; Iwakami et al., 2014).

O ciclo de vida de *B. microti*-like é ainda um pouco desconhecido, mas a espécie *Ixodes hexagonus* sido implicada como o seu potencial vetor (Camacho et al., 2003; Miró et al., 2015). Este vetor parasita principalmente carnívoros selvagens como raposas. Esta espécie juntamente com uma espécie relacionada, o *I. canisuga*, está presente em todas as áreas onde estes animais são abundantes, incluindo onde *B. microti*-like ainda está um pouco por descrever, o que deixa alguma ambiguidade em relação à sua transmissão (Harris e Thompson, 2009; Najm et al., 2014).



3.1.1. Ciclo de vida

Os parasitas do Filo *Apicomplexa* passam geralmente por 3 fases de reprodução: gametogonia, esporogonia e merogonia ou esquizogonia (Kakoma, 1993). Este ciclo de vida pode ser dividido em duas partes distintas: os fenômenos que ocorrem no vetor e os fenômenos que ocorrem no hospedeiro vertebrado.

- **No vetor:** os parasitas são primeiramente detetados no vetor cerca de 10 horas depois que este começa a sua refeição no hospedeiro infetado. Passadas 46 a 60 horas, alguns destes organismos (gametócitos) começam a desenvolver-se e surgem novos organelos. O desenvolvimento mais notável é o de uma estrutura em forma de seta, na extremidade anterior do parasita, chamada de corpo ciliar (Koch, 1906). Estas estruturas estarão provavelmente envolvidas na fusão dos gâmetas (Rudzinska, 1983). Passadas aproximadamente 80 horas de o vetor se começar a alimentar, o zigoto resultante desta fusão utiliza essa estrutura para penetrar nas células epiteliais do intestino da carraça, deslocando-se para a glândula salivar através da hemolinfa (Rudzinska, 1983). Depois de estes zigotos entrarem na hemolinfa, estes podem invadir outros tipos de células, como por exemplo os ovários, podendo assim ser transmitidos transovaricamente.

O desenvolvimento de esporozoítos dentro da glândula salivar pode ser dividido em 3 fases. Primeiro o parasita expande a célula hospedeira hipertrofiada, formando um esporoblasto multinucleado da qual os esporozoítos vão sair (Karakashian et al., 1983). O segundo passo começa quando o vetor se começa a alimentar novamente, quando os organelos especializados dos futuros esporozoítos se desenvolvem. O terceiro e último passo consiste na formação dos esporozoítos maduros por gemulação (Karakashian et al., 1983). A eficiência da transmissão dos esporozoítos pelo vetor ao seu hospedeiro deve-se principalmente à saliva da carraça que facilita a infecção devido às suas propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras (Ribeiro, 1987).

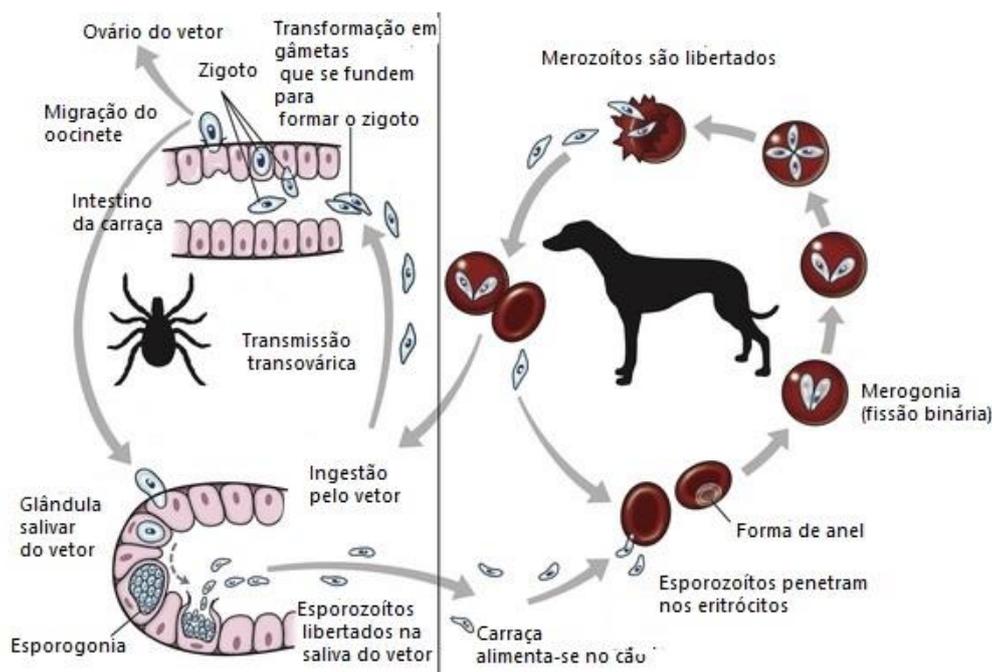


Figura 7: Ciclo de vida de *Babesia* spp. Fonte: <https://veteriankey.com/babesiosis/>

- **No hospedeiro vertebrado:** Uma vez no hospedeiro, os esporozoítos (merozoítos) tendem a infectar os eritrócitos por invaginação formando um vacúolo parasitóforo. A membrana deste vacúolo vai-se desintegrando e o parasita fica com a forma característica de um piroplasma (Maria A Rudzinska et al. 1976). Dentro dos eritrócitos do hospedeiro, a maioria dos trofozoítos passa a merozoítos e divide-se por fissão binária. Este tipo de reprodução assexuada aumenta o número de merozoítos que provocam lise celular, libertando-os para que estes infetem outros eritrócitos. Alguns trofozoítos podem no entanto tornar-se gametócitos, Estes trofozoítos não se reproduzem, aumentando apenas em tamanho. Quanto estes estiverem novamente no intestino do ixodídeo, estes gametócitos vão-se desenvolver em gâmetas antes de deixar os eritrócitos dentro do intestino da carraça (Rudzinska, 1976; M A Rudzinska, 1979).



3.2. Transmissão não vetorial

É certo que a forma mais comum de transmissão de *Babesia* spp. entre animais é através da inoculação do agente por picada de carraça. No entanto tem-se comprovado, através de estudos realizados, a existência de outros meios de transmissão desta doença.

O caso mais reconhecido é o da *B. gibsoni*, que foi demonstrado poder ser transmitida via transfusão sanguínea, por material contaminado ou por transmissão vertical (transplacentária) (Stegeman, 2003; Fukumoto, 2005). Outros estudos têm verificado a transmissão desta mesma espécie entre cães através de mordeduras (lutas de cães), saliva e ainda ingestão do sangue (Birkenheuer, 2005; Yeagley et al., 2009).

Embora *B. gibsoni* possa infetar qualquer cão, existe uma elevada prevalência de infecção em raças de cães como o Pit Bull Terrier e o Tosa, utilizadas em lutas (Lee et al., 2009; Miyama et al., 2005). Como o Sudeste Asiático representa uma área endêmica, as picadas de carraças parecem ser o modo de transmissão mais comum, onde a infecção é igualmente observada em raças de cães que lutam e não lutam. Em contraste, a infecção por *B. gibsoni* nos EUA e na Austrália é encontrada principalmente em Pit Bull Terriers (Yeagley et al., 2009; Adam J Birkenheuer et al., 2015).

A primeira evidência de uma possível transmissão vertical foi documentada nos casos de *B. canis*, na Polónia (Adaszek et al., 2016) em que foi diagnosticada babesiose durante o período de gestação na cadela e 8 a 9 semanas pós-parto os cachorros começaram a apresentar sintomas da doença, e em casos de *B. microti*-like, em Portugal em que ambos os progenitores foram diagnosticados com a doença, e o cachorro sem nunca ter saído do país e sem estar aparentemente infestado com carraças apresentava sintomas semelhantes (Simões et al., 2011).

4. Patogénese e Manifestações clínicas

4.1. Patogénese

A gravidade da babesiose em cães pode variar de uma infecção subclínica, desenvolvimento de anemia leve, até a uma falência generalizada de órgãos e morte (Kraje, 2001). A vasta gama de manifestações clínicas depende muito das espécies de *Babesia* em causa e outros fatores que afetam a gravidade da doença, incluindo idade e estado imunológico do hospedeiro,



esplenectomia, infecção ou doença concomitante e resposta à infecção (P. J. Irwin, 2009; Solano-Gallego e Baneth, 2011a)

A anemia hemolítica e o síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SRIS) que conduz ao síndrome de disfunção múltipla representam a maioria dos sinais clínicos observados na babesiose canina (Taboada e Lobetti, 2006). No geral, as espécies de *Babesia* causam uma anemia hemolítica multifatorial que é a manifestação clínica predominante e que induz uma série de respostas imunitárias que podem ter uma influência muito grande (Ayoob et al., 2010). Esta anemia hemolítica pode ocorrer devido à lise direta dos eritrócitos pela replicação dos parasitas intracelulares que causam uma combinação de hemólise intravascular e extravascular. No entanto, vários mecanismos estão envolvidos com a destruição dos eritrócitos, como por exemplo a ligação de anticorpos à superfície celular, a ativação do complemento (Adachi et al., 1995; Carli et al., 2009), produção de fatores hemolíticos séricos (Onishi et al., 1990), dano oxidativo dos eritrócitos, aumento da fagocitose dos glóbulos vermelhos e aumento da sua fragilidade osmótica e aparecimento de esferócitos.

Tanto os fatores humorais como os celulares estão envolvidos na imunidade contra a infecção por babesiose. Quando ocorre a picada pelo vetor, os esporozoítos são livres no plasma da corrente sanguínea durante um curto período de tempo. Nesta fase, os anticorpos (imunoglobulinas G [IgG]) podem prevenir a infecção através da ligação e neutralização de esporozoítos antes de conseguirem invadir os eritrócitos (Homer et al., 2000).

Uma nova fase começa quando os esporozoítos de *Babesia* invadem os eritrócitos. É durante esta fase de progressão que a parasitemia aumenta e podendo ocorrer a fase aguda da doença. As células do sistema imunitário inato são responsáveis pelo controlo da taxa de crescimento do parasita e, portanto, da extensão da parasitemia. Na ausência de macrófagos e células NK, a parasitemia desenvolve-se a uma velocidade mais elevada. A inibição é provavelmente realizada pela produção de mediadores inflamatórios: interferão gama (IFN- γ) produzido por células NK e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), óxido nítrico (NO) e radicais livres de oxigênio (RLO) produzidos por macrófagos (Homer et al., 2000).



Cerca de 10 dias após a infeção os níveis de parasitemia começam a decrescer. Este decréscimo deve-se ao facto de os piroplasmas de *Babesia* se degenerarem dentro dos eritrócitos e por haver depuração por parte do baço. A infeção entra então na fase de resolução. Para que ocorra morte intra-eritrocitária dos parasitas nesta fase de resolução, é necessário o envolvimento de linfócitos T (CD4+), mais especificamente os produtores de IFN- γ , uma vez que foi proposto que este esteja relacionado com a degradação do parasita dentro do eritrócito (Homer et al., 2000).

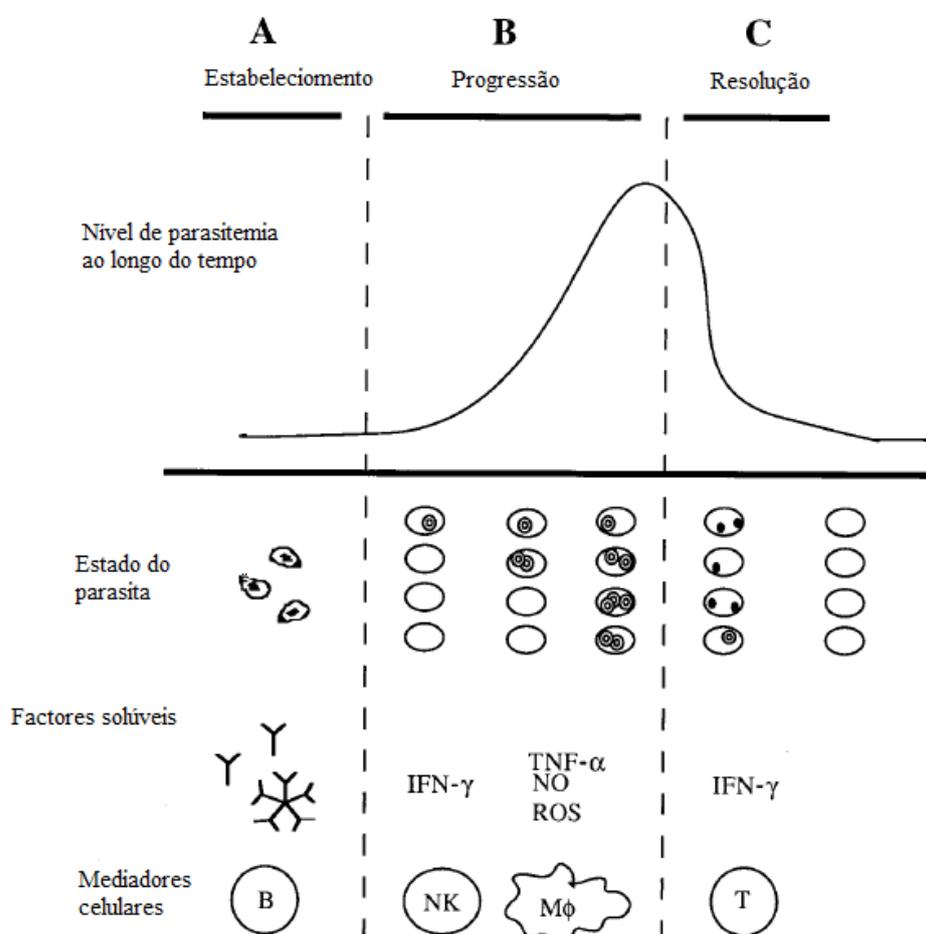


Figura 8: Resposta imunitária em infeções por *Babesia* spp. Adaptado de (M. J. Homer et al., 2000).

A hipoxia tecidual existente nos casos de babesiose, é provavelmente uma das maiores causas de libertação de citocinas, radicais livres de oxigénio, óxido nítrico entre outros mediadores inflamatórios. Estes fatores levam a uma reação generalizada pelo hospedeiro (SRIS) que é responsável pelo envolvimento múltiplo de órgãos vitais (MODS) (Jacobson e Clark, 1994).



4.2. Manifestações clínicas

Existem sinais clínicos e outras anormalidades clínico-patológicas que são comuns a todas as espécies de *Babesia*. Os sinais clínicos frequentemente associados à babesiose canina são apatia, fraqueza, anorexia, mucosas pálidas e uma condição corporal fraca. Todas as espécies de *Babesia* podem provocar febre, esplenomegalia e adenomegalia, anemia, trombocitopenia, icterícia e pigmentúria. Embora a trombocitopenia seja frequentemente detetada, a presença de petéquias ou equimoses não é assim tão comum. A trombocitopenia, quando presente, varia de leve a grave, assim como a anemia (P. J. Irwin, 2009; Solano-Gallego e Baneth, 2011a).

Muitos cães podem apresentar outros sinais clínicos que não estão diretamente relacionados à hemólise provocada pelos piroplasmas, mas que demonstram o envolvimento de outros órgãos (Jacobson, 2006).

Tem vindo a verificar-se que diferentes *Babesia* spp. podem resultar em diferentes parasitémias devido a diferenças na gravidade da doença. *B. vogeli* é a espécie menos virulenta e, embora possa causar doença clínica devido a anemia grave em cachorros, geralmente causa infeções subclínicas com baixa parasitemia em cães adultos. A falta de virulência pode ser devido à sua longa associação com o cão doméstico (Irwin e Hutchinson, 1991; Penzhorn, 2011). *B. rossi* é a espécie mais virulenta, geralmente causando anemia hemolítica marcada que muitas vezes é associada a complicações (Apanaskevich, 2007). *B. canis* só causa sinais clínicos leves que podem incluir anorexia, depressão, febre, icterícia, anemia e trombocitopenia (Boozer e Macintire, 2003; Inokuma et al., 2004). *B. gibsoni* é moderadamente patogénico, embora complicações não sejam comuns (Irwin, 2009). *B. Conradae* é considerado mais patogénica causando maior parasitémia, anemias mais pronunciadas e maior mortalidade (Kjemtrup, 2006). *B. microti-like* causa anemia grave e trombocitopenia com azotemia também sendo comum (Camacho et al., 2003).

A babesiose canina pode ser ainda clinicamente classificada como não complicada ou complicada (Jacobson e Swan, 1995). Os sinais típicos de babesiose não complicada são hemólise aguda, febre, anorexia, depressão, mucosas pálidas, esplenomegalia e pulso em colapso. A babesiose não complicada é ainda dividida em leve, moderada ou grave, dependendo da gravidade da anemia (Jacobson e Swan, 1995). A forma leve pode evoluir para uma forma mais grave não complicada, na qual a anemia pode tornar-se fatal, podendo-



se apresentar um hematócrito abaixo de 15%, chegando por vezes a 5%. A babesiose complicada envolve manifestações clínicas que não estão relacionadas com a doença hemolítica. As complicações frequentemente encontradas são insuficiência renal aguda (IRA), babesiose cerebral, coagulopatia, icterícia e hepatopatia, anemia hemolítica imunomediada (AHIM), síndrome de stress agudo respiratório (SSAR), hemoconcentração, hipotensão, disfunção cardíaca, pancreatite e choque. As complicações raras incluem distúrbios gastrointestinais, mialgia, envolvimento ocular, sinais respiratórios superiores, necrose das extremidades, acumulação de líquido e doença crónica (Jacobson e Clark, 1994; Reyers et al., 1998; Welzl, 2001).

4.2.1. Insuficiência Renal Aguda (IRA)

A falha renal aguda é uma complicação incomum da babesiose canina, na qual os cães apresentam geralmente oligúria ou anúria. Em alguns casos, a babesiose pode despoletar uma doença renal subjacente e pré-existente. A evidência de dano renal é refletida na análise de urina pela presença de proteinúria, cálculos e células epiteliais tubulares renais. A ocorrência de danos a nível renal é comum na forma complicada e não complicada da doença, mas não causa necessariamente insuficiência renal. A observação de níveis séricos de ureia elevados, isoladamente, não é um indicador fiável de insuficiência renal, isto porque, porque um aumento desproporcional na uréia, comparativamente aos níveis de creatinina, tem sido relacionado com a lise dos eritrócitos. A insuficiência renal é diagnosticada por avaliação contínua do volume de urina, análise de urina e grau de azotémia (Lobetti e Jacobson, 2001). Na necrópsia, os rins encontram-se aumentados e de cor escura, com a urina a apresentar uma cor avermelhada. Microscópicamente, as células epiteliais tubulares renais estão aumentadas contendo hemoglobina e pequenas vacúolos. A necrose pode ser evidente em casos graves (Maegraith et al., 1957). Estas lesões morfológicas foram atribuídas à hipoxia anémica resultante da destruição de eritrócitos. No entanto, em casos de babesiose complicada com creatinina elevada, o valor do hematócrito é significativamente mais elevado, tornando a hipovolémia uma causa mais provável do que a anemia para insuficiência renal na babesiose canina (Lobetti e Jacobson, 2001).



4.2.2. Babesiose Cerebral

Não sendo muito comum, a babesiose cerebral traz um mau prognóstico e é causada por danos a nível endotelial com necrose microvascular subsequente, edema perivascular e hemorragia (Jacobson, 2006). A babesiose cerebral notifica a presença simultânea de vários sinais neurológicos. O aparecimento é repentino com uma combinação de sinais como incoordenação, paresia dos membros posteriores, tremores musculares, nistagmo, anisocoria, perda intermitente de consciência, convulsões, estupor, coma, agressividade, vocalizações e movimentos de “paddling”. A taxa de progressão é rápida, tornando-se tetraplégico dentro de algumas horas após a apresentação da ataxia dos membros posteriores. A nível histopatológico, o cérebro pode apresentar congestão, hemorragia macroscópica e microscópica, sequestro de eritrócitos parasitados nos capilares e uma camada de células parasitadas junto ao endotélio. O último implica que as células parasitadas aderem ao endotélio, embora não tenha sido identificado um mecanismo de aderência, é especulado que existem recetores na superfície endotelial que facilitam a aderência (Jacobson, 1994; Jacobson e Clark, 1994).

4.2.3. Síndrome de stresse agudo respiratório (SSAR)

O SSAR é uma complicação grave da babesiose. As indicações clínicas são um aumento súbito na taxa respiratória, dispneia, tosse húmida e secreção nasal espumosa (com epistáxis). Uma análise aos gases sanguíneos pode confirmar hipoxemia. O diagnóstico de SSAR baseia-se na presença de infiltrados pulmonares difusos em radiografias torácicas e hipoxemia, dependendo também do reconhecimento dos fatores de risco, da radiografia torácica e da exclusão de outras causas de edema pulmonar. Este síndrome é caracterizado por uma $PaO_2 < 60$ mmHg, um gradiente de oxigénio alveolar para arterial > 15 mmHg e por uma dispneia marcada. É responsável por uma elevada taxa de mortalidade nos casos de babesiose complicada (Jacobson e Clark, 1994; Welzl, 2001).



4.2.4. Hepatopatia

Esta é uma complicação da babesiose evidenciada por bilirrubinemia, pigmentúria e icterícia, um sinal raramente visto em cães com apenas hemólise. A icterícia pode ocorrer em casos avançados. Além disso, a hipocalémia encontra-se frequentemente presente. No entanto, a possibilidade de comprometimento hepático deve ser sempre considerada. O grau de comprometimento funcional, dano hepatocelular e estase biliar relacionam-se com o grau de icterícia observada. Em alguns casos de babesiose, a ocorrência de icterícia, enzimas hepáticas elevadas e ácidos biliares elevados, é indicativa de uma falha hepática. A icterícia não parece apenas ser devido a hemólise ou obstrução pós-hepática. As alterações histopatológicas geralmente associadas à icterícia incluem lesões difusas e peri-portais, enquanto cães ictericos devido a babesiose apresentam lesão centrolobular. É possível, no entanto, que o fígado tenha uma lesão difusa leve a moderada que seja insuficiente para causar alterações histopatológicas, mas grave o suficiente para causar uma mudança funcional (Jacobson e Clark, 1994; Köster et al., 2015).

4.2.5. Anemia Hemolítica Imunomediada (AHIM)

A anemia hemolítica imunomediada (AHIM) é causada pela destruição imunomediada dos eritrócitos e resulta em uma diminuição acentuada do volume globular. Esta pode ocorrer como um evento idiopático (primária) ou ser secundária a uma variedade de desordens infecciosas, neoplásicas entre outras (Balch e Mackin, 2007).

Os sinais clínicos frequentemente encontrados incluem fraqueza, intolerância ao exercício, apatia, anorexia, taquipneia, dispneia, vômito, diarreia e ocasionalmente poliúria e polidipsia. Ao exame físico pode-se verificar a presença de mucosas pálidas, taquipneia, esplenomegalia, hepatomegalia, febre e linfadenomegalia, podendo também se verificar icterícia (Reimer et al., 1999).

Não há achados patognomônicos para a AHIM, mas sabe-se que anemia com volume globular inferior a 25%, presença de hemoglobinúria e/ou bilirrubinúria, reticulocitose, auto-aglutinação, esferócitos e teste de Coombs positivo. A principal característica da AHIM associada à babesiose é a hemólise em curso, apesar do tratamento anti protozoário bem sucedido. Casos não complicados, bem como casos complicados com AHIM são Coombs



positivos, pois a membrana de eritrócitos é marcada com o complemento e as imunoglobulinas (Scott-Moncrieff, 2001).



Figura 9: Animal com marcada icterícia evidente pela coloração das mucosas, característico de anemias hemolíticas. Disponível em: <https://www.expertoanimal.com>

4.2.6. Disfunção cardíaca

A disfunção cardíaca na babesiose canina tem sido tradicionalmente considerada como uma complicação rara, com a maioria das lesões relatadas como achados acidentais no exame *post mortem*. As lesões cardíacas macroscópicas que foram relatadas incluem derrame pericárdico e hemorragia pericárdica, epicárdica e endocárdica, que geralmente envolvem uma ou mais câmaras, sendo o ventrículo esquerdo mais frequentemente afetado. As alterações documentadas da histopatologia cardíaca são hemorragia, necrose, inflamação e micro trombos de fibrina no miocárdio bem como a presença da microvasculatura cardíaca congestiva e dilatada contendo eritrócitos infetados e formas parasitárias livres. São também detetados elevados níveis de troponina (Lobetti e Dvir, 2012), o que indica existência de lesão miocárdica. As lesões podem ser multifocais, mas geralmente são limitadas a uma área dentro do miocárdio (Dvir et al., 2004).

Um estudo levado a cabo por Eran Dvir demonstrou a presença de alterações eletrocardiográficas que não tinham sido antes verificadas. Os vários acontecimentos descritos na babesiose canina como a anemia, hipotensão, hipocalémia e hipercalémia,



acidose metabólica, hipoxemia e urémia, podem estar na origem do aparecimento destas alterações no ECG (Feldman e Ettinger, 1977; P. Irwin e Hutchinson, 1991; L S Jacobson e Clark, 1994; L S Jacobson et al., 2000; Leisewitz et al., 1996). Neste estudo as alterações que mais se verificaram foram o bloqueio do nódulo sinoatrial e os complexos prematuros ventriculares (CPV).

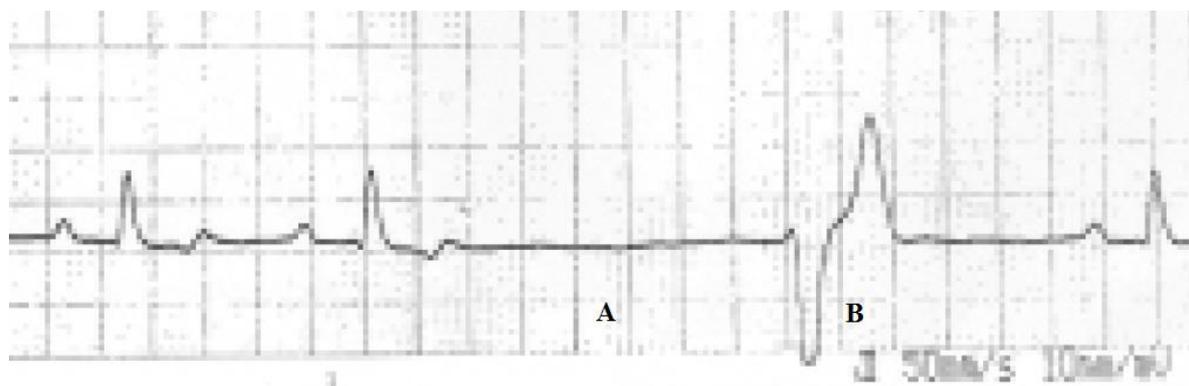


Figura 10: Eletrocardiograma (derivação II, 50 mm/s, 1cm/1mV) de uma fêmea com 4 anos de idade com bloqueio sinoatrial (A) e complexo prematuro ventricular (B). Adaptado de: (Dvir et al., 2004).

Estas representam arritmias não específicas que têm sido descritas em miocardites, enfartes do miocárdio e isquemia, condições sépticas, anemia e desequilíbrios eletrolíticos e ácido-base. Todas estas condições têm-se verificado em casos de babesiose canina, não sendo por isso surpresa que se detetem CPV durante o estudo (Driehuys, 1998; Feldman e Ettinger, 1977; Muir, 1982).

4.2.7. Pancreatite

Os distúrbios gastrointestinais geralmente foram considerados uma complicação rara da babesiose, no entanto, a etiologia dos distúrbios gastrointestinais relatados pode ter sido pancreatite aguda. A inflamação do pâncreas pode se estender ao estômago adjacente, duodeno e cólon ascendente e transversal, representando os sinais clínicos gastrointestinais observados na pancreatite aguda. As anormalidades do sistema digestivo relatadas como uma complicação da babesiose canina incluíram vômitos, diarreia, dor abdominal, melena, hematémese, efusão abdominal, gastrite e enterite. Este novo desenvolvimento de pancreatite aguda como sequela de babesiose canina influencia os regimes de tratamento dos cães



afetados, incorre em custos de tratamento adicionais, resulta em hospitalização prolongada e piora o prognóstico do paciente (Mohr et al., 2000).

4.2.8. Hemoconcentração (“red biliary syndrome”)

O fenômeno de hemólise intravascular grave combinada com a hemoconcentração constitui um síndrome denominado "síndrome das vias vermelhas". As características clínicas são mucosas congestionadas, hemoglobinemia visível (ou hemoglobinúria) e hematócrito (Ht) alto ou normal ($Ht > 0.47$ L/L). A hemoconcentração tem sido associada a outras complicações, como a babesiose cerebral, coagulação intravascular disseminada (CID), IRA e SSRA. Em cães com babesiose, a hemoconcentração pode ser causada por redução no volume de sangue devido à deslocação do líquido do compartimento vascular para o compartimento extravascular. Como as concentrações de proteína plasmática permanecem normais, o plasma em vez de filtrado é deslocado da vasculatura. O aumento da permeabilidade capilar que ocorre com SIRS pode desempenhar um papel importante na patogênese (L S Jacobson e Clark, 1994; Welzl et al., 2001).

4.2.9. Choque

Cães com babesiose grave e complicada são frequentemente apresentados em estado de colapso e choque clínico. Vários mecanismos foram propostos que poderiam levar ao desenvolvimento de choque séptico na babesiose. O primeiro mecanismo está relacionado ao próprio parasita. A associação entre um nível mais alto de parasitemia e choque levanta a questão de saber se os dois estão relacionados causalmente. No entanto, é improvável que a parasitemia grave seja o único fator a despoletar o colapso, especialmente porque alguns cães com baixos níveis de parasitemia são conhecidos por desenvolver choque (Böhm et al., 2006). O segundo mecanismo proposto é a anemia e anoxia tecidual que é causada pela lise de eritrócitos (Jacobson e Clark, 1994). No entanto, Reyers et al., 1998 relataram no seu estudo que a maior taxa de mortalidade foi no grupo de cães sem anemia, enquanto a menor taxa de mortalidade ocorreu em cães gravemente anêmicos. Este resultado sugere que a lise dos eritrócitos não é a provável causa do choque séptico. O último mecanismo envolve uma



resposta inflamatória excessiva do hospedeiro ao parasita, causada pela superprodução de mediadores inflamatórios como parte da reação de fase aguda (Jacobson e Clark, 1994; Lin & Shaio, 1998; Matijatko et al., 2007; Krause et al., 2017).

O choque parasitário, assim como o choque endotóxico, pode passar por uma fase hiperdinâmica seguida de uma fase hipotensiva. Mostrou-se que a hipotensão ocorre frequentemente na babesiose e que a presença e a gravidade da hipotensão aumentam com o aumento da gravidade da doença. A presença de hipotensão numa grande proporção de cães com babesiose complicada é consistente com a hipótese de que os mecanismos inflamatórios são o principal papel nesta doença e podem resultar em choque séptico. É provável que a hipotensão na babesiose seja uma combinação de vasodilatação, redução do volume vascular devido ao aumento da permeabilidade vascular e / ou desidratação e depressão miocárdica. A hipotensão pode desempenhar um importante papel na fisiopatologia da doença, como tem sido proposto o facto de facilitar o sequestro de parasitas (Bone et al., 1992).

5. Alterações hematológicas e Laboratoriais

Para além dos sinais clínicos facilmente reconhecidos no exame físico na babesiose canina existem outros parâmetros que contribuem para a caracterização desta doença. As alterações hematológicas foram examinadas ao longo de vários estudos, uma vez que o parasita tem como principal alvo os eritrócitos. Após a infeção, ocorre geralmente uma anemia regenerativa normocítica e normocrômica leve a moderada devido à hemólise, que inclui anisocitose, policromasia, reticulocitose e normoblastémia (Kettner et al., 2003; Furlanello et al., 2005). Outros achados hematológicos podem incluir esferocitose, em casos de anemia hemolítica mediada secundária e neutrofilia à esquerda, devido à marcada resposta inflamatória sistémica, podendo no entanto encontrarem-se normais ou diminuídos. A hemoconcentração é um indicador de mau prognóstico, tal como cães com hematócrito elevado ou hematócrito dentro do intervalo de referência, mas com um valor inadequado para o grau de hemólise evidente. A trombocitopenia é um achado consistente e geralmente é grave na fase aguda da infeção, mas normalmente a contagem de plaquetas aumenta com uma semana de tratamento. Dependendo da espécie implicada, as alterações laboratoriais podem variar como é possível de ver na tabela 4 (Reyers et al., 1998; Furlanello et al., 2005; Máthé, Vörös et al., 2006; T. P. M. Schetters et al., 2009). Outras alterações incluem o aumento de enzimas



hepáticas, como ALP, ALT e AST, maioritariamente em pacientes com icterícia marcada, refletindo assim a hepatopatia concomitante. O potássio sérico geralmente é baixo, especialmente em animais ictericos. As concentrações séricas de bilirrubina são elevadas, compatíveis com o grau e rapidez do início da anemia e a gravidade da hepatopatia que acompanha. A azotémia está presente em muitos casos desidratados e naqueles com insuficiência renal aguda (Lobetti e Jacobson, 2001). A ureia encontra-se frequentemente aumentada desproporcionalmente para a creatinina (Scally et al., 2006). Na análise de urina pode verificar-se bilirrubinúria, hemoglobínúria, proteinúria, células epiteliais tubulares renais e alguns cristais. Os desequilíbrios ácido-base são comuns com acidose metabólica (devido ao aumento do lactato e aumento da concentração de cloro), sendo que a alcalose respiratória é mais comum (Leisewitz et al., 2001).

Tabela 4: Principais alterações laboratoriais provocadas pelas várias espécies de Babesia. Adaptado de (Solano-Gallego e Baneth, 2011b).

	<i>B. canis</i>	<i>B. vogeli</i>	<i>B. rossi</i>	<i>B. gibsoni</i>	<i>B. microti-like</i>
Historial	Cães jovens, adultos, cães de caça e pastores ou que vivem no exterior	Cachorros ou cães adultos com doenças concomitantes	Cães jovens e adultos	Frequente em cães de luta	Cães jovens, adultos, cães de guarda, caça ou que vivem no exterior
Severidade da doença	Moderada a grave	Ligeira a moderada	Moderada a grave	Moderada a grave	Moderada a grave
Alterações hematológicas e laboratoriais	Trombocitopénia, ligeira a moderada anemia não regenerativa normocítica e normocrómica, anemia regenerativa não é frequente, leucopénia com neutropénia e/ou linfopénia, hipoalbuminémia, aumento das enzimas hepáticas (ALT, AST, ALP), hipocalémia, hiponatrémia e hiperclorémia, hiperlactémia, hiperfosfatémia, hipertriglicémia, hipoglicémia, azotémia pré-renal e renal, bilirrubinémia, pigmentúria e bilirrubinúria	Anemia hemolítica imunomediada regenerativa, anemia não regenerativa, leucocitose, leucopénia e trombocitopénia	Não complicada: anemia ligeira a moderada, trombocitopénia, leucocitose, pigmentúria, bilirrubinémia e bilirrubinúria. Complicada: Acidose metabólica e alcalose respiratória, azotémia renal, anemia hemolítica imunomediada, hipoglicémia e hiperlactémia	Anemia hemolítica regenerativa, por vezes anemia hemolítica imunomediada, trombocitopénia, pigmentúria, bilirrubinémia e bilirrubinúria, neutropénia e leucocitose, hipoalbuminémia, azotémia e aumento das enzimas hepáticas (ALT, ALP)	Anemia regenerativa moderada a grave, trombocitopénia, azotémia, proteinúria, cilindrúria e hiperglobulinémia

6. Diagnóstico

O diagnóstico de babesiose deve envolver um histórico descritivo completo do animal que inclua manifestações clínicas, histórica de viagens a áreas endémicas da doença, exposição a picadas de carraça, esplenectomia e transfusão de sangue recente. Uma vez que os sinais



clínicos da doença podem ser relativamente não específicos, um teste de laboratorial é essencial para estabelecer um diagnóstico correto. O método de diagnóstico primário consiste na detecção microscópica de parasitas com a observação de um esfregaço sanguíneo, bem como a avaliação sorológica com testes de imunofluorescência indireta de anticorpos (IFAT) e, possivelmente, PCR (Chisholm, 1978; Persing et al., 1992).

6.1. Métodos de detecção microscópica

O exame de esfregaço de sangue é uma ferramenta de diagnóstico útil para a babesiose clínica em cães. No entanto, a sensibilidade deste método é menor do que a de diagnóstico molecular ao auxiliar o veterinário a fazer um diagnóstico positivo, sendo que é bastante dependente da espécie que infecta o cão, uma vez que umas são mais facilmente visíveis que outras (Solano-Gallego e Baneth, 2011b). A observação do esfregaço de sangue deve, portanto, ser uma ferramenta de diagnóstico de "primeiro passo". Além disso, para identificar as espécies de piroplasma, a observação morfológica é insuficiente, e técnicas moleculares como o método de PCR são necessárias (Böhm et al., 2006; P. J. Irwin, 2009).

Este método é altamente específico e pode ser usado para diagnosticar a maioria dos cães doentes infetados pelos piroplasmas grandes de *Babesia* (por exemplo, *B. canis*). Os pequenos piroplasmas (*B. gibsoni*, *B. microti*-like sp.) são difíceis de observar por microscopia ótica, que tem sensibilidade relativamente pobre a moderada, sendo necessária alguma experiência (Miró et al., 2015). A observação de merozoítos (piroplasmas) intraeritrocitários emparelhados é indicativa de infecção, mas existem outras fases parasitárias do parasita, que apresentam diferentes formas e tamanhos, dependendo da espécie (trofozoítos), e estes tornam sua detecção difícil e demorada (Potgieter e Els, 1977).

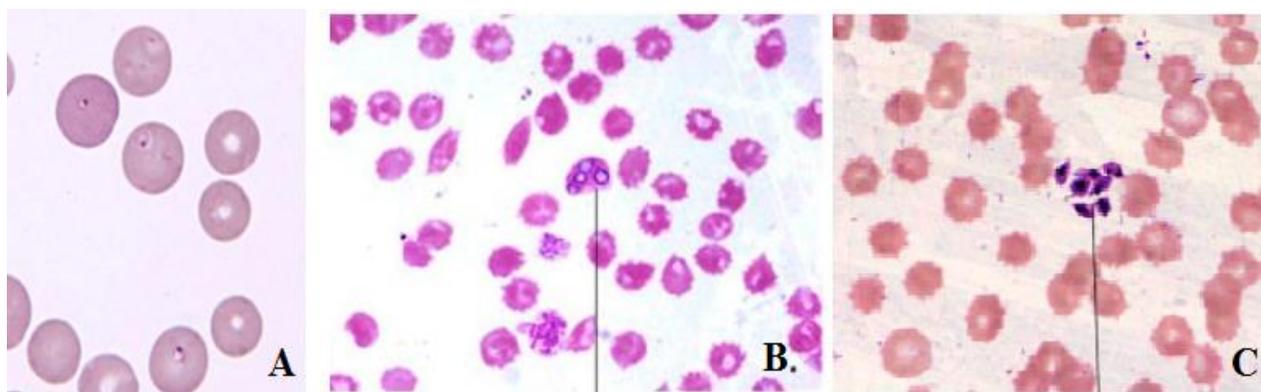


Figura 11: Trofozoítos de *B. gibsoni* (A), piroplasmas de *B. canis* (B) e formas extraeritrocitárias de *B. canis* (C). Adaptado de Shah, 2011.



A microscopia continua a ser o teste de diagnóstico mais simples e acessível para a maioria dos veterinários e, durante as infecções agudas, a microscopia é razoavelmente sensível à detecção de parasitas intraeritrocitários nos esfregaços de sangue corados de Giemsa, Wright ou Diff-Quick. A diferenciação entre formas grandes e pequenas também é relativamente simples. Além disso, a microscopia ainda é a única opção viável disponível para veterinários em muitas partes do mundo em desenvolvimento, onde a babesiose é endêmica. Com as formas grandes de *Babesia*, a amostragem de recolhida de capilares periféricos (orelha) ou o exame de células do buffy-coat de um tubo de hematócrito pode melhorar a probabilidade de encontrar parasitas (Böhm et al., 2006; P. Irwin e Hutchinson, 1991).

6.2. Métodos serológicos

Os testes sorológicos que podem ser utilizados são técnicas quantitativas, como a imunofluorescência indireta (IFAT), ou o ensaio de imunoenzimático (ELISA). Uma das vantagens da IFAT ou ELISA é que estes testes permitem-nos determinar os níveis de anticorpos e, portanto, estabelecer se estes são altos ou baixos. Por esta razão, é importante enviar as amostras para um laboratório que use técnicas serológicas quantitativas (Sainz et al., 2015). As técnicas rápidas ainda não estão comercialmente disponíveis para a detecção de anticorpos anti-*Babesia* para o contexto clínico e oferecerão apenas um resultado positivo ou negativo, sem fornecer um título de anticorpos. Além disso, as técnicas quantitativas são geralmente mais sensíveis e específicas do que técnicas rápidas (Fukumoto et al., 2004)

A interpretação de um resultado positivo é complicada pela reatividade cruzada entre as diferentes espécies, especialmente as espécies filogeneticamente relacionadas (Yamane et al., 1993).

No entanto, estes métodos têm a desvantagem de necessitar da presença de anticorpos específicos contra esses parasitas, que podem demorar dias ou semanas para se desenvolverem num animal infetado ou que estão presentes meses após a infeção ter desaparecido, tornando sua utilidade muito limitada em casos de doença aguda, animais vacinados ou animais limpos por tratamento (Mosqueda, 2012).



6.2.1. IFAT

Quando o número de parasitas no sangue é muito baixo para ser detetado, a procura de anticorpos contra proteínas de fases sanguíneas provou ser uma ferramenta confiável para identificar portadores infetados ou animais previamente expostos. O IFAT foi descrito pela primeira vez por Ristic e Sibinovic em 1964 para detetar anticorpos contra *B. caballi* em cavalos cronicamente infetados (Vercammen et al., 1995). Desde então, foi adaptado a todas as espécies *Babesia* e tem um bom nível de especificidade e sensibilidade. O IFAT baseia-se no reconhecimento de antígenos de parasitas por anticorpos séricos no sangue do animal testado. Os anticorpos ligados são detetados por um anticorpo anti-Ig marcado com um marcador fluorescente (anticorpo secundário) (Burrige et al., 1973; Weiland, 1986).

6.2.2. ELISA

Quando um grande número de amostras de soro é processado, o teste IFAT torna-se demorado e não é muito eficaz. Isto deve-se principalmente porque cada amostra deve ser analisada ao mesmo tempo pelo examinador e a leitura de cada amostra pode levar algum tempo (Bose e Peymann, 1994). Outros métodos baseados em automação, como o método de ELISA, têm-se demonstrado bastante úteis. Este tem a vantagem de não ser subjetivo, capacidade de ler facilmente um grande número de amostras e apresenta maior especificidade do que o IFAT (Weiland, 1986; Waltisbuhl, 1987). Métodos recentes incluem o uso de antígenos recombinantes e anticorpos monoclonais, aumentando assim a especificidade e a diminuição da ligação e sinal inespecíficos. Isto permite a expressão de proteínas patogénicas antigénicas, que podem ser ligadas em poços de ELISA e utilizadas para avaliar a presença de anticorpos anti-babesia utilizando uma anti-IgG conjugada com uma enzima que geralmente é a peroxidase (Bose, 1990; Ikadai et al., 2000; Boonchit et al., 2002).

6.3. Métodos moleculares

Embora os casos clinicamente aparentes sejam geralmente diagnosticados, os pacientes que apresentem infeção leve muitas vezes permanecem não diagnosticados, não recebendo o tratamento adequado. A deteção desses casos leves de babesiose requer técnicas mais sensíveis do que as descritas até agora (Mary J Homer et al., 2000).



A técnica de PCR é muito útil no diagnóstico da babesiose, uma vez que a detecção é mais sensível do que um exame direto de um esfregaço sanguíneo. Em segundo lugar, a detecção de DNA para um agente patogénico específico em contexto cenário clínico pode ser considerada evidência de uma infeção ativa. Além disso, ao contrário da detecção direta por microscopia ótica ou serologia, o método de PCR permite uma identificação mais confiável das espécies em causa que infetam o animal (Solano-Gallego e Baneth, 2011a).

Dentro do método de PCR existem algumas variações que permitem a identificação e diferenciação de várias espécies de *Babesia*, que incluem o semi-nested PCR (Birkenheuer, 2017), PCR-RFLP (R Jefferies et al., 2007) e RLB (Matjila, 2004; Yisaschar-Mekuzas et al., 2013). Os genes de RNA ribossómico 18S, 5.8S, 28S e as sequências espaciais transcritas internas (ITS1 e ITS2) foram utilizados para PCR convencional (Fukumoto et al., 2001).

Estas técnicas permitem-nos melhorar o diagnóstico ao nível da espécie e, portanto, fornecer um prognóstico mais preciso (Adam J Birkenheuer et al., 2004). O sangue periférico tamponado com EDTA deve ser usado para realizar este tipo de análises. Além disso, amostras de baço podem também ser úteis, embora essa amostra não seja geralmente muito usada porque envolve um procedimento mais invasivo (Solano-Gallego e Baneth, 2011a).

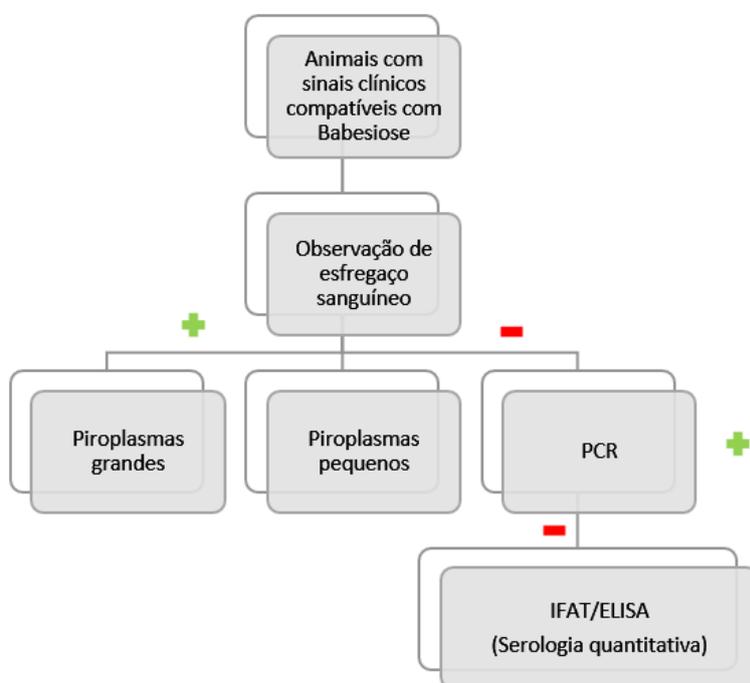


Figura 12: Algoritmo diagnóstico para a babesiose canina. Adaptado de (Laila Solano-Gallego et al., 2016).



7. Tratamento

O tratamento de cães que apresentem sintomatologia de babesiose canina encontra-se direcionado para o controlo de propagação do parasita, moderação da resposta imunitária do hospedeiro e tratamento sintomático (Schoeman, 2009).

Segundo Irwin, existe uma escassez de evidências cientificamente precisas quanto à eficácia de medicamentos que foram utilizados para tratar a babesiose canina nos últimos 100 anos. Os estudos sobre o tratamento desta doença foram outrora bastante dificultados pela “necessidade” de ter que confiar na ausência dos sinais clínicos e de formas parasitárias em esfregaços sanguíneos, para se poder declarar que um animal estava curado. Para determinar a eficácia de um fármaco com confiança razoável, os tecidos obtidos por necropsia de todos os órgãos deveriam ser testados por técnica de PCR validada no final de cada experiência. A ausência do DNA parasitário do sangue periférico por si só não é evidência suficiente de cura (P. J. Irwin, 2009).

Casos leves a moderados de babesiose não complicada requerem apenas terapia anti-babesia, podendo ser visíveis sinais de recuperação dentro de 24 horas pós-tratamento específico. Casos graves de babesiose não complicada requerem terapia anti-babesia e transfusões sanguíneas, e todos os casos de babesiose complicada requerem terapia adicional.

7.1. Fármacos anti-babesiais

São reconhecidos três medicamentos contra a babesiose: Aceturato de diminazeno, dipropionato de imidocarb e atovaquone. A atividade antiparasitária do aceturato diminazeno (Virbazen®, Virbac) não é bem compreendida, mas está evidentemente relacionada à interferência com glicólise aeróbica e síntese de DNA no parasita (Lane, 1991; Miller, 2005). O aceturato liga-se, inibindo a síntese de DNA, provocando a dilatação dos organelos e espaço perinuclear ligados à membrana, dissolução do citoplasma e destruição do núcleo do parasita. É recomendada uma dose de aceturato de diminazeno intramuscular (3,5 mg / kg) (Birkenheuer e Breitschwerdt, 1999). O aceturato de diminazeno é o fármaco que pode ser utilizado em casos de infecções por *B. canis* sem complicações, devendo ser evitado em casos graves por causa de possíveis efeitos hipotensivos e anticolinérgicos (Milner, 1997). O aceturato de diminazeno tem um índice terapêutico baixo, com toxicidade que resulta em depressão ou estupor, vocalização contínua, ataxia, opistótonus, rigidez extensora, nistagmo e



convulsões. Os sinais nervosos ocorrem 24 a 48 horas após uma sobredosagem, sendo irreversíveis e potencialmente fatais. O diminazeno pode aumentar os níveis de transaminases, o que pode afetar a interpretação dos resultados laboratoriais (Donghyun, 2014).

O dipropionato de imidocarb (Imizol®, MSD Saúde Animal) tem ação direta sobre o parasita, alterando o número e o tamanho das células e a morfologia citoplasmática. Recomenda-se uma dose com administração via intramuscular (IM) ou subcutânea (SC) (6,6 mg / kg), e uma segunda dose administrada com um intervalo de 14 dias (Kjemtrup e Conrad, 2006). O imidocarb é doloroso na injeção e pode provocar o aparecimento de sinais colinérgicos como hipersalivação, diarreia, epífora, dor abdominal e vômito num espaço de 10 minutos após a administração (Garcia, 2006). Para evitar estes efeitos secundários, o animal pode ser pré-medocado com atropina. Outras reações que podem ocorrer, 10 a 12 horas após a administração, incluem tremores, depressão, edema periorbital e pirexia. A toxicidade pode provocar necrose renal e hepática (Sikorski, 2010; Uilenberg, 2010).

Atovaquona (Malarone®, GlaxoSmithKline) é um novo composto anti-protozoário que tem atividade de amplo espectro contra vários protozoários incluindo espécies de *Babesia*. Atovaquona está comercialmente disponível em 2 formulações: uma formulação simples do fármaco e uma combinação de 2,5: 1 com cloridrato de proguanil (Birkenheuer et al., 2004; Sakuma, 2009). Atovaquone inibe a ação do citocromo b. No entanto, o protocolo terapêutico tem vários problemas, como por exemplo um tempo relativamente mais longo para mostrar eficácia clínica e variados efeitos adversos, como vômitos e diarreia. Além disso este fármaco é dispendioso e, como tal, não é comum em muitos países (Birkenheuer et al., 2004; Matsuu et al., 2004). A combinação entre o atovaquone e azitromicina é o único tratamento que se provou reduzir a parasitemia em infecções por *B. gibsoni* (Sakuma et al., 2009). A azitromicina é um macrólido, que apresenta atividade contra espécies de *Plasmodium in vitro* e *in vivo* (Nakornchai & Konthiang, 2006). A dose mais utilizada de atovaquone é de 13,5 mg/kg, administrada *per os* (PO) a cada 8 horas com alimentos gordurosos (para maximizar a absorção de fármaco) e em associação com azitromicina (a uma dose de 10 mg/kg PO) durante o período de 10 dias (Di Cicco et al., 2012). Recentemente, o uso de duas doses de IM de buparvaquone a 5 mg/kg separadas por 48 h demonstrou boa eficácia clínica em cães naturalmente infetados por *B. microti-like sp* (Sakuma et al., 2009; Checa, 2015; Jefferies, 2016).



7.2. Outras combinações farmacológicas

Uma terapêutica alternativa é a combinação de 3 antibióticos diferentes: clindamicina-metronidazol-doxiciclina com doses de clindamicina a 25 mg/kg, metronidazol a 15 mg/kg e doxiciclina a 5 mg/kg, PO de 12 horas durante 10 dias. Esta combinação aumenta a imunidade inata e é conhecida como protocolo Marshall (Nandini, 2016).

O tratamento com clindamicina isoladamente não é suficiente para eliminar os sinais clínicos e as formas parasitárias do sangue periférico (Wulansari et al., 2003). Foi também sugerido que a clindamicina estimula a celular e humoral contra as infecções por *Babesia*, resultando numa melhora na condição clínica (Wulansari et al., 2003; Nandini, 2016). Esta terapia combinada de clindamicina, metronidazol e doxiciclina é uma estratégia de tratamento alternativa eficaz para a babesiose clínica crônica com menos efeitos secundários observados na pesquisa realizada até o momento, no entanto, há que ter em atenção a questão do desenvolvimento de resistência antibiótica (Rich et al., 2005).

Outra combinação que pode ser usada para tratar a babesiose canina é uma combinação de doxiciclina-enrofloxacina-metronidazol com ou sem aceturato de diminazeno. A eficácia desta combinação de antibióticos em conjunto com o aceturato de diminazeno não se demonstrou superior do que a combinação por si só (Lin e Huang, 2010).

Tabela 5: Principais linhas de tratamento para as várias espécies de *Babesia*. Adaptado de (Laia Solano-Gallego et al., 2016).

Espécie	Fármaco	Eficácia	Dosagem
B. canis	Dipropionato de Imidocarb	Boa	6.6mg/Kg IM/SC (repetir dose 15 dias depois)
B. vogeli	Doxiciclina	Fraca	10mg/Kg/dia PO, durante 30 dias
B. microti-like	<ul style="list-style-type: none">Dipropionato de ImidocarbAzitromicina+AtovaquoneAzitromicina+Buparvaquone	Fraca Boa a moderada Boa a moderada	<ul style="list-style-type: none">6.6mg/Kg IM/SC (repetir dose 15 dias depois)10mg/Kg PO SID/10 dias + 13.5mg/Kg PO TID/10 dias10mg/Kg PO SID + 5mg/Kg IM (repetir passadas 48h)

Outro exemplo terapêutico, foi demonstrado num estudo de 2007 por Chaudhuri e Varshney, em que se comparou a eficácia do aceturato de diminazeno em cães infetados, com a de um



fármaco homeopático, o *Crotalus horridus* 200C, obtido a partir do veneno da cacavel, verificando-se uma progressiva e significativa regressão dos sinais clínicos em casos de babesiose canina moderada, cujo principal agente em causa era *B. gibsoni* (Chaudhuri e Varshney, 2007).

7.3. Tratamento de suporte

Em casos de babesiose canina moderada a grave é necessário recorrer ao uso de terapia adicional de suporte, que varia de acordo com o tipo de espécies de *Babesia* em causa. Em cães desidratados ou hipovolémicos, é indicado o uso de fluidoterapia com cristaloides intravenosos, juntamente com a correção dos desequilíbrios eletrolíticos e ácido-base (Irwin, 2009). A fluidoterapia também é essencial para a manutenção do volume sanguíneo e perfusão adequada dos órgãos, diurese e prevenção da deposição dos eritrócitos nos capilares (Ayoob et al., 2010).

Em cães com sinais clínicos associados à anemia, deve-se recorrer ao fornecimento de transfusões sanguíneas. Alternativamente, a hemoglobina sintética pode ser utilizada. Cães com CID ou distúrbios de coagulação podem requerer transfusões de plasma (Grundy e Barton, 2001).

O uso de fármacos imunossupressores como a prednisona (2mg/Kg/dia) em cães com AHIM ou trombocitopenia é controverso, uma vez que estas condições estão sempre associadas a doenças infecciosas. Se o animal se encontra estável e não requer hospitalização, o tratamento deve ser restrito a agentes antiprotozoários. O tratamento não deve ser iniciado exclusivamente em relação ao valor de hematócrito ou ao valor plaquetário, mas sim com base nos sinais clínicos associados à anemia ou trombocitopenia, uma vez que um animal com um hematócrito de 15%, por exemplo, pode reagir bem apenas com tratamento antiprotozoário (Grundy & Barton, 2001; Scott-Moncrieff et al., 2001).

Fármaco como a heparina, o ácido acetilsalicílico ou o clopidogrel podem ser utilizados em cães com AHIM, de forma a prevenir a ocorrência de tromboembolismos pulmonares, que em muitos destes casos se torna fatal (Kidd & Mackman, 2013). Muitas vezes surgem sinais clínicos secundários relacionados com a própria doença ou até mesmo com o tratamento anti-parasitário e, como tal, é importante adicionar, por exemplo, anti-eméticos ou oxigenoterapia quando há dificuldade respiratória (Ayoob et al., 2010).



8. Prognóstico

A maioria dos cães infetados com *B. canis* e *B. vogeli* (piroplasmas grandes) melhoram clinicamente nos dias 1 a 7 após o início do tratamento antiprotozoário específico, embora, em alguns casos, não exista uma resposta imediata, por vezes por mais de 15 dias (P. Irwin e Hutchinson, 1991; Bourdoiseau, 2006). Os cães infetados por estas duas espécies geralmente apresentarão uma recuperação completa após o tratamento, sendo a resposta clínica boa e mais rápida (24-48 h) em cães infetados com espécies grandes de *Babesia* do que com pequenas (*B. gibsoni* e *B. microti-like*) (P. J. Irwin, 2009; Solano-Gallego e Baneth, 2011b).

Nas infeções por *B. canis*, a ocorrência de resultados baixos e mortalidade estão associadas a uma anemia moderada, trombocitopénia grave, leucopenia leve a moderada, hiperlactemia, triglicéridos moderadamente aumentados e concentrações moderadas de proteínas séricas totais (Eichenberger et al., 2016).

Para alguns cães, os sinais clínicos podem desaparecer inteiramente, mas uma anemia moderada ou trombocitopénia poderão persistir. Noutros casos, as alterações clinicopatológicas podem ser resolvidas, mas podem reaparecer em circunstâncias anormais como é o caso do stresse, bastante comum em cães submetidos a esplenectomia (Birkenheuer et al., 1999, 2004).

Portanto, são necessários exames sanguíneos de acompanhamento (hemograma completo e perfil bioquímico incluindo hematócrito), até que concentração de plaquetas e as alterações hepáticas/renais normalizarem. Isto é especialmente importante em cães esplenectomizados ou em casos de infeção por *B. gibsoni* ou *B. microti-like sp* (Laia Solano-Gallego et al., 2016).

Geralmente os níveis de anticorpos começam a diminuir três semanas após o início do tratamento e diminuem gradualmente depois de aproximadamente 160 dias (Brandão et al., 2003). A cura clínica e uma boa resposta terapêutica são mais comuns em infeções por piroplasmas grandes de *Babesia* do que em infeções por formas pequenas, que tendem a ser mais refratárias aos tratamentos convencionais. Existem vários protocolos terapêuticos destinados a infeções provocadas por pequenas espécies de *Babesia*, embora a cura parasitológica seja rara, o que justifica a persistência de *B. gibsoni* em cães após o tratamento



com diferentes protocolos (Wulansari et al., 2003; Sakuma et al., 2009; C. Lin & Su, 2011; Ryan Jefferies et al., 2016).

9. Prevenção

A prevenção da babesiose recai principalmente no uso de tratamentos acaricidas tópicos e ambientais destinados a reduzir a exposição a carrças e a transmissão de agentes parasitários para o cão ou gato. A profilaxia contra os ixodídeos deverá abranger todo o período durante o qual as carrças são ativas, tendo em conta os fatores de risco e estilo de vida do animal. Esta profilaxia pode consistir na verificação regular de existência de carrças no animal pelo proprietário e médico veterinário, e pelo uso regular de tratamento acaricida (Halos et al., 2012)

Os principais compostos ativos considerados eficazes para o tratamento e prevenção de infestações por ixodídeos em cães incluem uma grande variedade de acaricidas, que apresentaram diferentes efeitos nestes como expelência, efeito anti-alimentação, desprendimento da carrça, e/ou efeito acaricida, sendo importante usar acaricidas adequados para matar os ixodídeos o mais rapidamente possível antes que estes transmitam os as formas parasitárias de *Babesia* ao hospedeiro (Halos et al., 2012). Como se trata de uma doença parasitária que poderá ter grandes repercussões, é ainda melhor evitar que as carrças se liguem.

As coleiras de eficácia duradoura (6-8 meses), pipetas spot-on (3-5 semanas), sprays (2-3 dias) e os novos comprimidos orais mastigáveis (1-3 meses) são os meios mais populares e eficazes de controlar infestações por carrças em cães. Estes podem incluir permetrina, amitraz, fipronil, imidacloprid, fluralaner entre outros produtos para proteção dos animais de companhia (Last, 2007; Berrada, 2009; Brianti, 2010). A diminuição da carga de possíveis vetores no ambiente pode ser conseguida através do uso de formulações acaricidas convencionais, de libertação lenta, aplicadas por pulverização (spray) ou em pó (Fernandes e Bittencourt, 2008). As novas formulações orais (sobretudo fluralaner e outras isoxazolinias) e atuam a nível sistémico e, como tal, é necessário que as carrças se liguem ao hospedeiro e se comecem a alimentar para ingerirem a substância ativa (Taenzler, 2016).

Os tratamentos periódicos com objectivo profilático com dipropionato de imidocarb (6 mg/kg) ou com doxiciclina (5 mg/kg) mostraram resultados variáveis mas não são recomendados atualmente como profilaxia de rotina da babesiose canina (Uilenberg et al.,



2010; Vercammen, 1996). O uso quimioprolático destes medicamentos deve ser restringido a cães imunodeprimidos (principalmente cães esplenectomizados) com maior risco de exposição devido à sua residência em áreas endêmicas (Irwin, 2009).

Como os agentes da babesiose canina são também transmitidos através de transfusões sanguíneas, é altamente recomendável a verificação de doadores de sangue regularmente. A transmissão não vetorial de *Babesia* por transfusões de sangue e/ou por lutas de cães é evitável, devendo-se dar especial atenção e preocupação, uma vez que, pode ser responsável pela inclusão desta doença em áreas anteriormente consideradas não endêmicas (Wardrop et al., 2005).

Os antígenos solúveis de parasitas derivados de uma cultura *in vitro* (SPA) foram utilizados para proteger os cães contra *B. canis* numa vacina comercialmente disponível desde a década de 1980 (Theo Schetters, 2005). No entanto, a eficácia inconstante da vacina SPA, durante um teste com a vacina homóloga, foi atribuída à variação da estirpe e ficou claro que o SPA derivado da estirpe utilizada não protegeu os cães com *B. rossi* (Schetters, 1995), o que levou ao desenvolvimento de uma vacina contendo uma combinação de SPA a partir de *B. canis* e *B. rossi* sul-africanos, oferecendo assim maior proteção (Schetters et al., 2001). Ambas as vacinas (homólogas e heterólogas) induzem proteção parcial contra a doença causada por *B. canis* manifestando-se assim pela diminuição da gravidade dos sinais clínicos, parasitemia ou duração da doença clínica induzida pela infeção. A vacinação não previne a infeção, mas parece bloquear o início de muitos dos processos patológicos envolvidos na doença, resultando numa baixa parasitemia (S. Fukumoto, 2007, 2009; Cao et al., 2013).



CASOS CLÍNICOS

Caso clínico nº 1: Lord

- **Identificação do animal**

O Lord é um cão, macho, de raça Cão de Gado Transmontado x Serra da Estrela, inteiro, com aproximadamente 4 meses de idade, que se apresentou a uma consulta no dia 1 de janeiro de 2017, no Hospital Veterinário de Trás-os-Montes em Vila Real.

- **Motivo da consulta/ Exame físico**

O animal foi apresentado à consulta por o proprietário referir que este apresentar um pouco de intolerância ao exercício durante o pastoreio, anorexia, e a urina se encontrar mais escura. Ao exame físico era bastante evidente a prostração do animal. Verificou-se que este apresentava temperatura elevada (40,1°), a mucosa bucal e ocular encontravam-se ictéricas, taquipneia e dispneia. Não foram detetadas outras quaisquer alterações no exame físico.

- **Diagnósticos diferenciais**

- Anemia hemolítica imunomediada primária;
- Anemia hemolítica imunomediada secundária a hemoparasitas;
- Hepatite infecciosa canina
- Outras hepatopatias

- **Exames complementares**

Dado a condição clínica do animal, procedeu-se a recolha de uma amostra de sangue para realização de hemograma, perfil bioquímico completo e microhematócrito, cujos resultados estão expostos nas tabelas 6 e 7, provas de coagulação e provas de aglutinação (tabela 8).



Tabela 6: Resultados do hemograma do Lord obtidos no dia de entrada no HVTM (01/01/2017). Os parâmetros alterados encontram-se assinalados a vermelho.

Parâmetros	Resultados	Valores de referência
Glucose (mg/dl)	51	75 – 128
Ureia (mg/dl)	33,5	9,2 – 29,2
Creatinina (mg/dl)	1,3	0,4 – 1,4
Bilirrubina (mg/dl)	9,5	0,1 – 0,5
ALT (U/l)	558	17 – 44
ALP (U/l)	363	13 – 83
GPT (U/l)	673	17 – 78
Albumina (g/dl)	2,2	2,6 – 4
Triglicédeos (mg/dl)	295	30 – 133

Tabela 7: Resultados da bioquímica sérica do Lord no dia de entrada no HVTM (01/01/2017). Os parâmetros alterados encontram-se assinalados a vermelho.

Parâmetros	Resultados	Valores de referência
Leucócitos (m/mm ³)	23,48	6,0 - 17,0
Linfócitos (%)	53	10,0 - 30,0
Eritrócitos (m/mm ³)	1,63	5,5 - 8,5
Htc (%)	12,6	35 - 55
Hemoglobina (g/dl)	3,6	10,0 - 18,0
Plaquetas (m/mm ³)	129	120 - 600

Tabela 8: Resultados das provas de coagulação do Lord no dia de entrada no HVTM (01/01/2017)

Provas de coagulação	Provas de aglutinação
Tempo de protrombina: 10s (5,8 – 14,9)	Sem macroaglutinação
Tempo de tromboplastina: 29s (11 – 25) ↑	Com microaglutinação



Foi ainda realizado um esfregaço sanguíneo com a vista a procura de hemoparasitas, uma vez que se trata de uma zona endémica, no qual não foram observadas quaisquer formas parasitárias intra ou extraeritrocitárias, sendo apenas visível alguma hemólise.

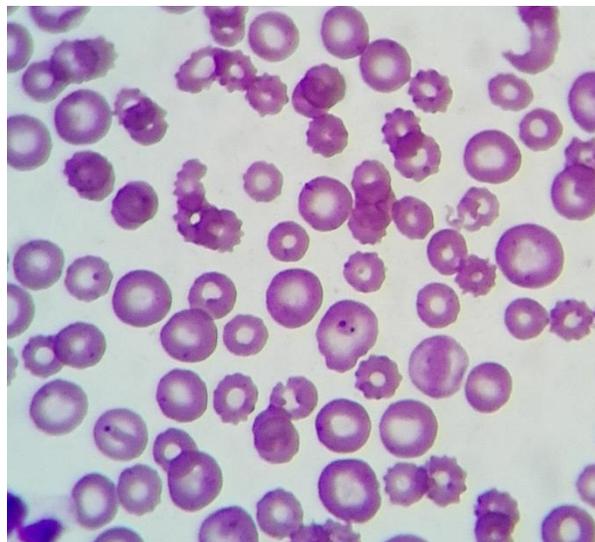


Figura 13: Esfregaço sanguíneo realizado no dia em que o Lord deu entrada no HVTM (01/01/2017).

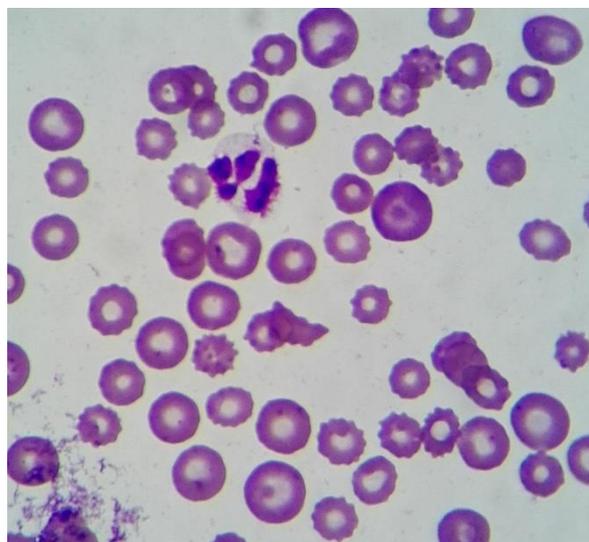


Figura 14: Esfregaço sanguíneo realizado no dia em que o Lord deu entrada no HVTM (01/01/2017).

Uma vez que não foram encontradas formas parasitárias na observação do esfregaço sanguíneo, foi proposto a realização de um teste rápido de imunocromatografia (Snap 4 DX®, Srvive) para deteção de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Dirofilaria immitis* e *Borrelia burgdorferi*, que também teve resultado negativo.

Como o proprietário referiu que o animal apresentava a urina mais escura fez-se uma colheita através de cistocentese ecoguiada. A urina obtida na colheita apresentava uma cor escura com evidência de hematuria e bilirrubinúria confirmadas por urianálise.



Figura 15: Urina colhida por cistocentese evidenciando uma marcada hematuria. Colheita realizada no dia em que o Lord deu entrada no HVTM (01/01/2017).



Figura 16: Teste rápido de detecção das 4 principais hemoparasitose (negativo) realizado no dia em que o Lord deu entrada no HVTM (01/01/2017).

• Tratamento e Monitorização

O animal foi então hospitalizado começando a fazer uma taxa de manutenção de fluidoterapia (30 ml/h). Devido ao diminuído valor de hematócrito, decidiu-se proceder a uma transfusão de uma unidade de sangue para tentar normalizar estes valores após a tipificação. Começou tratamento com ranitidina (Zantac®, GlaxoSmithLine) a uma dose de 0,36 ml IV BID, e metilprednisolona (Solu-Medrol® 125 mg, Pfizer) numa dose de 0,57 ml IV BID. É consenso que o tratamento da AHIM envolve o uso de agentes imunossuppressores para reduzir a taxa de destruição eritrocitária mediada por anticorpos (auto-anticorpos).

No 2º dia de internamento, o Lord continuava muito prostrado, a temperatura, apesar de ter diminuído um pouco, continuava aumentada, e o hematócrito rondava os 14%. Continuava a apresentar hematuria, fezes muito moles com tenesmo, começou a comer e foram-lhe encontradas algumas carraças, pelo que se decidiu fazer novo esfregaço de buffy-coat para pesquisa de Babesia, no qual foi possível a observação de piroplasmas.

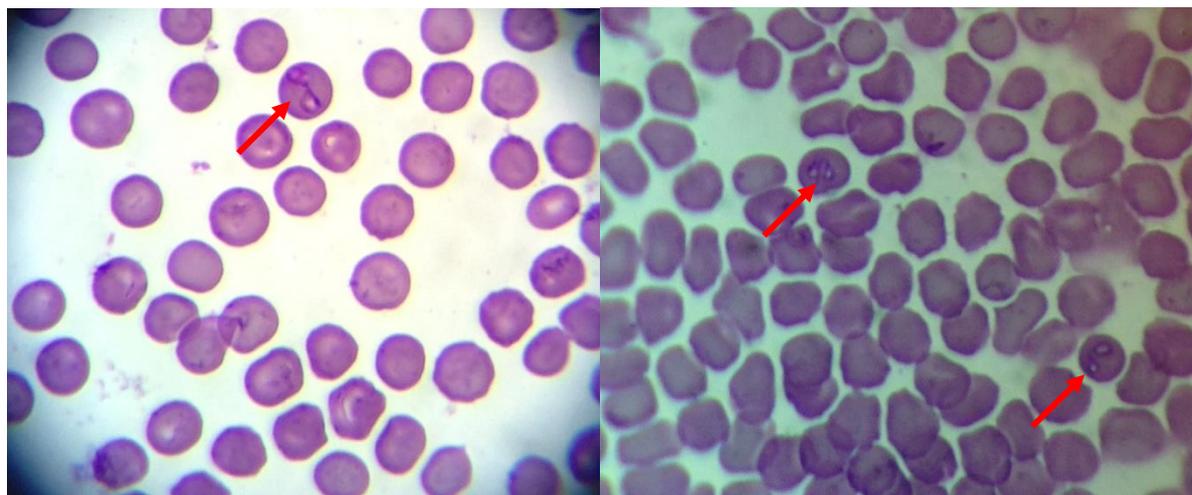


Figura 17: Esfregaço de buffy-coat. Colheita realizada no 2º dia de internamento do Lord no HVTM (02/01/2017). Observação de merozoítos de *Babesia* dentro dos eritrócitos.

Estabelecido o diagnóstico definitivo do animal foi administrada a primeira dose de dipropionato de imidocarb, 1,18 ml via SC (6,6 mg/kg), juntamente com a administração de 3,6 ml de cefazolina via IV BID (20 mg/kg). No terceiro dia de internamento, mediu-se novamente o hematócrito, tendo-se verificado uma subida ligeira para 18%, a temperatura começou a diminuir (38,5°C), mas este ainda apresentava bilirrubinúria. Foram realizadas novamente provas de coagulação cujos resultados se apresentaram dentro dos parâmetros normais. Como foram detetadas algumas carraças, decidiu-se administrar um desparasitante externo PO (Bravecto®, MSD Saúde Animal). No quarto dia de internamento continuou-se a fazer o controlo do valor do hematócrito que subiu para 25%, a cor e consistência das fezes normalizou e já não se verificou hematúria nem bilirrubinúria.

No quinto dia de internamento do Lord no HVTM, parou-se a metilprednisolona e começou-se a administrar via PO prednisolona (Lepicortinolo® 20 mg, Angelini) numa dose de 2mg/kg. Ao sexto dia, com os parâmetros já devidamente normalizados, o animal teve alta médica, tendo regressado no dia 20 de janeiro para ser reavaliado e tomar a segunda dose de dipropionato de imidocarb (15 dias após a primeira dose).



Caso clínico nº2: Nilo

- **Identificação do animal**

O Nilo é um cão macho inteiro, sem raça definida, com aproximadamente 15 anos de idade e 28 kg, que se apresentou a uma consulta no dia 18 de março de 2017, no Hospital Veterinário de Trás-os-Montes em Vila Real.

- **Motivo da consulta/ Exame físico**

O animal foi apresentado à consulta por o proprietário referir que este se nos últimos dias se encontrava muito prostrado, tinha começado a comer menos e que tinha feito 2 vómitos após a refeição. Ao exame físico pôde-se verificar a prostração do animal, a temperatura encontrava-se aumentada (40,5°C), as mucosas rosadas, frequência cardíaca e respiratória normal, notando-se apenas algum desconforto à palpação abdominal.

- **Diagnósticos diferenciais**

- Pancreatite;
- Massa abdominal (possibilidade de ser tumoral);
- Babesiose canina

- **Exames complementares**

Uma vez que o animal apresentava um historial clínico de pancreatites recorrentes, procedeu-se a recolha de uma amostra de sangue para realização de hemograma, perfil bioquímico completo com lípase incluída e esfregaço sanguíneo, cujos resultados estão expostos nas tabelas 9 e 10 respetivamente.



Tabela 9: Resultados do hemograma do Nilo obtidos no dia de entrada no HVTM (18/03/2017). Os parâmetros alterados encontram-se assinalados a vermelho.

Parâmetros	Resultados	Valores de referência
Leucócitos (m/mm ³)	15,3	6,0 - 17,0
Linfócitos (m/mm ³)	0,3	0,6 - 5,1
Eritrócitos (m/mm ³)	7,1	5,5 - 8,5
Htc (%)	42,3	35 - 55
Hemoglobina (g/dl)	15,8	10,0 - 18,0
Plaquetas (m/mm ³)	160	120 - 600

Tabela 10: Resultados da bioquímica sérica do Nilo no dia de entrada no HVTM (18/03/2017). Os parâmetros alterados encontram-se assinalados a vermelho.

Parâmetros	Resultados	Valores de referência
Glucose (mg/dl)	107	75 - 128
Ureia (mg/dl)	18,9	9,2 - 29,2
Creatinina (mg/dl)	1,0	0,4 - 1,4
Bilirrubina (mg/dl)	0,4	0,1 - 0,5
ALT (U/l)	32	17 - 44
ALP (U/l)	77	13 - 83
GPT (U/l)	56	17 - 78
Albumina (g/dl)	3,4	2,6 - 4
Triglicédeos (mg/dl)	31	30 - 133
Lipase (U/l)	47	10 - 160 U/l

Não se verificaram alterações com significado clínico para além de uma ligeira linfopenia. No esfregaço sanguíneo, realizado a partir do buffy-coat, também não foram observadas quaisquer formas intra ou extraeritrocitárias sugestivas de hemoparasitas.



Figura 18: Esfregaço de buffy-coat. Colheita realizada no 1º dia de internamento do Nilo no HVTM (18/03/2017).

Na ausência de qualquer alteração a nível hematológico e bioquímico, e como o animal apresentava no exame físico algum desconforto abdominal, foi proposta a realização de uma ecografia abdominal para avaliação do trato gastrointestinal e pesquisa de massas tumorais que pudessem estar na origem da sintomatologia. Ecograficamente não se verificaram alterações.

- **Tratamento e Monitorização**

Devido ao quadro clínico do Nilo, foi iniciada fluidoterapia (duas vezes a taxa de manutenção), uma vez que este se encontrava muito prostrado e não se alimentava. Uma vez que apresentava história de vômito e toda a sintomatologia envolvente era muito vaga, decidiu-se aplicar um antibiótico, cefazolina IV TID (20 mg/kg) e ranitidina (Zantac®, GlaxoSmithLine) a uma dose de 0,56 ml IV BID.

Durante o primeiro dia de internamento, foi feito um controlo da temperatura do animal a cada 2h, não se verificando qualquer melhoria, tendo rondado sempre os 40°C. Continuou com anorexia, bebendo apenas e urinando normalmente.



No segundo dia de internamento, ao realizar-se o exame físico do animal, verificou-se que a temperatura corporal continuava aumentada (40,8°C), O animal continuava com anorexia, verificou-se palidez das mucosas, e a urina que se encontrou de manha era mais escura (hematúria e anemia). Foi medido novamente o valor de hematócrito tendo-se verificado uma descida para os 34%.



Figura 19: Urina colhida na manha do 2º dia de internamento do Nilo evidenciando uma marcada hematúria (19/03/2017).

Foi proposta a realização de um teste rápido de imunocromatografia (Snap 4 DX®, Servive) para deteção de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Dirofillaria immitis* e *Borrelia burgdorferi*, obtendo-se um resultado negativo para estas hemoparasitoses. Repetiu-se o esfregaço sanguíneo de buffy-coat, no qual foi possível observar piroplasmas de *Babesia*.

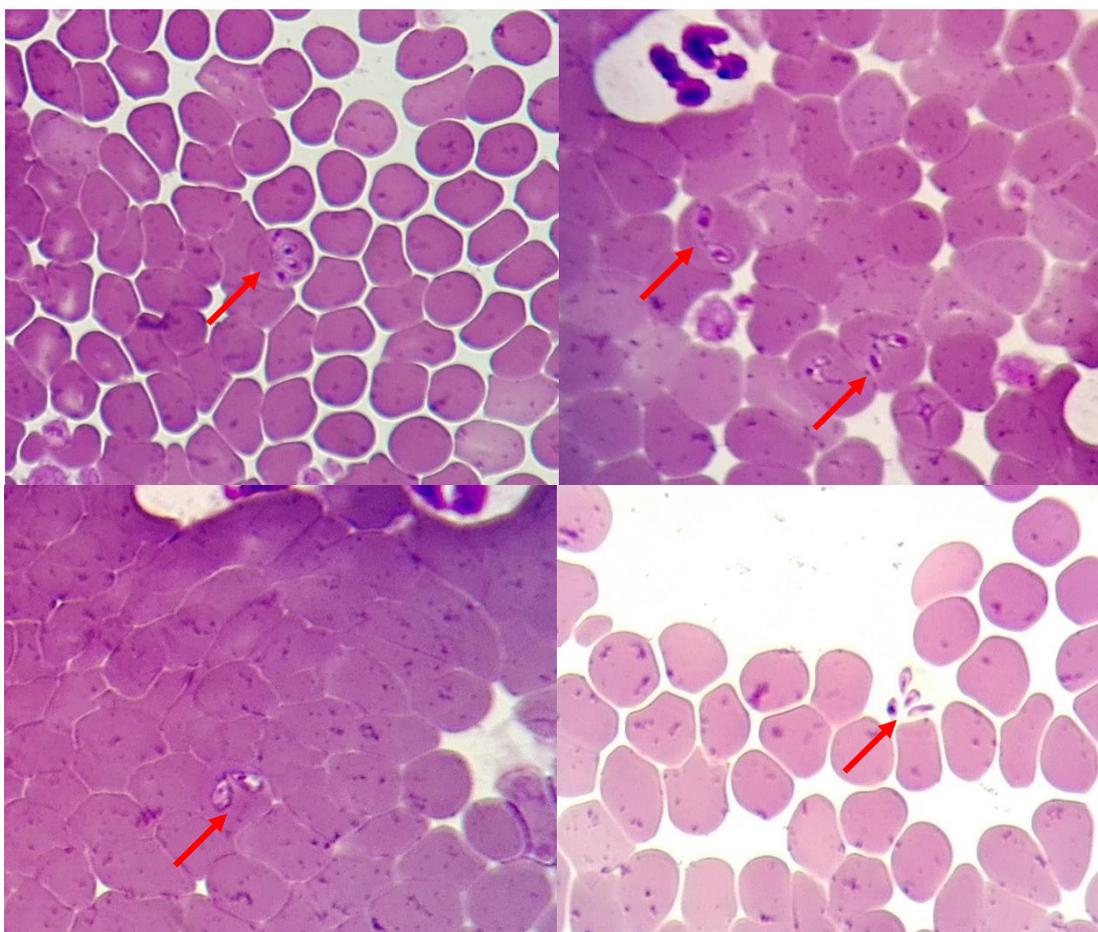


Figura 20: Esfregaço de buffy-coat. Colheita realizada no 2º dia de internamento do Nilo no HVTM (19/03/2017). Observação de merozoítos de Babesia intra e extraeritrocitários.

Chegando-se assim a um diagnóstico definitivo, começou-se de imediato o tratamento anti-protozoário, tendo-se administrado a primeira dose de dipropionato de imidocarb, 1,85 ml via SC (6,6 mg/kg). Ao terceiro dia de internamento o animal melhorou consideravelmente, tendo começado a comer, a cor da urina normalizado, bem como a temperatura corporal. O animal teve alta médica no dia 21 de março de 2017. No dia 4 de abril de 2017, o Nilo voltou ao HVTM para reavaliação e para a segunda administração de dipropionato de imidocarb (15 após a primeira dose).



Caso clínico nº3: Jamaica

- **Identificação do animal**

A Jamaica é uma cadela, não esterilizada, sem raça definida, com aproximadamente 3 anos de idade e 18 kg, que se apresentou a uma consulta no dia 10 de abril de 2017, no Hospital Veterinário de Trás-os-Montes em Vila Real.

- **Motivo da consulta/ Exame físico**

O proprietário do animal apresentou-se no HVTM referindo ser uma situação de urgência médica depois de, subitamente, a Jamaica ter ficado muito prostrada, havendo suspeita de ocorrência de rutura de baço, uma vez que, por ser um animal usado no pastoreio, está sujeito a um grande esforço físico. A Jamaica encontrava-se visivelmente apática, com a frequência cardíaca e respiratória aumentada, mucosas muito pálidas e a temperatura corporal elevada (40,3°C).

- **Diagnósticos diferenciais**

- Rutura de baço;
- Massa tumoral no baço;
- Ingestão de tóxicos;
- Babesiose canina;
- Outras hemoparasitoses;

- **Exames complementares**

Dada a urgência da situação, foi realizado de imediato uma ecografia abdominal para avaliar a integridade do baço, que se verificou estar normal. Foi colhida uma amostra de sangue para avaliação do valor de microhematócrito, hemograma, perfil bioquímico, esfregaço de buffy-coat e realização de um teste rápido de imunocromatografia (Snap 4 DX®, IDEXX).



Tabela 11: Resultados do hemograma da Jamaica obtidos no dia de entrada no HVTM (10/04/2017). Os parâmetros alterados encontram-se assinalados a vermelho.

Parâmetros	Resultados	Valores de referência
Leucócitos (m/mm ³)	6,56	6,0 - 17,0
Linfócitos (m/mm ³)	0,72	0,6 - 5,1
Eritrócitos (m/mm ³)	5,68	5,5 - 8,5
Htc (%)	20	35 - 55
Hemoglobina (g/dl)	6	10,0 - 18,0
Plaquetas (m/mm ³)	40	120 - 600

Tabela 12: Resultados da bioquímica sérica da Jamaica no dia de entrada no HVTM (10/04/2017). Os parâmetros alterados encontram-se assinalados a vermelho.

Parâmetros	Resultados	Valores de referência
Glucose (mg/dl)	114	75 - 128
Ureia (mg/dl)	14,3	9,2 - 29,2
Creatinina (mg/dl)	0,7	0,4 - 1,4
Bilirrubina (mg/dl)	0,7	0,1 - 0,5
ALT (U/l)	+ 2000	17 - 44
ALP (U/l)	112	13 - 83
GPT (U/l)	+ 2000	17 - 78
Albumina (g/dl)	3,5	2,6 - 4
Proteínas totais (mg/dl)	7,8	5,0 - 7,2

Verificou-se que o valor de microhematócrito se encontrava diminuído (20%) e o teste rápido mostrou-se negativo para as quatro hemoparasitoses testadas. No entanto, na observação do esfregaço sanguíneo foi visível a presença e piroplasmas de *Babesia*, não se verificando micro nem macro aglutinação.

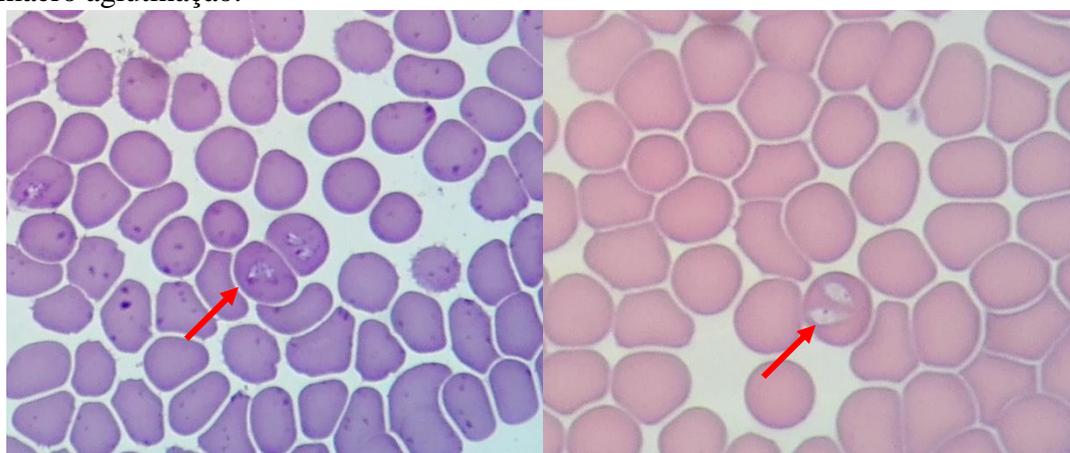


Figura 21: Esfregaço de buffy-coat. Colheita realizada no 1º dia de internamento da Jamaica no HVTM (10/04/2017). Observação de merozoítos de *Babesia* intraeritrocitários.



- **Tratamento e Monitorização**

Depois de se ter obtido um diagnóstico definitivo, começou-se de imediato o tratamento anti-protozoário, tendo-se administrado a primeira dose de dipropionato de imidocarb, 1,18 ml via SC (6,6 mg/kg).

No segundo dia de internamento, a Jamaica continuava muito apática, com anorexia, tendo a temperatura diminuído ao longo do segundo dia e o microhematócrito subido apenas 2% (22%).

No terceiro dia de internamento, a temperatura corporal normalizou, começou a comer aos poucos e o microhematócrito subiu para os 27%. No entanto, verificou-se que a Jamaica se apresentava atáxica e com nistagmos horizontal, sugerindo haver envolvimento do SNC neste caso, tendo-se por isso começado com a administração via PO de prednisolona BID (Lepicortinolo® 20 mg, Angelini), juntamente com um protetor gástrico.

No quarto dia de internamento da Jamaica, o quadro de ataxia e incoordenação motora mantinha-se, tendo-se posto a hipótese de haver uma babesiose cerebral. Para tal, seria necessário fazer uma recolha de líquido cefalorraquidiano mas, mais uma vez, devido ao reduzido orçamento, não foi possível a confirmação. A Jamaica acabou por ter alta condicionada no dia 14 de abril de 2017. No dia 28 de abril de 2017, a Jamaica voltou ao HVTM para reavaliação e para a segunda administração de dipropionato de imidocarb (15 após a primeira dose). Esta tinha melhorado consideravelmente, não apresentando qualquer sintomatologia neurológica, tendo-se repetido esfregaço sanguíneo no qual não se observaram piroplasmas de *Babesia*.

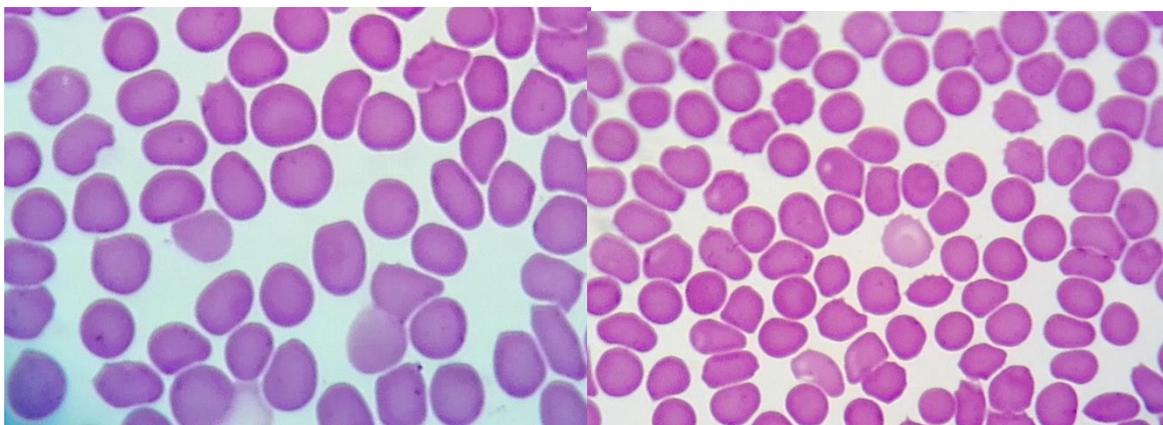


Figura 22: Esfregaço de buffy-coat. Colheita realizada no dia de reavaliação da Jamaica no HVTM (28/04/2017).



DISCUSSÃO

A babesiose canina é uma doença que aparenta estar maioritariamente disseminada pelo Norte e Centro o território nacional, sendo bastante frequente na região de Trás-os-Montes e Alto Douro, Beira Litoral e Beira Alta.

Durante o período de 7 meses de estágio por mim realizado na área de clínica de animais de companhia, observei o acompanhamento clínico de vários casos de babesiose canina, sendo que escolhi 3 que se destacavam. Todos os casos observados e relatados foram acompanhados no Hospital Veterinário de Trás-os-Montes em Vila Real, uma vez que na zona do Douro Litoral (Vila Nova de Gaia) não é comum o aparecimento deste tipo de casos.

De entre os 21 casos suspeitos de babesiose canina, 14 deles (66,7%) eram representativos desta doença, sendo num dos casos havia concomitância de *Ehrlichia canis*, confirmada através de um teste rápido de imunocromatografia. Dos 21 casos, 19,0% correspondiam a infeções por *Ehrlichia canis* e 14,3% correspondiam a infeções por *Anaplasma platys*.

De entre os 14 casos de babesiose canina confirmados, o número absoluto de machos com a doença (64,3%) foi maior relativamente ao número absoluto de fêmeas doentes (35,7%). Em estudos prévios esta percentagem foi variável. (Furlanello et al., 2005; L. Solano-Gallego et al., 2008)

Uma vez que, a região de Trás-os-Montes e Alto Douro é bastante propensa e ativa na área da caça, os canídeos mais predispostos a esta doença, cujos casos foram acompanhados, eram cães de gado transmontado (35,7%), muito usados no pastoreio, cães com aptidão para caça como podengos e perdigueiros portugueses (42,9%) entre outros sem raça definida (21,4%) (Bourdoiseau, 2006; Furlanello et al., 2005; L. Solano-Gallego et al., 2008). Estas percentagens devem-se principalmente pelo facto de estes animais habitarem e terem atividades principalmente de exterior, como a caça, deixando-os mais expostos aos vetores. Outro fator, é a falta de informação por parte de proprietários a nível dos corretos protocolos de desparasitação externa, o que deixa os cães mais vulneráveis. O maior número de casos observados (11) decorreu no período de março a abril representando uma percentagem de 78,57%. Esta ocorrência deve-se às perfeitas condições climáticas para o desenvolvimento dos vetores de *Babesia* (Leschnik et al., 2008; Cardoso et al., 2010; Duscher et al., 2013).



Durante o acompanhamento destes casos a idade apresentou-se bastante variável entre os canídeos, variando entre os 4 meses até aos 15 anos de idade. Notou-se um maior volume de indivíduos, 57,1%, numa faixa etária até aos 5 anos de idade, o que poderá indicar que, indivíduos mais jovens estão mais predispostos a esta doença, uma vez que não apresentam um sistema imunitário tão desenvolvido (Bourdoiseau, 2006).

As manifestações clínicas evidenciadas nos três casos apresentados foram variadas e com gravidade diferente entre os animais, coincidindo com a diversidade e inespecificidade do quadro clínico, conforme o descrito na literatura científica.

O Nilo e a Jamaica foram trazidos à consulta devido à percepção por parte dos proprietários de um estado letárgico, com prostração, vômitos (no caso do Nilo) e anorexia. Esta sintomatologia coincide com as alterações mais comumente referidas pelos proprietários dos animais trazidos à consulta com diagnóstico positivo para babesiose canina (Cardoso et al., 2010; Furlanello et al., 2005). Estes sintomas estão presentes em quase todos os casos observados, representando uma percentagem avultada de 96,4%. Este valor torna-se compatível com o de Solano-Gallego et al. 2008, que nos apresenta percentagens na ordem dos 93%. A sintomatologia gastrointestinal (vômitos) foi aparentemente visível e motivo de vinda à consulta por parte de 50% dos casos acompanhados.

Para além destes sinais clínicos, todos os animais descritos nesta dissertação apresentavam na consulta uma temperatura corporal superior a 40°C. Este parâmetro representa uma percentagem de 85,7% no total de casos confirmados de babesiose sendo superior ao de estudos como os de Solano-Gallego et al. (2008), Furlanello et al. (2005) e Cardoso et al. (2010).

Nos três animais foram efetuadas as seguintes análises laboratoriais: bioquímica sérica, hemograma, teste rápido de imunocromatografia e esfregaço sanguíneo.

No que se refere aos resultados dos testes laboratoriais básicos foram detetadas as seguintes alterações nos parâmetros bioquímicos: alterações das enzimas hepáticas séricas nomeadamente GGT, ALT e fosfatase alcalina, hipoglicemia e bilirrubinemia, tendo estas sido descritas em vários outros estudos (Furlanello et al., 2005; Máthé et al., 2006; Zygnier et al. 2007),. Os animais em que foram detetadas alterações hepáticas significativas apresentavam icterícia generalizada, aumento da bilirrubina sérica e bilirrubinúria, não tendo



evoluído para estados de insuficiência hepática coincidente com os estudos de Furlanello et al. (2005) e Solano-Gallego et al. (2008). A hipoglicemia verificou-se em cerca de 52,3% dos casos, contudo foram alterações ligeiras, sem aparente significado clínico.

É de referir a ausência ou presença de ligeiras alterações (sem significado clínico aparente) dos parâmetros bioquímicos de avaliação da função renal, como ureia e creatinina, em todos os animais acompanhados

A análise hematológica revelou as seguintes alterações nos animais referidos no presente estudo: anemia, linfopenia (Vial & Gorenflot, 2006) e trombocitopenia. A anemia está presente na maioria dos animais que desenvolvem babesiose canina clínica, sendo a alteração hematológica mais frequente nesta doença (Boozer & Macintire, 2003). Dentro dos casos observados, 64,3% dos animais apresentavam palidez das mucosas (sinal clínico de anemia) e 35,7% apresentavam icterícia, por acumulação de bilirrubina nas mucosas, resultado da destruição dos glóbulos vermelhos, como no caso descrito do Lord (Furlanello et al., 2005; L. Solano-Gallego et al., 2008; Eichenberger et al., 2016). A anemia é um parâmetro bastante frequente na babesiose canina e que pode ser explicada pela hemólise existente, levando a quadros bilirrubinemia (35,7%) e bilirrubinúria com conseqüente pigmentúria. A percentagem de cães com pigmentúria (urina escura com presença de sangue ou bilirrubina) foi cerca de 28,6%, tendo sido um dos motivos de vinda à consulta do Lord.

Em 64,3% dos casos observou-se uma ligeira a moderada linfopenia, valor que se aproxima dos valores apresentados em estudos anteriores, sendo que em apenas 14,3% dos casos se verificou leucocitose, o correspondente a 2 casos em 14 (Furlanello et al., 2005; Eichenberger et al., 2016)

A trombocitopenia moderada a severa é um dado clínico frequentemente associado à babesiose canina, sendo um indicador de mau prognóstico quando é severa (Zygner et al., 2007; Solano-Gallego et al., 2008). A diminuição do volume plaquetário é conseqüência da destruição das plaquetas por processos imunomediados e pelo seu sequestro no baço (Boozer & Macintire, 2003). Dos 3 casos apresentados, apenas a Jamaica apresentava trombocitopenia, fazendo parte de uma percentagem de 21,4%

Na observação dos esfregaços sanguíneos foi possível o diagnóstico para babesiose canina logo no primeiro dia de consulta



CONCLUSÃO

A babesiose canina é uma patologia importante na clínica de animais de companhia na região de Trás-os-Montes e Alto Douro e da Beira Alta que tem vindo a ganhar algum impacto na população uma vez que o animal passou a representar um papel importante na sociedade devido ao seu estatuto.

Esta é uma doença que afeta principalmente animais jovens, que nestas regiões do país são usados na prática do pastoreio de rebanhos e da caça, não existindo uma predisposição marcada para fêmeas ou machos.

O diagnóstico de babesiose canina em Portugal baseia-se essencialmente na observação de piroplasmas por microscopia ótica em esfregaço de sangue periférico (orelha) ou então de esfregaço de buffy-coat.

A sintomatologia que se encontra normalmente associada a esta doença reúne sinais clínicos como a apatia, anorexia, febre e palidez das mucosas, havendo por vezes casos de icterícia marcada como foi possível de observar nos casos abordados.

O protocolo terapêutico utilizado consistiu essencialmente no uso de duas doses intervaladas por 15 dias de dipropionato de imidocarb (Imizol®) e um bom tratamento de suporte baseado em fluidoterapia e transfusões sanguíneas.

Como a região em que foram detetados a totalidade dos casos é considerada endémica para a babesiose, a melhor maneira de evitar que tal aconteça passa por uma boa prevenção. Sendo assim, é importante eliminar a possibilidade da exposição ao vetor (as carraças) com o uso de antiparasitários externos como os *spot-on*, sprays, coleiras ou mais recentemente as formulações orais de fluralaner.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adachi, K., Tateishi, M., Horii, Y., Nagatomo, H., Shimizu, T., & Makimura, S. (1995). Immunologic characteristics of anti-erythrocyte membrane antibody produced in dogs during *Babesia gibsoni* infection. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 57(1), 121–123.
- Adaszek, L., Obara-Galek, J., Piech, T., Winiarczyk, M., Kalinowski, M., & Winiarczyk, S. (2016). Possible vertical transmission of *Babesia canis canis* from a bitch to her puppies: A case report. *Veterinarni Medicina*, 61(5), 263–266.
- Apanaskevich, D. A., Horak, I. G., & Camicas, J. L. (2007). Redescription of *Haemaphysalis* (*Rhipistoma*) *elliptica* (Koch, 1844), an old taxon of the *Haemaphysalis* (*Rhipistoma*) *leachi* group from East and southern Africa, and of *Haemaphysalis* (*Rhipistoma*) *leachi* (Audouin, 1826) (Ixodida, Ixodidae). *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 74(3), 181–208.
- Ayoob, A. L., Hackner, S. G., & Prittie, J. (2010). Clinical management of canine babesiosis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 20(1), 77–89.
- Babes, V. (1888). Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences., 107.
- Balch, A., & Mackin, A. (2007). Canine immune-mediated hemolytic anemia: pathophysiology, clinical signs, and diagnosis. *Compendium (Yardley, PA)*, 29(4), 217–225.
- Baneth, G., Florin-Christensen, M., Cardoso, L., & Schnittger, L. (2015). Reclassification of *Theileria annae* as *Babesia vulpes* sp. nov. *Parasites & Vectors*, 8(1), 207.
- Beck, R., Vojta, L., Mrljak, V., Marinculic, A., Beck, A., Zivicnjak, T., & Caccio, S. M. (2009). Diversity of *Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. *International Journal for Parasitology*, 39(7), 843–848.
- Berrada, Z. (2009). Burden of tick-borne infections on American companion animals, 24(4), 175–181.



- Birkenheuer, A. J., Correa, M. T., Levy, M. G., & Breitschwerdt, E. B. (2005). 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*, 227(6), 942–947.
- Birkenheuer, A. J., Levy, M. G., & Breitschwerdt, E. B. (2004). Efficacy of combined atovaquone and azithromycin for therapy of chronic *Babesia gibsoni* (Asian genotype) infections in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 18(4), 494–498.
- Birkenheuer, A. J., Levy, M. G., & Breitschwerdt, E. B. (2017). Development and Evaluation of a Seminested PCR for Detection and Differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian Genotype ... Development and Evaluation of a Seminested PCR for Detection and Differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian Genotype) and, 41(March), 4172–4177.
- Birkenheuer, A. J., Levy, M. G., Savary, K. C., Gager, R. B., & Breitschwerdt, E. B. (1999). *Babesia gibsoni* infections in dogs from North Carolina. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 35(2), 125–128.
- Birkenheuer, A. J., Levy, M. G., Stebbins, M., Poore, M., & Breitschwerdt, E. (2015). Serosurvey of anti*Babesia* antibodies in stray dogs and American pit bull terriers and American staffordshire terriers from North Carolina. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 39(6), 551–557.
- Böhm, M., Leisewitz, A. L., Thompson, P. N., & Schoeman, J. P. (2006). Capillary and venous *Babesia canis rossi* parasitaemias and their association with outcome of infection and circulatory compromise. *Veterinary Parasitology*, 141(1–2), 18–29.
- Bone, R., Balk, R., Cerra, F., Dellinger, R., Fein, A., Knaus, W., ... Sibbald, W. (1992). acplscm consensus conference for Sepsis and Organ Failure and. *Chest*, 101, 1644–1655.
- Boonchit, S., Xuan, X., Yokoyama, N., Goff, W. L., Wagner, G., & Igarashi, I. (2002). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant rho-try-associated protein 1 antigen against *Babesia bovis* for the detection of specific antibodies in cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(10), 3771–3775.



- Boozer, A. L., & Macintire, D. K. (2003). Canine babesiosis. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 33(4), 885–904, viii.
- Bose, R., Jacobson, R. H., Gale, K. R., Waltisbuhl, D. J., & Wright, I. G. (1990). An improved ELISA for the detection of antibodies against *Babesia bovis* using either a native or a recombinant *B. bovis* antigen. *Parasitology Research*, 76(8), 648–652.
- Bose, R., & Peymann, B. (1994). Diagnosis of *Babesia caballi* infections in horses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and western blot. *International Journal for Parasitology*, 24(3), 346–347.
- Bourdoiseau, G. (2006). Canine babesiosis in France. *Veterinary Parasitology*, 138(1–2), 118–125.
- Boustani, M. (1996). State-of-the-art clinical article - Strongyloidiasis. *Clinical Infectious Diseases*, 23(February), 949–953.
- Brandão, L. P., Hagiwara, M. K., & Myiashiro, S. I. (2003). Humoral immunity and reinfection resistance in dogs experimentally inoculated with *Babesia canis* and either treated or untreated with imidocarb dipropionate. *Veterinary Parasitology*, 114(4), 253–265.
- Brandt, F., Healy, G. R., & Welch, M. (1977). Human Babesiosis: The Isolation of *Babesia microti* in Golden Hamsters. *The Journal of Parasitology*, 63(5), 934–937.
- Brianti, E., Pennisi, M. G., & Lombardo, G. (2010). Efficacy of the fipronil 10 % + (S) - methoprene 9 % combination against *Rhipicephalus sanguineus* in naturally infested dogs ... *Veterinary Parasitology*, (February).
- BurrIDGE, M. J., Kimber, C. D., & McHardy, N. (1973). Detection of antibodies to *Babesia bigemina* in dried blood samples using the indirect fluorescent antibody test. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 67(2), 191–195.
- Buttner. (1968). *Origins of Algae and their Plastids*. Springer Vienna. Retrieved from <https://books.google.pt/books?id=gfTrCAAQBAJ>



- Cacciò, S. M., Antunovic, B., Moretti, A., Mangili, V., Marinculic, A., Baric, R. R., ... Pieniazek, N. J. (2002). Molecular characterisation of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* from naturally infected European dogs. *Veterinary Parasitology*, *106*(4), 285–292.
- Camacho, A. T., Guitián, F. J., Pallas, E., Gestal, J. J., Olmeda, A. S., Goethert, H. K., & Telford, S. R. (2001). Infection of dogs in north-west Spain with a *Babesia microti*-like agent. *Veterinary Record*, *149*(18), 552 LP-555.
- Camacho, A. T., Pallas, E., Gestal, J. J., Guitian, F. J., Olmeda, A. S., Telford, S. R., & Spielman, A. (2003). *Ixodes hexagonus* is the main candidate as vector of *Theileria annae* in northwest Spain. *Veterinary Parasitology*, *112*(1–2), 157–163.
- Cao, S., Mousa, A. A., Aboge, G. O., Kamyngkird, K., Zhou, M., Franck, P., ... Xuan, X. (2013). Prime-boost vaccination with plasmid DNA followed by recombinant vaccinia virus expressing BgGARP induced a partial protective immunity to inhibit *Babesia gibsoni* proliferation in dogs, *58*(4), 619–623.
- Cardoso, L., Yisaschar-Mekuzas, Y., Rodrigues, F. T., Costa, A., Machado, J., Diz-Lopes, D., & Baneth, G. (2010). Canine babesiosis in northern Portugal and molecular characterization of vector-borne co-infections. *Parasites & Vectors*, *3*(1), 27.
- Carli, E., Tasca, S., Trotta, M., Furlanello, T., Caldin, M., & Solano-Gallego, L. (2009). Detection of erythrocyte binding IgM and IgG by flow cytometry in sick dogs with *Babesia canis canis* or *Babesia canis vogeli* infection. *Veterinary Parasitology*, *162*(1–2), 51–57.
- Carret, C., Walas, F., Carcy, B., Grande, N., Precigout, E., Moubri, K., ... Gorenflot, A. (1999). *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, *46*(3), 298–303.
- Chaudhuri, S., & Varshney, J. P. (2007). Clinical management of babesiosis in dogs with homeopathic *Crotalus horridus* 200C. *Homeopathy*, *96*(2), 90–94.



- Chisholm, E. S., Ruebush, T. K. 2nd, Sulzer, A. J., & Healy, G. R. (1978). Babesia microti infection in man: evaluation of an indirect immunofluorescent antibody test. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 27(1 Pt 1), 14–19.
- Dantas-Torres, F. (2010). Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & Vectors*, 3, 26.
- Davitkov, D., Vucicevic, M., Stevanovic, J., Krstic, V., Tomanovic, S., Glavinic, U., & Stanimirovic, Z. (2015). Clinical babesiosis and molecular identification of Babesia canis and Babesia gibsoni infections in dogs from Serbia. *Acta Veterinaria Hungarica*, 63(2), 199–208.
- de Scally, M. P., Leisewitz, A. L., Lobetti, R. G., & Thompson, P. N. (2006). The elevated serum urea:creatinine ratio in canine babesiosis in South Africa is not of renal origin. *Journal of the South African Veterinary Association*, 77(4), 175–178.
- Di Cicco, M. F., Downey, M. E., Beeler, E., Marr, H., Cyrog, P., Kidd, L., ... Birkenheuer, A. J. (2012). Re-emergence of Babesia conradae and effective treatment of infected dogs with atovaquone and azithromycin. *Veterinary Parasitology*, 187(1–2), 23–27.
- Donghyun, H., Won-Kyoung, Y., & Changbaig, H. (2014). Cerebellar encephalopathy from diminazene aceturate (beneril) toxicity in a dog. *Korean Journal of Veterinary Research*, 54(3), 193–196.
- Driehuys, S., Van Winkle, T. J., Sammarco, C. D., & Drobatz, K. J. (1998). Myocardial infarction in dogs and cats: 37 cases (1985-1994). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 213(10), 1444–1448.
- Duscher, G. G., Feiler, A., Leschnik, M., & Joachim, A. (2013). Seasonal and spatial distribution of ixodid tick species feeding on naturally infested dogs from Eastern Austria and the influence of acaricides/repellents on these parameters. *Parasites & Vectors*, 6(1), 76.
- Dvir, E., Lobetti, R. G., Jacobson, L. S., Pearson, J., & Becker, P. J. (2004). Electrocardiographic changes and cardiac pathology in canine babesiosis. *Journal of Veterinary Cardiology*, 6(1), 15–23.



- Eichenberger, R. M., Riond, B., Willi, B., & Deplazes, P. (2016). Prognostic Markers in Acute Babesia canis Infections, 174–182.
- Falkenö, U., Tasker, S., Osterman-Lind, E., & Tvedten, H. W. (2013). Theileria annae in a young Swedish dog. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55(1), 50.
- Feldman, E. C., & Ettinger, S. J. (1977). Electrocardiographic changes associated with electrolyte disturbances. *The Veterinary Clinics of North America*, 7(3), 487–496.
- Fernandes, E. K. K., & Bittencourt, V. R. E. P. (2008). Entomopathogenic fungi against South American tick species. *Experimental & Applied Acarology*, 46(1–4), 71–93.
- Földvári, G., & Farkas, R. (2005). Ixodid tick species attaching to dogs in Hungary. *Veterinary Parasitology*, 129(1–2), 125–131.
- FRERICHS, W. M., & HOLBROOK, A. A. (1974). Feeding Mechanisms of *Babesia equi*. *The Journal of Protozoology*, 21(5), 707–709.
- Fukumoto, S. (2007). Prime-boost immunization with DNA followed by a recombinant vaccinia virus expressing P50 induced protective immunity ..., (June).
- Fukumoto, S., Sekine, Y., Xuan, X., Igarashi, I., Sugimoto, C., Nagasawa, H., ... Suzuki, H. (2004). Serodiagnosis of canine Babesia gibsoni infection by enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant P50 expressed in Escherichia coli. *The Journal of Parasitology*, 90(2), 387–391.
- Fukumoto, S., Suzuki, H., Igarashi, I., & Xuan, X. (2005). Fatal experimental transplacental Babesia gibsoni infections in dogs. *International Journal for Parasitology*, 35(9), 1031–1035.
- Fukumoto, S., Tamaki, Y., Igarashi, I., Suzuki, H., & Xuan, X. (2009). Immunogenicity and growth inhibitory efficacy of the prime-boost immunization regime with DNA followed by recombinant vaccinia virus carrying the P29 gene of Babesia gibsoni in dogs. *Experimental Parasitology*, 123(4), 296–301.



- Fukumoto, S., Xuan, X., Shigeno, S., Kimbita, E., Igarashi, I., Nagasawa, H., ... Mikami, T. (2001). Development of a polymerase chain reaction method for diagnosing *Babesia gibsoni* infection in dogs. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 63(9), 977–981.
- Furlanello, T., Fiorio, F., Caldin, M., Lubas, G., & Solano-Gallego, L. (2005). Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form *Babesia* from dogs of northeastern Italy. *Veterinary Parasitology*, 134(1), 77–85.
- Gabrielli, S., Otašević, S., Ignjatović, A., Savić, S., Fraulo, M., Arsić-Arsenijević, V., ... Cancrini, G. (2015). Canine Babesiosis in Noninvestigated Areas of Serbia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 15(9), 535–538.
- Garcia, A. T. C. (2006). Piroplasma infection in dogs in northern Spain. *Veterinary Parasitology*, 138(1–2), 97–102.
- Gorenflot, A., Moubri, K., Precigout, E., Carcy, B., & Schetters, T. P. (1998). Human babesiosis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 92(4), 489–501.
- Grundy, S. A., & Barton, C. (2001). Influence of drug treatment on survival of dogs with immune-mediated hemolytic anemia: 88 cases (1989-1999). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 218(4), 543–546.
- Halos, L., Baneth, G., Beugnet, F., Bowman, A. S., Chomel, B., & Farkas, R. (2012). Defining the concept of “ tick repellency ” in veterinary medicine, (iii), 419–423.
- Hansford, K. M., Pietzsch, M. E., Cull, B., & Medlock, J. M. (2014). Importation of *R. sanguineus* into the UK via dogs. *Veterinary Record*, 175(15), 385 LP-386.
- Harris, S., & Thompson, G. B. (2009). Populations of the ticks *Ixodes (Pholeoixodes) hexagonus* and *Ixodes (Pholeoixodes) canisuga* infesting suburban foxes, *Vulpes vulpes*. *Journal of Zoology*, 186(1), 83–93.
- Häselbarth, K., Tenter, A. M., Brade, V., Krieger, G., & Hunfeld, K. P. (2007). First case of human babesiosis in Germany - Clinical presentation and molecular characterisation of the pathogen. *International Journal of Medical Microbiology*, 297(3), 197–204.



- Hatta, T., Matsubayashi, M., Miyoshi, T., Islam, M. K., Alim, M. A., Anisuzzaman, ... Tsuji, N. (2013). Quantitative PCR-based parasite burden estimation of *Babesia gibsoni* in the vector tick, *Haemaphysalis longicornis* (acari: Ixodidae), fed on an experimentally infected dog. *Journal of Veterinary Medical Science*, 75(1), 1–6.
- Hildebrandt, A., Tenter, A. M., Straube, E., & Hunfeld, K. P. (2008). Human babesiosis in Germany: Just overlooked or truly new? *International Journal of Medical Microbiology*, 298(SUPPL. 1), 336–346.
- Homer, M. J., Aguilar-Delfin, I., Telford, S. R., Krause, P. J., & Persing, D. H. (2000). Babesiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(3), 451–469.
- Ikadai, H., Osorio, C. R., XueNan, X., Igarashi, I., Kanemaru, T., Nagasawa, H., ... Mikami, T. (2000). Detection of *Babesia caballi* infection by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant 48-kDa merozoite rhoptry protein. *International Journal for Parasitology*, 30(5), 633–635.
- Inokuma, H., Yoshizaki, Y., Matsumoto, K., Okuda, M., Onishi, T., Nakagome, K., ... Hirakawa, M. (2004). Molecular survey of *Babesia* infection in dogs in Okinawa, Japan. *Veterinary Parasitology*, 121(3–4), 341–346.
- Irwin, P., & Hutchinson, G. (1991). Clinical and pathological findings of *Babesia* infection in dogs. *Australian Veterinary Journal*, 68(6), 204–209.
- Irwin, P. J. (2009). Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasites & Vectors*, 2(Suppl 1),
- Iwakami, S., Ichikawa, Y., & Inokuma, H. (2014). Molecular survey of *Babesia gibsoni* using *Haemaphysalis longicornis* collected from dogs and cats in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 76(9), 1313–6.
- Jacobson, L. S. (1994). Cerebellar ataxia as a possible complication of babesiosis in two dogs. *Journal of the South African Veterinary Association*, 65(3), 130–131.
- Jacobson, L. S. (2006). The South African form of severe and complicated canine babesiosis: Clinical advances 1994–2004. *Veterinary Parasitology*, 138(1–2), 126–139.



- Jacobson, L. S., & Clark, I. A. (1994). The pathophysiology of canine babesiosis: new approaches to an old puzzle. *Journal of the South African Veterinary Association*, 65(3), 134–145.
- Jacobson, L. S., Lobetti, R. G., & Vaughan-Scott, T. (2000). Blood pressure changes in dogs with babesiosis. *Journal of the South African Veterinary Association*, 71(1), 14–20.
- Jacobson, L. S., & Swan, G. E. (1995). Supportive treatment of canine babesiosis. *Journal of the South African Veterinary Association*, 66(2), 95–105.
- Jefferies, R., Ryan, U. M., & Irwin, P. J. (2007). PCR–RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. *Veterinary Parasitology*, 144(1–2), 20–27.
- Jefferies, R., Ryan, U., & Robertson, I. D. (2016). Babesia gibsoni : Detection during experimental infections and after combined atovaquone and azithromycin therapy Babesia gibsoni : Detection during experimental infections and after combined atovaquone and azithromycin therapy, (November 2007).
- Jongejan, F., Ringenier, M., Putting, M., Berger, L., Burgers, S., Kortekaas, R., ... Madder, M. (2015). Novel foci of Dermacentor reticulatus ticks infected with Babesia canis and Babesia caballi in the Netherlands and in Belgium. *Parasites & Vectors*, 8(1), 232.
- Karakashian, S. J., Rudzinska, M. A., Spielman, A., Lewengrub, S., Piesman, J., & Shoukrey, N. (1983). Ultrastructural studies on sporogony of Babesia microti in salivary gland cells of the tick Ixodes dammini. *Cell and Tissue Research*, 231(2), 275–287.
- Karp, C. L., & Auwaerter, P. G. (2007). Coinfection with HIV and Tropical Infectious Diseases . II . Helminthic , Fungal , Bacterial , and Viral Pathogens. *Clinical Infectious Diseases*, 45, 1214–20.
- Kettner, F., Reyers, F., & Miller, D. (2003). Thrombocytopaenia in canine babesiosis and its clinical usefulness. *Journal of the South African Veterinary Association*, 74(3), 63–68.
- Kidd, L., & Mackman, N. (2013). Prothrombotic mechanisms and anticoagulant therapy in dogs with immune-mediated hemolytic anemia. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 23(1), 3–13.



- Kjemtrup, A. M., & Conrad, P. A. (2000). Human babesiosis: An emerging tick-borne disease. *International Journal for Parasitology*, 30(12–13), 1323–1337.
- Kjemtrup, A. M., & Conrad, P. A. (2006). A review of the small canine piroplasms from California: *Babesia conradae* in the literature. *Veterinary Parasitology*, 138(1–2), 112–117.
- Kjemtrup, A. M., Wainwright, K., Miller, M., Penzhorn, B. L., & Carreno, R. A. (2006). *Babesia conradae*, sp. Nov., a small canine *Babesia* identified in California. *Veterinary Parasitology*, 138(1), 103–111.
- Köster, L. S., Lobetti, R. G., & Kelly, P. (2015). Canine babesiosis : a perspective on clinical complications , biomarkers , and treatment. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 119–128.
- Kraje, A. C. (2001). Haemobartonellosis and Babesiosis. *Prevention*, 23(4), 1–8.
- Krause, P. J., Daily, J., Telford, S. R., Vannier, E., Lantos, P., & Spielman, A. (2017). Shared features in the pathobiology of babesiosis and malaria. *Trends in Parasitology*, 23(12), 605–610.
- Kreir, J. (2012). *Babesia, Theileria, Myxosporida, Microsporida, Bartonellaceae, Anaplasmataceae, Ehrlichia, and Pneumocystis*. Elsevier Science. Retrieved from <https://books.google.pt/books?id=0Vw5LxeI9XkC>
- Lane, A. N., Jenkins, T. C., Brown, T., & Neidle, S. (1991). Interaction of berenil with the EcoRI dodecamer d(CGCGAATTCGCG)₂ in solution studied by NMR. *Biochemistry*, 30(5), 1372–1385.
- Last, R. D., Hill, J. M., & Matjila, P. T. (2007). A field trial evaluation of the prophylactic efficacy of amitraz-impregnated collars against canine babesiosis (*Babesia canis rossi*) in South Africa, 78, 63–65.
- Lee, M.-J., Yu, D.-H., Yoon, J.-S., Li, Y.-H., Lee, J.-H., Chae, J.-S., & Park, J. (2009). Epidemiologic and clinical surveys in dogs infected with *Babesia gibsoni* in South Korea. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, 9(6), 681–686.



- Leisewitz, A. L., Guthrie, A. J., & Berry, W. L. (1996). Evaluation of the effect of whole-blood transfusion on the oxygen status and acid-base balance of *Babesia canis* infected dogs using the oxygen status algorithm. *Journal of the South African Veterinary Association*, 67(1), 20–26.
- Leisewitz, A. L., Jacobson, L. S., de Moraes, H. S., & Reyers, F. (2001). The mixed acid-base disturbances of severe canine babesiosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 15(5), 445–452.
- Leschnik, M., Kirtz, G., Tichy, A., & Leidinger, E. (2008). Seasonal occurrence of canine babesiosis is influenced by local climate conditions. *International Journal of Medical Microbiology*, 298(SUPPL. 1), 243–248.
- Lin, C., & Su, B. (2011). The therapeutic efficacy of two antibabesial strategies against *Babesia gibsoni*. *Veterinary Parasitology*, 186(3–4), 159–164.
- Lin, M.-Y., & Huang, H.-P. (2010). Use of a doxycycline-enrofloxacin-metronidazole combination with/without diminazene diaceturate to treat naturally occurring canine babesiosis caused by *Babesia gibsoni*. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52, 27.
- Lin, P. R., & Shaio, M. F. (1998). A case study of cytokine profiles in acute human babesiosis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 58(3), 335–337.
- Lobetti, R. G., & Jacobson, L. S. (2001). Renal involvement in dogs with babesiosis. *Journal of the South African Veterinary Association*, 72(1), 23–8.
- Lobetti, R., Kirberger, R., Keller, N., Kettner, F., & Dvir, E. (2012). NT-ProBNP and cardiac troponin I in virulent canine babesiosis. *Veterinary Parasitology*, 190(3–4), 333–339.
- Maegraith, B., Gilles, H. M., & Devakul, K. (1957). Pathological processes in *Babesia canis* infections. *Zeitschrift Fur Tropenmedizin Und Parasitologie*, 8(4), 485–514.
- Máthé, a, Vörös, K., Papp, L., & Reiczigel, J. (2006). Clinical manifestations of canine babesiosis in Hungary (63 cases). *Acta Veterinaria Hungarica*, 54(3), 367–385.
- Matijatko, V., Mrljak, V., Ki??, I., Ku??er, N., For??ek, J., ??ivi??njak, T., ... Ceron, J. J. (2007). Evidence of an acute phase response in dogs naturally infected with *Babesia canis*. *Veterinary Parasitology*, 144(3–4), 242–250.



- Matjila, P. T., Penzhorn, B. L., Bekker, C. P. J., Nijhof, A. M., & Jongejan, F. (2004). Confirmation of occurrence of *Babesia canis vogeli* in domestic dogs in South Africa. *Veterinary Parasitology*, *122*(2), 119–125.
- Matsuu, A., Koshida, Y., Kawahara, M., Inoue, K., Ikadai, H., Hikasa, Y., ... Higuchi, S. (2004). Efficacy of atovaquone against *Babesia gibsoni* in vivo and in vitro. *Veterinary Parasitology*, *124*(1–2), 9–18.
- Mierzejewska, E. J., Pawełczyk, A., Radkowski, M., Welc-Fałęciak, R., & Bajer, A. (2015). Pathogens vectored by the tick, *Dermacentor reticulatus*, in endemic regions and zones of expansion in Poland. *Parasites & Vectors*, *8*(1), 490.
- Mihalca, A. D., Cozma, V., Şuteu, E., Marinculic, A., & Boireau, P. (2010). The quest for piroplasms: from Babeş and Smith to molecules. *Sci Parasitol*, *11*(1), 14–19.
- Miller, D. M., Swan, G. E., Lobetti, R. G., & Jacobson, L. S. (2005). The pharmacokinetics of diminazene aceturate after intramuscular administration in healthy dogs, *76*, 146–150.
- Milner, R. J., Reyers, F., Taylor, J. H., & Berg, J. S. Van Den. (1997). The effect of diminazene aceturate on cholinesterase activity in dogs with canine babesiosis, *68*, 111–113.
- Miró, G., Checa, R., Paparini, A., Ortega, N., González-Fraga, J. L., Gofton, A., ... Irwin, P. (2015). *Theileria annae* (syn. *Babesia microti*-like) infection in dogs in NW Spain detected using direct and indirect diagnostic techniques: clinical report of 75 cases. *Parasites & Vectors*, *8*(1), 217.
- Miyama, T., Sakata, Y., Shimada, Y., Ogino, S., Watanabe, M., Itamoto, K., ... Inokuma, H. (2005). Epidemiological survey of *Babesia gibsoni* infection in dogs in eastern Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science the Japanese Society of Veterinary Science*, *67*(5), 467–471.
- Mohr, A. J., Lobetti, R. G., & van der Lugt, J. J. (2000). Acute pancreatitis: a newly recognised potential complication of canine babesiosis. *J S Afr Vet Assoc*, *71*(4), 232–239.



- Mosqueda, J., Olvera-Ramirez, A., Aguilar-Tipacamu, G., & J. Canto, G. (2012). Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis. *Current Medicinal Chemistry*, 19(10), 1504–1518.
- Muir, W. W. (1982). Gastric dilatation-volvulus in the dog, with emphasis on cardiac arrhythmias. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 180(7), 739–742.
- Najm, N. A., Meyer-Kayser, E., Hoffmann, L., Herb, I., Fensterer, V., Pfister, K., & Silaghi, C. (2014). A molecular survey of Babesia spp. and Theileria spp. in red foxes (*Vulpes vulpes*) and their ticks from Thuringia, Germany. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5(4), 386–391.
- Nakornchai, S., & Konthiang, P. (2006). Activity of azithromycin or erythromycin in combination with antimalarial drugs against multidrug-resistant Plasmodium falciparum in vitro, 100, 185–191.
- Nandini, M. (2016). New Therapeutic Protocol for Canine Babesiosis : A Case Report, 3(3), 4–5.
- Penzhorn, B. L. (2011). Why is Southern African canine babesiosis so virulent? An evolutionary perspective. *Parasites & Vectors*, 4, 51.
- Persing, D. H., & Conrad, P. A. (1995). Babesiosis: new insights from phylogenetic analysis. *Infectious Agents and Disease*, 4(4), 182–195.
- Persing, D. H., Mathiesen, D., Marshall, W. F., Telford, S. R., Spielman, A., Thomford, J. W., & Conrad, P. A. (1992). Detection of Babesia microti by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 30(8), 2097–2103.
- Petney, T. N., Moser, E., Littwin, N., Pfäffle, M., Muders, S. V., & Taraschewski, H. (2015). Additions to the “annotated checklist of the ticks of Germany”: *Ixodes acuminatus* and *Ixodes inopinatus*. *Systematic and Applied Acarology*, 20(2), 221–224.
- Potgieter, F. T., & Els, H. J. (1977). The fine structure of intra-erythrocytic stages of Babesia bigemina. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 44(3), 157—168.



- Randolph, S. E. (2004). Evidence that climate change has caused “emergence” of tick-borne diseases in Europe? *International Journal of Medical Microbiology Supplements*, 293(September 2014), 5–15.
- Raucher, H. S., Jaffin, H., & Glass, J. L. (1984). Babesiosis in Pregnancy. *Obstetrics & Gynecology*, 63(3).
- Reimer, M. E., Troy, G. C., & Warnick, L. D. (1999). Immune-mediated hemolytic anemia: 70 cases (1988-1996). *Journal of the American Animal Hospital Association*, 35(5), 384–391.
- René-Martellet, M., Moro, C. V., Chêne, J., Bourdoiseau, G., Chabanne, L., & Mavingui, P. (2015). Update on epidemiology of canine babesiosis in Southern France. *BMC Veterinary Research*, 11(1), 223.
- Reyers, F., Leisewitz, A. L., Lobetti, R. G., Milner, R. J., Jacobson, L. S., & van Zyl, M. (1998). Canine babesiosis in South Africa: more than one disease. Does this serve as a model for falciparum malaria? *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 92(4), 503–511.
- Ribeiro, J. M. (1987). Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annual Review of Entomology*, 32, 463–478.
- Rich, M., Deighton, L., & Roberts, L. (2005). Clindamycin-resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from animals. *Veterinary Microbiology*, 111(3–4), 237–240.
- Rubel, F., Brugger, K., Monazahian, M., Habedank, B., Dautel, H., Leverenz, S., & Kahl, O. (2014). The first German map of georeferenced ixodid tick locations. *Parasites & Vectors*, 7(1), 477.
- Rudzinska, M. A. (1976). Ultrastructure of intraerythrocytic *Babesia microti* with emphasis on the feeding mechanism. *The Journal of Protozoology*, 23(2), 224–233.
- Rudzinska, M. A. (1983). Sexuality in Piroplasms as Revealed by Electron Microscopy in *Babesia microti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(10), 2966–2970.



- Rudzinska, M. A., Lewengrub, S., Spielman, A., & Piesman, J. (1983). Invasion of *Babesia microti* into Epithelial Cells of the Tick Gut1. *The Journal of Protozoology*, 30(2), 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. *Canadian Journal of Zoology*, 57(2), 424–434.
- Rudzinska, M. A., Trager, W., Lewengrub, S. J., & Gubert, E. (1976). An electron microscopic study of *Babesia microti* invading erythrocytes. *Cell and Tissue Research*, 169(3), 323–334.
- Sainz, Á., Roura, X., Miró, G., Estrada-Peña, A., Kohn, B., Harrus, S., & Solano-Gallego, L. (2015). Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasites & Vectors*, 8(1), 75.
- Sakuma, M., Setoguchi, A., & Endo, Y. (2009). Possible Emergence of Drug-Resistant Variants of *Babesia gibsoni* in Clinical Cases Treated with Atovaquone and Azithromycin, 493–498.
- Schetters, T. (2005). Vaccination against canine babesiosis. *Trends in Parasitology*, 21(4), 179–184.
- Schetters, T., Kleuskens, J., Scholtes, N., & Bos, H. (1995). Strain variation limits protective activity of vaccines based on soluble *Babesia canis* antigens. *Parasite Immunology*, 17(4), 215–218.
- Schetters, T. P. M., Kleuskens, J. A. G. M., Scholtes, N. C., Gorenflot, A., Moubri, K., & Vermeulen, A. N. (2001). Vaccination of dogs against heterologous *Babesia canis* infection using antigens from culture supernatants. *Veterinary Parasitology*, 100(1–2), 75–86.
- Schetters, T. P. M., Kleuskens, J. A. G. M., Van De Crommert, J., De Leeuw, P. W. J., Finizio, A. L., & Gorenflot, A. (2009). Systemic inflammatory responses in dogs experimentally infected with *Babesia canis*; a haematological study. *Veterinary Parasitology*, 162(1–2), 7–15.



- Schnittger, L., Rodriguez, A. E., Florin-Christensen, M., & Morrison, D. A. (2012). Babesia: A world emerging. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(8), 1788–1809.
- Schoeman, J. P. (2009). Canine babesiosis. *Small*, 33, 885–904.
- Scholtyssek, E., Mehlhorn, H., & Friedhoff, K. (1970). The fine structure of the conoid of sporozoa and related organisms. *Zeitschrift Für Parasitenkunde*, 34(1), 68–94.
- Scott-Moncrieff, J. C., Treadwell, N. G., McCullough, S. M., & Brooks, M. B. (2001). Hemostatic abnormalities in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 37(3), 220–227.
- Sikorski, L. E., Birkenheuer, A. J., Holowaychuk, M. K., Davis, J. M., & Littman, M. P. (2010). Babesiosis Caused by a Large Babesia Species in 7 Immunocompromised Dogs, 127–131.
- Simões, P. B., Cardoso, L., Araújo, M., Yisaschar-Mekuzas, Y., & Baneth, G. (2011). Babesiosis due to the canine Babesia microti-like small piroplasm in dogs-first report from Portugal and possible vertical transmission. *Parasites & Vectors*, 4, 50.
- Simpson, C. F., Kirkham, W. W., & Kling, J. M. (1967). Comparative morphologic features of Babesia caballi and Babesia equi. *American Journal of Veterinary Research*, 28(127), 1693–1697.
- Skrabalo, Z., & Deanovic, Z. (1957). Piroplasmosis in man; report of a case. *Documenta de Medicina Geographica et Tropica*, 9(1), 11–16.
- Solano-Gallego, L., & Baneth, G. (2011). Babesiosis in dogs and cats-Expanding parasitological and clinical spectra. *Veterinary Parasitology*, 181(1), 48–60.
- Solano-Gallego, L., Sainz, Á., Roura, X., Estrada-Peña, A., & Miró, G. (2016). A review of canine babesiosis: the European perspective. *Parasites & Vectors*, 9(1), 336.
- Solano-Gallego, L., Trotta, M., Carli, E., Carcy, B., Caldin, M., & Furlanello, T. (2008). Babesia canis canis and Babesia canis vogeli clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease. *Veterinary Parasitology*, 157(3), 211–221.



- Stegeman, J. R., Birkenheuer, A. J., Kruger, J. M., & Breitschwerdt, E. B. (2003). Transfusion-associated *Babesia gibsoni* infection in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 222(7), 952,959-963.
- Sutherst, R. W. (2001). The vulnerability of animal and human health to parasites under global change. *International Journal for Parasitology*, 31(9), 933–948.
- Taenzler, J., Liebenberg, J., Roepke, R. K. A., & Heckerroth, A. R. (2016). Prevention of transmission of *Babesia canis* by *Dermacentor reticulatus* ticks to dogs after topical administration of fluralaner spot-on solution. *Parasites & Vectors*, 9(1), 234.
- Uilenberg, G. (2006). *Babesia*-A historical overview. *Veterinary Parasitology*, 138(1–2), 3–10.
- Uilenberg, G., Verdiesen, P. A. H. M., & Zwart, D. (2010). Imidocarb : A chemoprophylactic experiment with *Babesia canis* Imidocarb : A chemoprophylactic experiment with *Babesia canis*, 2176(June).
- Vercammen, F., De Deken, R., & Maes, L. (1995). Clinical and serological observations on experimental infections with *Babesia canis* and its diagnosis using the IFAT. *Parasite (Paris, France)*, 2(4), 407–410.
- Vercammen, F., De Deken, R., & Maes, L. (1996). Prophylactic treatment of experimental canine babesiosis (*Babesia canis*) with doxycycline. *Veterinary Parasitology*, 66(3–4), 251–255.
- Vial, H. J., & Gorenflot, A. (2006). Chemotherapy against babesiosis. *Veterinary Parasitology*, 138(1–2), 147–160.
- Waltisbuhl, D. J., Goodger, B. V., Wright, I. G., Commins, M. A., & Mahoney, D. F. (1987). An enzyme linked immunosorbent assay to diagnose *Babesia bovis* infection in cattle. *Parasitology Research*, 73(2), 126–131.
- Wardrop, K. J., Reine, N., Birkenheuer, A., Hale, A., Hohenhaus, A., Crawford, C., & Lappin, M. R. (2005). Canine and feline blood donor screening for infectious disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19(1), 135–142.



- Weiland, G. (1986). Species-specific serodiagnosis of equine piroplasma infections by means of complement fixation test (CFT), immunofluorescence (IIF), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Veterinary Parasitology*, 20(1), 43–48.
- Welzl, C., Leisewitz, a L., Jacobson, L. S., Vaughan-Scott, T., & Myburgh, E. (2001). Systemic inflammatory response syndrome and multiple-organ damage/dysfunction in complicated canine babesiosis. *Journal of the South African Veterinary Association*, 72, 158–162.
- Western, K. A., Benson, G. D., Gleason, N. N., Healy, G. R., & Schultz, M. G. (1970). Babesiosis in a Massachusetts Resident. *New England Journal of Medicine*, 283(16), 854–856.
- Wilson, L. B., & Chowning, W. M. (1979). Classics in infectious diseases. Reprinted from *The Journal of Infectious Diseases* 1:31-57, 1904. Studies in Pyroplasmosis Hominis (“Spotted Fever” or “Tick Fever” of the Rocky Mountains). *Reviews of Infectious Diseases*, 1(3), 540–558.
- Wulansari, R., Wijaya, A., Ano, H., Horii, Y., Nasu, T., Yamane, S., & Makimura, S. (2003). Clindamycin in the Treatment of Babesia gibsoni Infections in Dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 39(6), 558–562.
- Yamane, I., Gardner, I. A., Ryan, C. P., Levy, M., Urrico, J., & Conrad, P. A. (1994). Serosurvey of Babesia canis, Babesia gibsoni and Ehrlichia canis in pound dogs in California, USA. *Preventive Veterinary Medicine*, 18(4), 293–304.
- Yamane, I., Thomford, J. W., Gardner, I. A., Dubey, J. P., Levy, M., & Conrad, P. A. (1993). Evaluation of the indirect fluorescent antibody test for diagnosis of Babesia gibsoni infections in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 54(10), 1579–1584.
- Yeagley, T. J., Reichard, M. V, Hempstead, J. E., Allen, K. E., Parsons, L. M., White, M. A., ... Meinkoth, J. H. (2009). Detection of Babesia gibsoni and the canine small Babesia “Spanish isolate” in blood samples obtained from dogs confiscated from dogfighting operations. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 235(5), 535–539.



- Yisaschar-Mekuzas, Y., Jaffe, C. L., Pastor, J., Cardoso, L., & Baneth, G. (2013). Identification of Babesia species infecting dogs using reverse line blot hybridization for six canine piroplasms, and evaluation of co-infection by other vector-borne pathogens. *Veterinary Parasitology*, 191(3–4), 367–373.
- Zahler, M., Rinder, H., Schein, E., & Gothe, R. (2000a). Detection of a new pathogenic Babesia microti-like species in dogs. *Veterinary Parasitology*, 89(3), 241–248.
- Zahler, M., Schein, E., Rinder, H., & Gothe, R. (1998). Characteristic genotypes discriminate between Babesia canis isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. *Parasitology Research*, 84(7), 544–548.
- Zygner, W., Gójska, O., Rapacka, G., Jaros, D., & Wedrychowicz, H. (2007). Hematological changes during the course of canine babesiosis caused by large Babesia in domestic dogs in Warsaw (Poland). *Veterinary Parasitology*, 145(1–2), 146–151.