

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

DISSERTAÇÃO

**Infecção Natural por *Theileria equi* (Piroplasmida: Theileriidae) e
Babesia caballi (Piroplasmida: Babesiidae) em Carrapatos
Coletados em Pastagens Frequentadas por Equinos e Bovinos nas
Microrregiões de Itaguaí e Serrana, Estado do Rio de Janeiro**

Gabriela Lopes Vivas Vitari

2014



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

**INFECÇÃO NATURAL POR *Theileria equi* (Piroplasmida:
Theileriidae) E *Babesia caballi* (Piroplasmida: *Babesiidae*) EM
CARRAPATOS COLETADOS EM PASTAGENS
FREQUENTADAS POR EQUINOS E BOVINOS NAS
MICRORREGIÕES DE ITAGUAÍ E SERRANA, ESTADO DO
RIO DE JANEIRO**

GABRIELA LOPES VIVAS VITARI

Sob a orientação do Professor
Huarrisson Azevedo Santos

e Co-orientação do professor
Carlos Luiz Massard

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

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2014

595.42

V837i

T

Vitari, Gabriela Lopes Vivas, 1980-
Infecção natural por *Theileria equi*
(Piroplasmida: Theileriidae) e *Babesia*
caballi (Piroplasmida: Babesiidae) em
carrapatos coletados em pastagens
frequentadas por equinos e bovinos nas
Microrregiões de Itaguaí e Serrana, Estado
do Rio de Janeiro / Gabriela Lopes Vivas
Vitari. - 2014.
67 f.: il.

Orientador: Huarrisson Azevedo Santos.
Dissertação (mestrado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Bibliografia: f. 36-46.

1. Carrapato - Teses. 2. Carrapato como
transmissor de doenças - Rio de Janeiro
(Estado) - Teses. 3. Equino - Parasito -
Rio de Janeiro (Estado) - Teses. 4.
Babesiose em cavalo - Rio de Janeiro
(Estado) - Teses. 5. Protozoologia
veterinária - Teses. I. Santos, Huarrisson
Azevedo, 1980- II. Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias. III.
Título.

Dedico este trabalho a Deus por nortear a minha vida. A Nossa Senhora por estar sempre cuidando de mim. Aos meus pais Patricia e Ricardo, pelo exemplo, incentivo e amor incondicionais. À minha amada irmã Bela pelo apoio e carinho. Ao meu querido namorado Rapha pelo companheirismo. Aos meus familiares e amigos que sempre estiveram comigo, mesmo nos momentos difíceis. Aos meus colegas de profissão, pela atenção e por estarem ao meu lado nesta caminhada!



“A educação é a arma mais
poderosa que você pode usar para
mudar o mundo.”

Nelson Mandela

“O mundo é como um espelho que
devolve a cada pessoa o reflexo
de seus próprios pensamentos.

A maneira como você encara
a vida é que faz toda diferença”

Luís Fernando Veríssimo

AGRADECIMENTOS

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

À minha mãezinha Nossa Senhora, minha fiel e incansável intercessora, que sempre cuida de mim.

Aos meus pais Ricardo e Patricia, e minha irmã Izabela, pelo amor, confiança, conselhos e apoio que sempre me dedicaram. Vocês são parte importante desta obra.

Aos meus avós, padrinhos, tios e primos que sempre acreditaram no meu sucesso, me incentivaram na caminhada e rezaram por mim.

Ao meu amado Raphael, pelo carinho, compreensão, confiança e por estar sempre ao meu lado.

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

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

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

Ao meu co-orientador, Professor Dr. Carlos Luiz Massard, por me acolher em sua equipe, pela amizade e pelos preciosos ensinamentos tanto na área da Parasitologia Animal como na vida. Agradeço especialmente a oportunidade de crescimento pessoal e profissional que me proporcionou nesses dois anos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa durante o Mestrado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo suporte financeiro deste projeto.

À todos os professores do Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias pelos conhecimentos transmitidos e em especial ao Professor Dr. João Luiz Horácio Faccini, pela paciência e todo auxílio prestado, sendo de grande importância para a realização desta obra.

À toda equipe do Laboratório de Hemoparasitos e Vetores do Departamento de Parasitologia Animal (DPA/IV-UFRRJ), Claudia Bezerra Silva, Juliana Macedo, Larissa Amorim, Nelson Meireles e Candida Lucena, pela amizade e pela ajuda no dia-a-dia. Agradeço a amiga e companheira de mestrado Renata Lins, por ter somado imensamente a este trabalho, pelas risadas e pela maravilhosa convivência. E em especial aos amigos Maristela Peckle e Marcus Pires, por toda paciência, companheirismo e pelos ensinamentos, vocês foram fundamentais na concretização deste trabalho.

A todos os amigos da Estação de Pesquisa Parasitológica W.O. Neitz e todos os meus amigos e colegas do curso de pós-graduação em Ciências Veterinárias, por todo incentivo, ajuda, alegria e pelo ótimo convívio.

Aos motoristas, Carlos Alberto, Alfeu e Barão, que sempre me conduziram e acompanharam, possibilitando a realização desta obra.

A todos os proprietários e/ou responsáveis que gentilmente aceitaram participar deste trabalho, possibilitando assim sua realização.

Aos animais, motivo real das minhas escolhas, meu respeito e gratidão.

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

Muito obrigada!

BIOGRAFIA

Gabriela Lopes Vivas Vitari, filha de Ricardo Baptista Vitari e Patricia Lopes Vivas Vitari, nasceu em 10 de junho de 1988, no município do Rio de Janeiro, estado do Rio de Janeiro.

Estudou no Colégio Golfinho Amigo e no Colégio Belisário dos Santos. Coursou o ensino fundamental e o ensino médio no Colégio Nossa Senhora do Rosário, em Campo Grande, Rio de Janeiro, concluindo em 2005.

No ano de 2006 ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), no curso de Medicina Veterinária.

Durante a graduação realizou estágios na área de Clínica Médica no Hospital Veterinário de Grandes Animais (HVGA), e na área de nutrição e patologia clínica veterinária no Grupo de Pesquisa/CNPq relacionados à Produção e Saúde dos Equinos, sob a orientação do professor Dr. Fernando Queiroz de Almeida, na UFRRJ.

Fez estágio externo em Clínica Veterinária, no Centro Integrado de Saúde Animal (C.I.S.A.), em Campo Grande, auxiliando no diagnóstico de diversas doenças de importância Médico Veterinária e na realização do tratamento adequado de animais em terapia intensiva.

No ano de 2010, concluiu o curso de Medicina Veterinária.

Ingressou no Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, nível de Mestrado, área de concentração Parasitologia Veterinária, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no ano de 2012, sob orientação do professor Dr. Huarrisson Azevedo Santos e co-orientação do professor Dr. Carlos Luiz Massard, sendo contemplada com bolsa da CAPES.

Ao longo do curso de mestrado, entre os anos de 2012 e 2014, desenvolveu trabalhos, juntamente com seus orientadores e a equipe de trabalho, e participou de diversos projetos do Laboratório de Hemoparasitos e Vetores, localizado na Estação de Pesquisas Parasitológicas W.O.Neitz.

RESUMO

VITARI, Gabriela Lopes Vivas. **Infecção Natural por *Theileria equi* (Piroplasmida: Theileriidae) e *Babesia caballi* (Piroplasmida: Babesiidae) em Carrapatos Coletados em Pastagens Frequentadas por Equinos e Bovinos nas Microrregiões de Itaguaí e Serrana, Estado do Rio de Janeiro**, 2014. 54p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

A piroplasmose equina se destaca dentre as doenças que atingem a maioria dos plantéis de equídeos no Brasil, e é causada por protozoários, de localização intraeritrocítica, denominados *Theileria equi* e *Babesia caballi*. O trabalho teve como objetivo determinar a taxa de infecção natural por *T. equi* e *B. caballi* nos carrapatos coletados em pastagens frequentadas por equinos e/ou bovinos nas Microrregiões Serrana e de Itaguaí no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Além disso, objetivou-se avaliar os possíveis fatores associados a presença de carrapatos coletados nas pastagens nas diferentes propriedades, de acordo com as características de cada microrregião estudada. As coletas de carrapatos foram realizadas em 28 propriedades nas regiões de estudo no período de janeiro a agosto de 2013. Os carrapatos foram coletados nas pastagens pelo método de arraste de flanela sobre a vegetação, por armadilhas de CO₂ e por coleta manual após visualização. Os Ixodídeos coletados foram identificados, contados, separados por estágio de desenvolvimento e foram formadas amostras de “pools” de carrapatos. O DNA genômico foi extraído e as amostras foram submetidas a PCR em tempo real e *nested* PCR. Foram coletados 4.716 Ixodídeos, sendo 84,8% (n=3.997) do gênero *Amblyomma*, 10,9% (n=514) do gênero *Dermacentor* e 4,3% (n=205) do gênero *Rhipicephalus*. Destes, observou-se um total de 4.276 larvas coletadas, 431 ninfas e 9 adultos. Na microrregião de Itaguaí 92,3% (n=13) das propriedades tinham a presença de carrapatos na área de pastagem dos animais, diferindo significativamente (p<0,05) da microrregião Serrana, onde somente 53,3% (n=15) das propriedades apresentavam carrapatos. Dentre todas as variáveis analisadas em relação à criação dos animais, somente a presença de carrapatos nos equinos apresentou associação estatística (p<0,05, RF=3,6) com a presença de carrapatos nas pastagens das propriedades. Em relação aos métodos de coleta de carrapatos, observou-se que na armadilha de CO₂ foi possível coletar uma porcentagem maior de ninfas quando comparado às larvas. Contudo, no arraste de flanela sobre a vegetação, observou-se uma porcentagem maior de larvas quando comparado com o outro estágio de desenvolvimento. Na detecção de DNA alvo para *T. equi*, 5,8% (n=24) das amostras de carrapatos testadas foram consideradas positivas pelas técnicas de PCR em tempo real (qPCR) e *nested* PCR. Sobre o total de cada gênero de carrapato analisado, observou-se que 5,1% (n=18) das amostras de *Amblyomma*, 13,2% (n=5) das amostras de *Dermacentor* e 4,0% (n=1) das amostras de *Rhipicephalus* apresentaram amplificação do DNA alvo de *T. equi* na qPCR. Do total de amostras analisadas (n=414), 1,9% (n=8) apresentaram amplificação do gene que condifica para a proteína da roptria BC48, específico para *B. caballi* através da *nested*-PCR. Observou-se que 1,7% (n=6) das amostras pertencentes ao gênero *Amblyomma* e 5,3% (n=2) das amostras do gênero *Dermacentor* amplificaram o fragmento alvo. Pode-se concluir que o gênero *Amblyomma* é o mais frequentemente encontrado nas pastagens das microrregiões, e que os gêneros *Amblyomma* e *Dermacentor* são capazes de se infectar naturalmente por *T. equi* e *B. caballi* nas regiões estudadas. A detecção de *T. equi* em larvas de carrapatos dos três gêneros indica que há ocorrência de transmissão transovariana nessas espécies.

Palavras-chave: Piroplasmose equina, carrapato, PCR em tempo real, *nested* PCR.

ABSTRACT

VITARI, Gabriela Lopes Vivas. **Natural infection of *Theileria equi* (Piroplasmida: Theileriidae) and *Babesia caballi* (Piroplasmida: Babesiidae) in Ticks Collected in Pastures Frequented by Horses and Cattle in Itaguai and Serrana Micro-regions, State of Rio de Janeiro**, 2014. 54p. Dissertation (Master in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Equine piroplasmosis stands out among the diseases that affect the majority of horse herds in Brazil, and is caused by protozoans, of intraerythrocytic location, named *Theileria equi* and *Babesia caballi*. This study aimed to determine the rate of natural infection by *T. equi* and *B. caballi* in ticks collected from pastures frequented by horses and/or cattle in Serrana and Itaguai micro-regions in state of Rio de Janeiro, Brazil. Furthermore, the other objective was to evaluate the possible associated factors to rate of infected ticks collected in different properties, according to the characteristics of each micro-region studied. The tick collections were performed in 28 properties in the studied areas between January and August 2013. Ticks were collected from pastures by dragging flannel method over the vegetation, CO₂ traps and manual collection after viewing. The ticks collected were identified, counted, separated by life stage and pools of ticks samples were formed. Genomic DNA was extracted and the samples were analysed by real time PCR and nested PCR. Four thousand seven hundred sixteen (4.716) ticks were collected, 84.8% (n=3.997) of *Amblyomma* genus, 10.9% (n=514) of *Dermacentor* genus and 4.3% (n=205) of *Rhipicephalus* genus. From the samples collected, 4.276 were larvae, 431 nymphs and 9 adults. In 92.3% (N=13) properties of Itaguai micro-region was found the presence of ticks in the grazing area to animals, differing significantly (p<0.05) of Serrana microregion, where only 53.3% (N=15) of properties had tick infestation. Among all the variables analyzed about the animals breeding, only the presence of ticks in horses was statistically associated (p<0.05, FR=3.6) with the presence of ticks on the pastures of the properties. Regarding collection methods, in the CO₂ trap was possible to collect a large percentage of nymphs in compared to larvae population. However, in the drag flannel method, the percentage of collected larvae was higher than the other developmental stages. Regarding the detection of target DNA to *T. equi*, 5.8% (n=24) of tested samples were considered positives by the real time PCR (qPCR) and nested PCR techniques. On the amount of each tick genus analyzed, it was found that 5.1% (n=18) of *Amblyomma* samples, 13.2% (n=5) of *Dermacentor* samples and 4.0% (n=1) of *Rhipicephalus* samples, showed amplification of target DNA of *T. equi* in qPCR. About the total number of tick samples analyzed (N=414), 1.9% (n=8) showed amplification of the gene that encodes the protein of roptria BC48, specific to *B. caballi* by nested PCR. It was observed that 1.7 % (n=6) of the samples of *Amblyomma* genus and 5.3% (n=2) of samples of *Dermacentor* genus amplify the target fragment. It is possible to conclude that *Amblyomma* genus was the more often found in the micro-regions pastures, and that *Amblyomma* and *Dermacentor* genus are able to infect itself naturally by *T. equi* and *B. caballi* in the studied regions. The detection of *T. equi* in tick larvae of the three genus indicates that there is occurrence of transovarial transmission in these species.

Keywords: Equine piroplasmosis, tick, real time PCR, nested PCR.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Análise descritiva da ocorrência de carrapatos nas pastagens de propriedades de criação de equinos nas microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro, no período de janeiro a agosto de 2013.....	19
Tabela 2.	Identificação e frequência dos gêneros e estágios evolutivos de carrapatos coletados em propriedades de criações com equinos, em duas microrregiões do estado do Rio de Janeiro, no período de janeiro a agosto de 2013.....	21
Tabela 3.	Análise bivariada da presença de carrapatos nas pastagens das propriedades analisadas em função do manejo sanitário e zootécnico da propriedade, condições das instalações, criações de animais, limpeza do pasto, procedência dos equinos, condição das pastagens, da presença de carrapatos nos equinos, da utilização de produto carrapaticida, em duas microrregiões do estado do Rio de Janeiro.....	23
Tabela 4.	Análise comparativa dos métodos de arraste de flanela e armadilha de CO ₂ para captura de estágios evolutivos de carrapatos em propriedades de criações de equinos, em duas microrregiões do estado do Rio de Janeiro, no período de janeiro a agosto de 2013.....	24
Tabela 5.	Avaliação da amplificação do DNA alvo de <i>Theileira equi</i> através da PCR em tempo real em amostras de carrapatos, de acordo com o gênero, o estágio evolutivo e a microrregião de origem dos exemplares, no estado do Rio de Janeiro.....	25
Tabela 6.	Avaliação das amostras de carrapatos positivas para <i>Theileira equi</i> através da PCR em tempo real de acordo com o gênero e o estágio evolutivo dos exemplares, no estado do Rio de Janeiro.....	26
Tabela 7.	Frequência do DNA alvo de <i>Babesia caballi</i> através da <i>nested</i> PCR (nPCR) em amostras de carrapatos, de acordo com o gênero, o estágio evolutivo e a microrregião de origem dos exemplares, no estado do Rio de Janeiro.....	28
Tabela 8.	Avaliação das amostras de carrapatos positivas para <i>Babesia caballi</i> através da <i>nested</i> PCR de acordo com o gênero e o estágio evolutivo dos exemplares, no estado do Rio de Janeiro.....	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Merozoítos no interior de eritrócitos. A: <i>B. caballi</i> ; B: <i>T. equi</i> . Fonte: Arquivo pessoal.....	7
Figura 2.	Localização geográfica dos municípios de Itaguaí (A), Seropédica (B), Petrópolis (C) e Teresópolis (D), estado do Rio de Janeiro. Fonte: < http://www.mapasparacolorir.com.br/mapa-estado-rio-de-janeiro.php >..	12
Figura 3.	Rota esquematizada para a metodologia de arraste de flanela sobre a vegetação. Fonte: VIEIRA et al., 2002.....	14
Figura 4.	Variação do grau de infestação de carrapatos presentes nas pastagens de acordo com a microrregião de origem da propriedade, RJ.....	20
Figura 5.	Variação da infestação de carrapatos presentes nas pastagens, de acordo com o número de gêneros identificados nas propriedades analisadas e a microrregião de localização, RJ.....	20
Figura 6.	Percentual de larvas de carrapatos coletados de acordo com os gêneros e os meses de coleta, em duas microrregiões do estado do Rio de Janeiro, RJ.....	21
Figura 7.	Percentual de ninfas de carrapatos coletados de acordo com a espécie e os meses de coleta, em duas microrregiões do estado do Rio de Janeiro, RJ.....	22
Figura 8.	Percentual de adultos de carrapatos coletados de acordo com a espécie e os meses de coleta, em duas microrregiões do estado do Rio de Janeiro, RJ.....	22
Figura 9.	Gráfico de amplificação de um fragmento de 85pb do <i>gene 18S rRNA</i> de <i>Theileria equi</i> obtidas na PCR em tempo real utilizando o sistema TaqMan. Curvas de amplificação na cor rosa referem-se ao controle positivo, e em azul e roxo demonstram amostras de carrapatos consideradas positivas pela técnica.....	24
Figura 10.	Gel de agarose (1,5%) com produtos da amplificação do fragmento de 102pb do <i>gene Ema-1</i> específico para <i>Theileria equi</i> . PM: Peso Molecular de 1kb; C+: controle positivo de <i>T. equi</i> ; C-: controle negativo para <i>T. equi</i> ; 1-2, 4-15: amostras consideradas positivas para <i>T. equi</i> pela técnica de <i>nested</i> PCR; 3: amostra considerada negativa para <i>T. equi</i>	25
Figura 11.	Gel de agarose (1,5%) com produtos da amplificação do fragmento de 430pb do <i>gene BC48</i> , específico para <i>Babesia caballi</i> . PM: Peso Molecular de 1kb; Amostras de DNA controle positivo para <i>B. caballi</i> através da PCR, em diluições seriadas de 1 à 8 (10ng/μL a 10 ⁻⁷ ng/μL). (A) Amostras de DNA controle positivo de <i>Babesia caballi</i> ; (B)	

Amostras de DNA controle positivo de *Babesia caballi* + DNA de *Amblyomma cajennense*; (C) Amostras de DNA de controle positivo de *Babesia caballi* + DNA de *Dermacentor nitens*.....

27

Figura 12. Gel de agarose (1,5%) com produtos da amplificação do fragmento de 430pb do gene BC48, específico para *Babesia caballi*. PM: Peso Molecular de 1kb; C+: controle positivo de *B. caballi*; C-: controle negativo; 1-2: amostras consideradas positivas para *B. caballi* pela técnica da *nested* PCR; 3-4: amostras consideradas negativas para *B. caballi*.....

27

LISTA DE ABREVIACÕES

AVMA	<i>American Veterinary Medical Association</i>
AST	Aspartato aminotransferase
CK	Creatina kinase
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
GGT	Gama glutamiltransferase
Hm	Hematimetria
Hg	Concentração de hemoglobina
Ht	Hematócrito
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LDH	Lactato desidrogenase
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
<i>n</i> PCR	<i>Nested</i> PCR
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qPCR	PCR em tempo real
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
RFC	Reação de fixação do complemento
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
UV	Radiação ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Histórico.....	3
2.2 Taxonomia.....	3
2.3 Distribuição geográfica.....	4
2.4 Epidemiologia e Transmissão.....	5
2.4.1 <i>Theileria equi</i>	5
2.4.2 <i>Babesia caballi</i>	6
2.5 Morfologia.....	7
2.6 Ciclo de vida.....	7
2.6.1 Biologia no hospedeiro vertebrado.....	7
2.6.2 Biologia no hospedeiro invertebrado.....	8
2.7 Patogenia.....	8
2.7.1 Alterações clínicas e laboratoriais.....	9
2.8 Diagnóstico.....	9
2.9 Principais diferenças entre <i>Theileria equi</i> e <i>Babesia caballi</i>	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Descrição do local de estudo.....	12
3.2 Tamanho da amostra e amostragem.....	12
3.3 Questionário Epidemiológico.....	13
3.4 Coleta de espécimes de carrapatos.....	13
3.5 Extração de DNA total de carrapatos.....	14
3.6 Detecção molecular de <i>Theileria equi</i>	15
3.6.1 Confirmação das amostras de carrapatos positivas para <i>Theileria equi</i> na qPCR por <i>nested</i> PCR.....	15
3.7 Sensibilidade analítica da PCR para detecção de <i>Babesia caballi</i>	16
3.8 Detecção molecular de <i>Babesia caballi</i> por <i>nested</i> PCR.....	16
3.9 Eletroforese de DNA em gel de agarose.....	17
3.10 Cuidados nas reações de <i>nested</i> PCR e da PCR em tempo real.....	17
3.11 Análise Estatística.....	17
4. RESULTADOS	19
4.1 Aspectos epidemiológicos do estudo.....	19
4.2 Detecção molecular de <i>Theileria equi</i> em carrapatos coletados de áreas de pastagem.....	24
4.3 Sensibilidade analítica da PCR para detecção de <i>Babesia caballi</i>	26
4.4 Detecção molecular de <i>Babesia caballi</i> em carrapatos coletados de áreas de pastagem.....	27
5. DISCUSSÃO	30
5.1 Aspectos epidemiológicos do estudo.....	30
5.2 Detecção molecular de <i>Theileria equi</i>	32
5.3 Detecção molecular de <i>Babesia caballi</i>	33
6. CONCLUSÕES	35

7. REFERÊNCIAS.....	36
8. ANEXOS.....	47

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui a maior população de equídeos da América Latina e a terceira maior do mundo, com um rebanho de aproximadamente 7,7 milhões de indivíduos movimentando 7,3 bilhões de reais em todo o país (MAPA, 2012). A região Sudeste concentra o maior número de equídeos, sendo que o estado do Rio de Janeiro abriga cerca de 120 mil animais (IBGE, 2012). Porém, no contexto nacional, a criação e exportação de equídeos perdem em número e importância já que não há um controle sistemático no plantel.

A piroplasmose ou babesiose equina se destaca dentre as doenças que atingem a maioria dos plantéis de equídeos no Brasil. Seus agentes etiológicos são protozoários de localização intra-eritrocítica denominados *Theileria equi* (Laveran, 1901) Mehlhorn; Schein (1998) e *Babesia caballi* (Nuttall; Strickland, 1912), acometendo equinos, asinimos, pôneis, muares e zebras. Durante a manifestação da doença, o animal apresenta como sinais clínicos: febre, anemia, icterícia, hemoglobinúria e fraqueza (DE WALL, 1990; 1992). Os equinos infectados, além de apresentarem esses sintomas, podem, em casos agudos da doença, evoluir para o óbito (DE WALL, 1990; 1992). Em muitos casos, o principal agravamento à saúde dos animais se caracteriza pela queda do desempenho e rendimento do equino, o que é de extrema importância na indústria equestre.

Esta doença é considerada o principal impedimento para o trânsito internacional de equinos, sendo proibida a entrada de animais positivos em países livres da doença, seja para competições esportivas ou para exportação definitiva (KNOWLES, 1996). Além disso, a restrição no trânsito destes animais é dada pelo alto risco de dispersão dos agentes de áreas enzoóticas para áreas livres destes hemoparasitos (FRIEDHOFF et al., 1990). Somente equinos sorologicamente negativos podem entrar em áreas livres (WEILAND, 1986). Sua importância também está embasada nos grandes prejuízos econômicos provenientes de gastos com tratamentos, abortamentos e mortes, lesando o negócio equestre brasileiro.

Ambas as espécies de protozoários apresentam uma vasta distribuição geográfica, ocorrendo na maior parte das áreas tropicais e subtropicais do mundo, como também em algumas áreas de clima temperado, seguindo a distribuição de seus carrapatos vetores (HOLBROOK, 1969; FRIEDHOFF et al., 1990; PFEIFER BARBOSA et al., 1992). Estima-se que apenas 10% da população mundial de equinos habitem áreas livres da piroplasmose equina e de seus vetores.

O diagnóstico da piroplasmose equina pode ser realizado utilizando métodos diretos, em amostras de sangue, através do exame microscópico de esfregaço sanguíneo e da reação em cadeia da polimerase (PCR), e também por métodos indiretos, através do ensaio imunoenzimático (ELISA), da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e da reação de fixação do complemento (RFC). O diagnóstico destes agentes em carrapatos já foi descrito a partir do exame direto de hemolinfa e esfregaço de órgãos destes artrópodes (BARREIRA et al., 2005), assim como pela técnica da PCR (UETI et al., 2005; 2008). A sensibilidade da reação de PCR é mais elevada quando comparada ao exame microscópico de esfregaços sanguíneos (RAMPERSAD et al., 2003; ALHASSAN et al., 2007).

A transmissão destes hemoparasitos está associada ao parasitismo por carrapatos. Até o presente momento, no continente Americano, *Dermacentor variabilis* (Say, 1821) e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) Murrell e Barker (2003) são os vetores identificados como transmissores experimentais de *T. equi* (GUIMARÃES et al., 1998; STILLER et al., 2002; UETI et al., 2005; 2008), sendo a transmissão natural de *T. equi* por estes ainda não comprovada (FRIEDHOFF et al., 1990). Já a transmissão de *B. caballi* no Brasil, está associada a carrapatos da espécie *Dermacentor nitens* (Neumann, 1897) (PFEIFER-BARBOSA et al., 1992; PFEIFER-BARBOSA, 1995; LINHARES, 1994; MUJICA, 2002).

A carência de informações sobre os carrapatos envolvidos na transmissão e distribuição destes agentes nas Américas, principalmente no Brasil, evidencia a necessidade de novos estudos. Estes podem levar ao estabelecimento de um programa de controle específico e estratégico para os vetores, medida esta mais eficaz no controle da piroplasmose equina.

A presente pesquisa teve como objetivos determinar a taxa de infecção natural por *T. equi* e *B. caballi* em carrapatos coletados de pastagens frequentadas por equinos e/ou bovinos em propriedades nas Microrregiões Serrana e de Itaguaí no Estado do Rio de Janeiro, e avaliar os possíveis fatores associados à presença de carrapatos coletados nas pastagens, de acordo com cada microrregião estudada.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

No fim do século XIX, um pesquisador, chamado Victor Babes, associou a ocorrência de uma doença denominada “Febre da água vermelha”, que causava hemoglobinúria em bovinos na Romênia, à presença de microrganismos intraeritrocíticos. Na mesma época, este autor observou também organismos similares em ovelhas.

Da mesma forma, Smith e Kilborne (1893) propuseram que a causa da “Febre do Texas”, doença anemiante de bovinos nos EUA, era em decorrência da presença de um microrganismo intraeritrocítico nos animais, que foi denominado de *Pyrosoma bigeminum*. Além disso, estes autores constataram a participação de carrapatos na transmissão deste agente para os animais. Este foi um dos primeiros relatos sobre a transmissão de protozoários por artrópodes. O gênero *Babesia* foi renomeado em 1893 por Starcovici, que intitulou assim em homenagem a Victor Babés, pesquisador que descreveu o primeiro gênero deste parasita (UILENBERG, 2006).

Em 1901, Laveran descreveu, a partir de esfregaços sanguíneos da África do Sul (NUTTALL; STRICKLAND, 1912), o pequeno piroplasma dos equinos, denominando-o de *Piroplasma equi* (Laveran, 1901). Em 1910, Nuttall e Strickland, demonstraram a existência de outra espécie de parasito, morfológicamente distinta de *P. equi*, mas também causador da piroplasmose equina. Embora estivessem parasitando o interior de eritrócitos, estes microrganismos eram maiores, sendo denominado *Piroplasma caballi* (Nuttall; Strickland, 1912). Diversos nomes foram propostos, como o termo “piroplasma”, que se originou da característica morfológica desses parasitos semelhante a uma “pêra”, durante sua multiplicação intra-eritrocítica. Atualmente, essa denominação *Piroplasma* permanece como sinonímia para o gênero *Babesia* (UILENBERG, 2006).

Estudos foram desenvolvidos com o agente antes denominado *Babesia equi* e nestes observou-se que a esquizogonia do agente no hospedeiro vertebrado ocorria primeiramente em linfócitos (SCHEIN et al., 1981), além da ocorrência de transmissão transestadial e falha na transmissão transovariana (SIGRIST, 1983). Com base nestas descobertas, Mehlhorn e Schein (1998) reclassificaram *B. equi* para o gênero *Theileria*, membro da família Theileriidae.

No Brasil, a babesiose equina por *T. equi* foi descrita pela primeira vez por Carini (1910) através do diagnóstico clínico e laboratorial de animais originados do estado de São Paulo. Desde então foi diagnosticada em alguns estados como o Rio de Janeiro (PFEIFER-BARBOSA et al., 1995; BOTTEON et al., 2002), Minas Gerais (RIBEIRO; LIMA, 1989), Goiás (LINHARES, 1994), e Rio Grande do Sul (CUNHA et al., 1997).

Em relação à espécie *B. caballi*, esta foi descrita no Brasil primeiramente no estado do Rio de Janeiro por Costa e Mello (1963) no Hospital Veterinário de Grandes Animais da UFRRJ, sendo sua transmissão associada à infestação dos equinos por carrapatos da espécie *Dermacentor nitens*, (PFEIFER-BARBOSA et al., 1992; PFEIFER-BARBOSA, 1993; LINHARES, 1994; MUJICA, 2002).

Embora possuam características em comum, *T. equi* e *B. caballi* possuem diferenças significativas envolvendo o ciclo biológico, a patogenicidade e a quimioterapia.

2.2 Taxonomia

Atual posição taxonômica destes protozoários:

Domínio: Eukaryota

Reino: Protista

Filo: Apicomplexa Levine, 1970;
Classe: Sporozoea Leuckart, 1879;
Sub-classe: Piroplasmae Levine, 1961;
Ordem: Piroplasmida Wenyon, 1962;
Família: Theileriidae Du Toit, 1918;
Gênero: *Theileria* Bettencourt, 1907;
Espécie: *Theileria equi* (LAVÉLAN, 1901) Mehlhorn e Schein, 1998.

Domínio: Eukaryota

Reino: Protista

Filo: Apicomplexa Levine, 1970;
Classe: Sporozoea Leuckart, 1879;
Sub-classe: Piroplasmae Levine, 1961;
Ordem: Piroplasmida Wenyon, 1962;
Família: Babesiidae Poche, 1913;
Gênero: *Babesia* Starcovici, 1893;
Espécie: *Babesia caballi* Nuttall; Strickland, 1912.

A ordem Piroplasmida é caracterizada por organismos pleomórficos que podem ser piriformes, amebóides, arredondados, alongados. Eles se locomovem por flexão ou deslizamento, e são heteroxenos que tem como hospedeiros invertebrados os carrapatos (ROBERTS; JANOVY, 2005).

A família Theileriidae é caracterizada por organismos de formato esférico, ovóide, em vírgula ou amebóide. São parasitos pequenos de linfócitos e eritrócitos, que se multiplicam por esquizogonia no hospedeiro vertebrado. No hospedeiro invertebrado ocorre a transmissão transtadial (NEITZ, 1956; SOULSBY, 1982). A gametogonia, esporogonia e a esquizogonia ocorrem no hospedeiro invertebrado (NAVARRETE; SERRANO, 1999).

A espécie *T. equi* possui merozoítos eritrocíticos, e quatro trofozoítos unidos pelas extremidades formando tétrades (cruz de malta) (LAVÉLAN, 1901; NEITZ, 1956; SOULSBY, 1982).

A família Babesiidae é composta por microorganismos que parasitam eritrócitos de hospedeiro vertebrado, onde a multiplicação ocorre por divisão binária ou esquizogonia, e os merozoítos, geralmente permanecem unidos pela extremidade formando pares, díades. Ocorre gametogonia, esporogonia e esquizogonia no hospedeiro invertebrado. A transmissão no hospedeiro invertebrado ocorre de forma transovariana e transtadial (NEITZ, 1956; SOULSBY, 1982; NAVARRETE; SERRANO, 1999).

O gênero *Babesia* pode ser classificado em dois grupos, de acordo com o tamanho do protozoário no interior das hemácias: “grandes babesias”, com formato piriforme, apresentando comprimento maior que 2,5µm e “pequenas babesias”, com forma piriforme menor que 2,5µm de comprimento. A espécie *B. caballi* é considerada uma grande babesia, com merozoítos no interior dos eritrocíticos na forma piriforme, unidos pelas extremidades, vacuolados, apresentando comprimento maior que o raio da hemácia (NEITZ, 1956; SOULSBY, 1982; NAVARRETE; SERRANO, 1999).

2.3 Distribuição geográfica

A piroplasmose equina é cosmopolita, considerada uma doença emergente nos países subtropicais, e está presente em áreas que abrigam 90% da população equina mundial (FRIEDHOFF et al., 1990). Sua ampla distribuição geográfica se dá pela diversidade de espécies de carrapatos, potencialmente transmissoras de agentes patogênicos, pertencentes aos

gêneros: *Dermacentor*, *Hyalomma* e *Rhipicephalus*, justificando assim sua ocorrência mundial (THOMPSON, 1969). O continente Australiano é o único considerado livre da piroplasmose equina (FRIEDHOFF et al., 1990).

A partir de estudos soropidemiológicos, foi observada uma alta prevalência destes protozoários nas populações de equídeos e zebras na África (YOUNG; PURNELL, 1973; DE WALL et al., 1988; FRIEDHOFF et al., 1990). Nessa região, a infecção apresenta elevada endemicidade, principalmente em países como África do Sul, Moçambique, Angola, Namíbia e Marrocos (NEITZ, 1956). No ano de 2009, foi observada uma prevalência de 50% para *T. equi* pela técnica de PCR em equinos e zebras nesta região (BHOORA et al., 2009).

Na Europa, *T. equi* e *B. caballi* foram descritas na França, Bélgica, Espanha e Itália (CORDEIRO DEL CAMPILLO et al., 1974). Por outro lado, países como Alemanha, Áustria, Suíça e Grã-Bretanha são considerados livres destes hemoparasitos (FRIEDHOFF et al., 1990).

Na Ásia, *T. equi* e *B. caballi* são caracterizadas de forma enzoótica, principalmente na China (XU et al., 2003; BOLDBAATAR et al., 2005), e Coreia, com exceção da Sibéria, onde estes protozoários ainda não foram observados. O Japão é considerado livre da doença (FRIEDHOFF; SOULÉ, 1996), porém estudos recentes indicam a possibilidade da circulação de *B. caballi* no plantel deste país (IKADAI et al., 2002).

No continente Americano, a piroplasmose se manifesta também de forma enzoótica nos países da América Latina, exceto em regiões como sul do Chile e Argentina (RUDOLPH et al., 1975; FRIEDHOFF et al., 1990). Na América do Norte, os Estados Unidos e Canadá são considerados livres de *T. equi* e *B. caballi*, com exceção do estado da Flórida (HOLBROOK, 1969). Focos epidêmicos ocorreram nesse estado, através de equinos importados de Cuba, mas permaneceram localizados devido às rígidas medidas de controle adotadas (TAYLOR et al., 1969; HOLBROOK, 1969).

Em relação ao Brasil, o primeiro relato de *T. equi* foi descrito por Carini, em 1910, em animais originados do estado de São Paulo. Este protozoário também foi diagnosticado em animais de corrida com quadro agudo de babesiose (GUIMARÃES et al., 1950). O primeiro relato de *B. caballi* no Brasil foi realizado por Costa e Melo (1963) em equinos no estado do Rio de Janeiro. Relatos clínicos desse agente também foram feitos por Lima et al. (1976) em Minas Gerais e Rocha et al. (1988) em Pernambuco.

Diversos estudos foram realizados avaliando a prevalência desses agentes em diversos estados e regiões do Brasil. Estudos sorológicos foram inicialmente realizados por Tenter e Friedhoff (1986) em animais do estado do Espírito Santo e do Rio de Janeiro. Para *B. caballi* foi observada a ocorrência de 75% de equinos positivos no Rio de Janeiro (PFEIFFER et al., 1992), detectando posteriormente uma prevalência de 100% para *T. equi* no mesmo estado (PFEIFFER et al., 1993).

2.4 Epidemiologia e Transmissão

2.4.1 *Theileria equi*

A theileriose equina, causada pelo agente *T. equi*, apresenta caráter endêmico em alguns estados do Brasil, com uma prevalência em torno de 90% (PFEIFFER BARBOSA et al., 1995; BATTSETSEG et al., 2002; SANTOS et al., 2011; PECKLE et al., 2013), principalmente na região sudeste. Este agente permanece no organismo do animal infectado de forma crônica por anos, e provavelmente por toda a sua vida (MEHLHORN; SCHEIN, 1998), atuando como fonte de infecção para carrapatos vetores. Além disso, é de difícil combate através de fármacos convencionais e, portanto, é considerado um dos principais agentes de influência nas perdas econômicas da produção equina em nível nacional.

A transmissão deste protozoário ocorre através da inoculação de esporozoítos no equídeo pelo carrapato vetor. No mundo, foram identificados como transmissores de *T. equi*, dez espécies de carrapatos de três gêneros distintos: *Dermacentor*, *Rhipicephalus* e *Hyalomma* (MEHLHORN; SHEIN, 1998). A transmissão natural deste protozoário nas Américas ainda é desconhecida (FRIEDHOFF et al., 1990), embora seja comprovada a transmissão experimental por *R. (B.) microplus* e *D. variabilis* (KNOWLES et al., 1992; GUIMARÃES, 1998; STILLER et al., 2002; UETI et al., 2005; 2008).

Theileria equi faz transmissão transestadial no carrapato vetor. Normalmente a infecção é adquirida por ninfas e transmitida a equinos livres por fêmeas e machos adultos (YOUNG; MORZARIO, 1986). Machos adultos de *Hyalomma* podem transmitir a infecção inter-hospedeiro (transmissão intraestadial), devido sua longevidade e motilidade. São capazes de infestar equinos ou outros hospedeiros por semanas ou até meses (FRIEDHOFF et al., 1990).

No Brasil, as principais espécies de carrapatos que parasitam equinos são *D. nitens* e *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787), porém até o final do século XX não existiam estudos que comprovassem a capacidade de transmissão de *T. equi* por estes carrapatos (DENNING, 1988; STILLER; COAN, 1995; DE WALL, 1988). No ano de 2011, Scoles e colaboradores relataram a ocorrência de transmissão intraestadial no carrapato *A. cajennense*, sendo confirmada esta capacidade de transmissão em estudos posteriores (SCOLES; UETI, 2013).

Rhipicephalus microplus caracteriza-se como uma importante espécie de carrapato relacionada a infestações em bovinos, gerando prejuízos diretos e indiretos na pecuária tanto no Brasil, como em outros países (CANÇADO et al., 2009). Sua importância na equinocultura esta relacionada à possível participação deste carrapato no ciclo de transmissão de *T. equi* para os equinos, uma vez que estudos experimentais comprovaram sua competência vetorial de forma transestadial e intra-estadial para este agente (GUIMARÃES et al., 1998; UETI et al., 2005, 2008). Entretanto, sua efetiva participação como vetor natural da theileriose equina ainda é imprecisa, uma vez que o equino é seu hospedeiro alternativo, dificultando assim, sua transmissão por este artrópode. A ocorrência deste carrapato em equinos depende do contato direto ou indireto com bovinos, em pastagens consorciadas onde esses animais são criados juntos (LABRUNA et al., 2001).

Amblyomma cajennense está distribuído geograficamente em todo o continente americano, ao longo da costa do Atlântico. É um carrapato que necessita de três hospedeiros (trioxeno) para completar seu ciclo, infestando principalmente equídeos. No entanto, possui uma baixa especificidade ao hospedeiro, particularmente durante as fases imaturas, podendo infestar bovinos, cães, pássaros e o homem (OLIVEIRA, 2000). Em estudos realizados nos EUA, Scoles et al. (2011) observaram a capacidade de transmissão de *T. equi*, por formas adultas de *A. cajennense* em equídeos infestados experimentalmente (SCOLES; UETI, 2013).

Além da transmissão biológica, a infecção de *T. equi* em equinos pode ser adquirida pela forma iatrogênica (por sangue infectado), transplacentária (ALLSOPP et al., 2007) e congênita (SANTOS et al., 2008).

2.4.2 *Babesia caballi*

A transmissão e distribuição de *B. caballi* na Europa e na Ásia estão relacionadas a cinco espécies de carrapatos do gênero *Dermacentor* e duas espécies de *Hyalomma* (FRIEDHOFF, 1990). Na África, a transmissão deste protozoário por *Rhipicephalus evertsi* e *Hyalomma truncatum* foi registrada por De Wall (1990).

No continente Americano, a participação de *D. nitens* na transmissão e distribuição de *B. caballi* foi registrada a partir de estudos experimentais em equídeos no estado da Flórida

(ROBY; ANTHONY, 1963; ROBY et al., 1964). Holbrook et al. (1968) observaram formas de multiplicação do protozoário em amostras de hemolinfa e tecidos de *D. nitens* e sua transmissão transovariana em carrapatos. Existem suspeitas de que *Dermacentor albipictus* também possa atuar como vetor na América do Norte (STILLER et al., 1980).

No Brasil, Pfeifer Barbosa et al. (1995) e Mujica (2002) observaram formas em multiplicação de *B. caballi* em ovários e ovos de *D. nitens*, sendo a transmissão de *B. caballi* por este carrapato comprovada por Mujica (2002). Estudos apontam uma elevada soropositividade dos equinos por *B. caballi* no estado do Rio de Janeiro (PFEIFER-BARBOSA et al., 1992; BITTENCOURT et al., 1997). Este carrapato está distribuído pela região sudeste do país, realizando mais de uma geração por ano (SOUZA; SERRA-FREIRE, 1994; LABRUNA et al., 2002). Esta espécie é monóxena e tem predileção por infestar a face interna das orelhas dos equinos (BORGES et al., 2000), bem como outras áreas protegidas dos raios solares como crina, períneo e falsa narina (SANTOS et al., 2011).

Considera-se então, *D. nitens* o principal vetor de *B. caballi* nas Américas, sendo todos os estágios do carrapato vetores competentes (SCHWINT, 2008), não sendo comprovada a capacidade de transmissão do agente por *A. cajennense*.

2.5 Morfologia

Em esfregaço sanguíneo observa-se em eritrócitos o protozoário *T. equi* como pequenas inclusões arredondadas com 1 a 2µm de diâmetro que se dividem em quatro formas piriformes caracterizadas como Cruz de Malta (Figura 1B) (NAVARRETE; SERRANO, 1999; ZAUGG, 2002; De WALL; VAN HEERDEN, 2004). Já o protozoário *B. caballi*, observa-se como pares piriformes juntos em um ângulo agudo com 2 a 3 µm (Figura 1A) (FELDMAN, 2000).

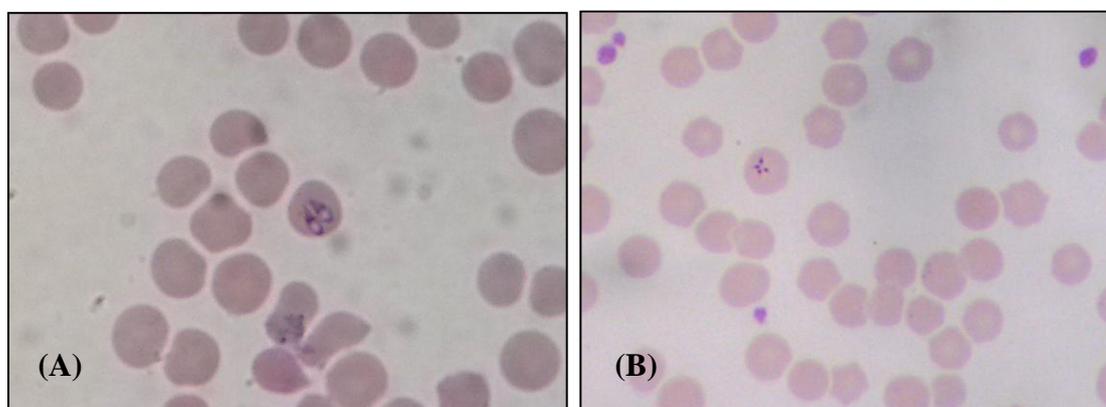


Figura 1. Merozoítos no interior de eritrócitos. A: *B. caballi*; B: *T. equi*. Fonte: Arquivo pessoal.

2.6 Ciclo de vida

2.6.1 Biologia no hospedeiro vertebrado

Os esporozoítos são inoculados através da saliva pelo carrapato vetor e sofrem um complexo ciclo de multiplicação antes de se tornarem infectantes para os equinos (FRIEDHOFF, 1988). Quando *B. caballi* atinge a circulação sanguínea, estes esporozoítos penetram ativamente nos eritrócitos, e se diferenciam em formas ovaladas e arredondadas, denominadas trofozoítos. Diferindo deste, os esporozoítos de *T. equi* apresentam

primeiramente uma esquizogonia exoeritrocítica em linfócitos e posteriormente em eritrócitos (SCHEIN et al., 1981). Nos linfócitos ocorre a formação de macroesquizontes que se diferenciam em microesquizontes (REGO, 2008). Os microesquizontes contém um grande número de merozoítos, que após a maturação, rompem os linfócitos e penetram nos eritrócitos (SCHEIN et al., 1981).

Em ambas as espécies, nos eritrócitos, vão ocorrer fissões binárias que darão origem aos merozoítos. No caso de *B. caballi*, serão formados dois merozoítos piriformes de tamanho maior que o raio da hemácia. Em *T. equi* serão formadas quatro células-filha, formando uma tetrade, conhecida como “Cruz de Malta”, característica da espécie (MEHLHORN; SCHEIN, 1984). Estes merozoítos promovem o rompimento da célula, e penetram em outros eritrócitos, iniciando novas divisões assexuadas. No entanto, alguns desses estágios intra-eritrocíticos podem adquirir formas ovais ou esféricas, conhecidas como gametócitos (HOLBROOK et al., 1968; MAHONEY et al., 1977). Estes gamontes podem ser ingeridos por carrapatos vetores, dando continuidade ao ciclo biológico. O período de incubação de *T. equi*, após a infestação por carrapatos, varia de 12 a 19 dias, ao passo que, em caso de infecção por *B. caballi* o período varia de 10 a 30 dias (AVMA, 2006).

2.6.2 Biologia no hospedeiro invertebrado

Nas duas espécies, os gametócitos são ingeridos pelo carrapato junto ao sangue do hospedeiro vertebrado. Chegam ao intestino, abandonam os eritrócitos e começam sua diferenciação, formando protusões, denominados corpos raiados, que são considerados gametas. Alguns desses se dividem e formam os microgametas uni-nucleados, outros não sofrem alteração e são considerados macrogametas multi-nucleados. Em seguida ocorre a gametogonia, onde os macrogametas e microgametas se fundem, dando origem ao zigoto. No interior do zigoto, ocorre o desenvolvimento de um cineto móvel chamado de oocineto ou esporocineto primário (MEHLHORN; SCHEIN, 1984). O oocineto penetra na parede intestinal, multiplica-se, forma vermículos, que posteriormente atingem a hemolinfa, e em sequência, outros órgãos do carrapato, como os ovários e a glândula salivar (MEHLHORN; SCHEIN, 1985). No caso de *T. equi* esses vermículos só atingem a glândula salivar, já que a transmissão transovariana não ocorre para esta espécie (SCHEIN et al., 1981; FRIEDHOFF, 1988).

Após penetração nos ácinos da glândula salivar do carrapato, ocorre a esporogonia, onde há formação de esporontes. Esses se dividem em esporozoítos, que é a forma infectante para o hospedeiro vertebrado (MEHLHORN; SCHEIN, 1984). A infecção ocorre quando o carrapato inicia sua alimentação e faz sua fixação no hospedeiro.

2.7 Patogenia

Uma vez que os protozoários *T. equi* e *B. caballi* invadem as hemácias, o sistema mononuclear fagocitário age na remoção destas células parasitadas ocasionando uma anemia hemolítica e intravascular (HENRY et al., 1993), em decorrência do rompimento das hemácias por merozoítos. A patogenia da doença pode variar de acordo com o estado nutricional e imunológico do animal. A severidade dos sinais clínicos é variável, e em alguns casos pode ocorrer uma recuperação espontânea sem sinais clínicos evidentes, especialmente em áreas endêmicas (RIBEIRO et al., 1995).

Hailat et al. (1997) concluíram que exercício pesado em equinos pode predispor às manifestações clínicas de babesiose, resultados também encontrados por Nogueira et al. (2005). Ambos concluíram que a imunossupressão, que predispõe à manifestações clínicas da

babesiose, pode ser induzida através de restrição alimentar, aplicação de corticóides e esforço físico.

2.7.1 Alterações clínicas e laboratoriais

O período de incubação desta enfermidade varia de 2 a 10 dias até 21 dias dependendo do vetor, desenvolvendo sinais clínicos como: febre, anemia, depressão, anorexia, membranas ictéricas, equimoses, edema de extremidades e abdômen ventral, hemoglobinemia, hemoglobinúria (HENRY et al., 1993; KOBLUCK et al., 1995; MEHLHORN; SCHEIN, 1998; ZEIMER; BLOOM, 1999; FELDMAN et al., 2000). Segundo Kobluck (1995) pode ocorrer também constipação, cólica e diarreia. Já Botteon et al. (2005) não constataram estatisticamente a interação entre a ocorrência de babesiose clínica e cólica. Segundo Pereira et al. (2004), Botteon et al. (2005) e Nogueira et al. (2005) quando ocorre queda no desempenho em animais atletas a principal suspeita é a babesiose.

Em relação aos achados laboratoriais, Camacho et al. (2005) encontraram uma significativa diminuição da hematimetria (Hm), concentração de hemoglobina (Hg) e hematócrito (Ht) de animais com sinais clínicos e diagnóstico do parasito no esfregaço sanguíneo, comparados com o controle negativo sem sinais clínicos. Entre os infectados, a anemia foi mais severa nos infectados com *T. equi* do que os infectados com *B. caballi*. Também observaram uma diminuição na contagem de plaquetas e um significativo aumento nas concentrações de bilirrubina total, uréia, aspartato aminotransferase (AST), gama glutamiltransferase (GGT), creatina kinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH). Cunha et al. (1998) também observaram uma redução significativa no Ht de animais inoculados experimentalmente com *T. equi* comparado ao controle negativo.

2.8 Diagnóstico

O diagnóstico da piroplasmose equina pode ser realizado através de métodos diretos e indiretos, dentre os quais se destacam a pesquisa parasitológica direta, realizada por meio de esfregaços sanguíneos, PCR, o cultivo *in vitro* do parasito e os métodos sorológicos, tais como ELISA, RIFI e RFC. Entretanto, é importante destacar que todos esses testes apresentam vantagens e desvantagens, as quais devem ser cuidadosamente avaliadas de acordo com o objetivo do estudo (SANTOS et al., 2009).

As técnicas indiretas ou sorológicas de diagnóstico se aplicam a estudos de levantamento epidemiológico, pois detectam infecções sub-clínicas e crônicas devido à alta sensibilidade (SANTOS et al., 2009). No entanto, os métodos diagnósticos sorológicos indiretos apresentam desvantagens, como a ocorrência de reatividade cruzada, falso positivo em animais que apresentam anticorpos maternos via colostro, a impossibilidade de detectar diretamente o agente, bem como a dificuldade na interpretação de baixos títulos (DONNELLY et al., 1982; ALI et al., 1996; PEREIRA et al., 2004).

Um diagnóstico correto e específico do agente envolvido na piroplasmose equina é essencial, pois o protozoário *T. equi* induz a infecções de maior severidade, e é mais resistente aos tratamentos babesicidas em relação à *B. caballi* (MORETTI et al., 2009). Neste aspecto, testes baseados em técnicas moleculares têm sido utilizados, apresentando maior especificidade e sensibilidade, detectando DNA dos parasitos em amostras, mesmo com parasitemia muito baixa (KIM et al., 2008; UETI et al., 2008).

A PCR tem sido aplicada na detecção de várias espécies de *Babesia* e *Theileria*, atribuindo mais sensibilidade e especificidade quando comparada com os métodos sorológicos (BHOORA et al., 2009). De acordo com Bose et al. (1995), a PCR tem mostrado ser sensível e específica servindo como uma ferramenta bastante útil para o diagnóstico das

babesioses equinas, porém, os casos crônicos podem apresentar resultados falso-negativos devido à baixa concentração de DNA na amostra. Testes baseados na PCR para a detecção de *Babesia* spp. apresentam uma sensibilidade 100 a 1000 vezes superior aos limites de detecção em relação à microscopia (NICOLAIEWSKY et al., 2001).

Um teste baseado na PCR, tendo como *gene* alvo o *18S rRNA*, foi desenvolvido para a detecção específica de *B. caballi* e *T. equi*, com uma parasitemia detectada pela técnica de aproximadamente 0,0083% para *T. equi* (BASHIRUDDIN, 1999).

Variações da técnica de PCR para o diagnóstico destes piroplasmas têm sido descritas, entre elas a *nested* PCR. Esta variação da PCR aumenta a sensibilidade e especificidade da reação de PCR convencional, pois utiliza dois pares de *primers*. Nicolaiewsky et al. (2001) descreveram um limite de detecção, em uma *nested* PCR, de seis células infectadas com *T. equi* em 10^8 eritrócitos de equinos, o equivalente a uma parasitemia de 0,000006%. A capacidade da *nested* PCR em diagnosticar infecções sub-clínicas é significativa, e pode contribuir para o controle da exportação de animais infectados, bem como para a determinação da eficiência dos tratamentos médicos (RAMPERSAD et al., 2003). Em resultados apresentados por Baldani et al. (2008), observou-se que a PCR teve alta sensibilidade.

A qPCR é outra alternativa frente à PCR convencional, que utiliza um sistema de detecção de fluorescência para a medição em tempo real dos produtos amplificados durante a reação, o que possibilita a quantificação do alvo das amostras testadas (KIM et al., 2008). Além disso, a detecção e quantificação do produto da PCR ocorrem num único processo, eliminando a necessidade de manipulação de produtos da PCR, reduzindo o risco de contaminação (BHOORA et al., 2009). Tanto o *gene 18S rRNA* como o *EMA-1* têm sido utilizados como *genes* alvo de testes baseados na qPCR para a detecção de *T. equi* em equinos (KIM et al., 2008; BHOORA et al., 2010).

A qPCR vem apresentado bons resultados na detecção de patógenos transmitidos por carrapatos, tanto em amostra de sangue (UETI et al., 2005; 2008), como no próprio tecido do carrapato (PAULAUSKAS et al., 2008). A utilização de marcadores moleculares específicos (sondas) no sistema *Taqman*, aumentam ainda mais a especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade do teste (LEUTENEGGER et al., 2001).

As técnicas da PCR têm sido utilizadas nos estudos de infecções por *Anaplasma marginale* (ECHAIDE et al., 1998), *Ehrlichia canis* (STICH et al., 2002), *Theileria* (TANAKA et al., 1993; KAWAZU et al., 1995; WATT et al., 1998), *Cowdria ruminantium* (TREVOR et al., 2000) tanto nos hospedeiros vertebrados como nos diferentes estágios evolutivos dos hospedeiros invertebrados. Uma das grandes vantagens das técnicas baseadas em PCR é a possibilidade de se empregar a mesma metodologia para a pesquisa dos agentes em ambos os hospedeiros, vertebrado e invertebrado.

Em amostras de carrapato, o diagnóstico destes agentes já foi descrito a partir do exame direto de hemolinfa, esfregaço de órgãos (BARREIRA et al., 2005), pela técnica da PCR (UETI et al., 2005; 2008) e qPCR em tecido do carrapato (PAULAUSKAS et al., 2008) e carrapatos inteiros (PECKLE et al., 2013).

Com o sequenciamento recente do genoma de *T. equi* foi possível identificar novos *genes* do parasito que poderão ser utilizados como alvo para as técnicas moleculares de diagnóstico (KAPPMAYER et al., 2012).

2.9 Principais diferenças entre *Theileria equi* e *Babesia caballi*

Existe uma grande similaridade entre esses parasitos, pois além de serem hemoprotozoários, são os agentes causadores da piroplasmose equina. Este fato pode ser evidenciado pela classificação taxonômica de *T. equi*, que até o ano de 1998, era classificado

como membro da família Babesiidae, gênero *Babesia*. No entanto, em *T. equi* destaca-se a transmissão transtestadial pelo carrapato (FRIEDHOFF, 1988), o desenvolvimento em linfócitos antes do ciclo eritrocítico (SCHEIN et al., 1981; MOLTMANN et al., 1983) e o aparecimento de formas intra-eritrocíticas em “Cruz de Malta”, como resultado da divisão múltipla do parasito (SCHEIN, 1988), características que divergem da família Babesiidae e consequentemente de *B. caballi*.

Além dos dados morfológicos e biológicos suplementados pela bioquímica, estudos de sensibilidade à drogas têm demonstrado que esquizontes exoeritrocíticos de *T. equi* são altamente susceptíveis à fármacos esquizonticidas usadas no tratamento da theileriose bovina (ZWEYGARTH et al., 1984; KUTTLER et al., 1987; ZAUGG; LANE, 1989; KUMAR, 2003). Por outro lado, *T. equi* apresenta resistência à fármacos babesicidas, o que sugere um metabolismo distinto (MEHLHORN; SCHEIN, 1984).

A mudança na sistemática de *B. equi* para *T. equi* vem sendo discutida desde a década de 80. Estudos apontavam fortes evidências com relação à taxonomia de *T. equi*. Como por exemplo, alguns autores propuseram a transferência desse parasito para o gênero *Theileria* (SCHEIN et al., 1981; MOLTMANN et al., 1983; ZAPF; SCHEIN, 1994; MELHORN; SCHEIN, 1998), enquanto outros acreditavam que seria melhor a criação de uma nova família (ALLSOPP et al., 1994), havendo divergência entre estes.

Os hematozoários do gênero *Babesia* parasitam diretamente os eritrócitos quando adentram no hospedeiro vertebrado, enquanto os esporozoítos de *Theileria* realizam sua esquizogonia em linfócitos primeiramente, e só depois infectam os eritrócitos (SCHEIN et al., 1981; MOLTMANN et al., 1983). É esse estadio linfocitário que causa algumas das manifestações mais graves das infecções por *Theileria*, tais como linfadenopatia, pirexia, trombocitopenia e panleucopenia (HOMER et al., 2000). Quando comparada com a essa espécie, *B. caballi* possui uma menor atividade patogênica e diferente sensibilidade a quimioterápicos, apresentando-se sensível a produtos para o tratamento de babesiose (NAVARRETE; SERRANO, 1999; OIE, 2004).

No carrapato vetor, os zigotos de *Babesia* multiplicam-se e os vermículos resultantes invadem numerosos órgãos do carrapato, incluindo ovários, o que não ocorre no gênero *Theileria* (SIGRIST, 1983). Em *Theileria*, não há desenvolvimento reprodutivo nos órgãos de carrapatos vetores, incluindo ovários (ZAPF; SCHEIN, 1994).

A partir destas informações, foi possível reclassificar a espécie *Babesia equi*, para outro gênero, *Theileria*, como bem demonstrado por Mehlhorn e Schein (1998), e que *B. caballi* e *T. equi* são parasitos que apresentam algumas semelhanças, mas com características biológicas, morfológicas e metabólicas distintas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição do local de estudo

O estudo foi realizado em quatro municípios, sendo dois da Microrregião de Itaguaí (Seropédica e Itaguaí), e dois da Microrregião Serrana (Petrópolis e Teresópolis), estado do Rio de Janeiro, Brasil (Figura 2).

Coordenadas geográficas:

- Microrregião de Itaguaí:

Município de Itaguaí (22° 51' 08'' latitude Sul; 43° 46' 31'' longitude Oeste; altitude: 13 a 300 metros ao nível do mar).

Município de Seropédica (22° 44' 38'' latitude Sul; 43° 42' 27'' longitude Oeste; Altitude 26 a 300 metros ao nível do mar).

- Microrregião Serrana:

Município de Petrópolis (22°30'18'' latitude Sul; 43°10'44'' longitude Oeste; altitude: 809 a 1200 ao nível do mar).

Município de Teresópolis (22°24'43'' latitude Sul; 42°57'57'' longitude Oeste; altitude: 910 a 1500 ao nível do mar).

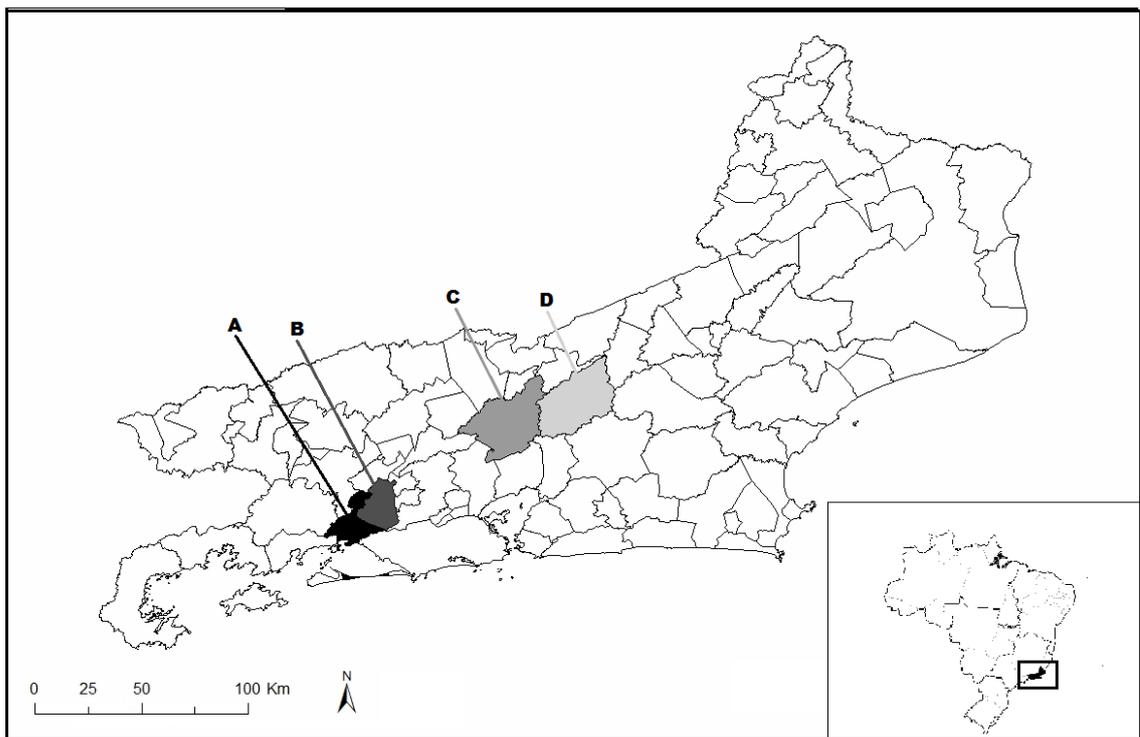


Figura 2. Localização geográfica dos municípios de Itaguaí (A), Seropédica (B), Petrópolis (C) e Teresópolis (D), estado do Rio de Janeiro. Fonte: <<http://www.mapasparacolorir.com.br/mapa-estado-rio-de-janeiro.php>>.

3.2 Tamanho da amostra e amostragem

Com o objetivo de estimar o tamanho da amostra de carrapatos, assumiu-se como parâmetro uma população infinita para um nível de prevalência desejado com base no erro amostral. Para tal, foi utilizada a seguinte fórmula proposta por Fulgêncio et al. (2006):

$$N = \frac{p(100 - p) \times \alpha^2}{(d \times p / 100)^2}$$

Sendo: N = número de amostras para estimar a prevalência em uma população infinita;
p = prevalência esperada (50%);
 α^2 = fator determinante do grau de confiança (4);
d = erro amostral (10%).

Após aplicação da referida fórmula, obteve-se um número amostral de 1.600 carrapatos.

3.3 Questionário Epidemiológico

Antes de dar início a coleta de carrapatos, o responsável pela propriedade foi informado sobre o estudo e a sua importância. A partir da anuência, o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) foi apresentado e devidamente preenchido pelo responsável (ANEXO I).

Após autorização foi aplicado um questionário semi-estruturado (ANEXO II) sobre questões referentes aos animais, à criação e ao manejo realizado na propriedade, com o objetivo de avaliar os possíveis fatores associados à presença destes artrópodes nas pastagens das diferentes propriedades avaliadas. Características inerentes à criação e às condições físicas do local de coleta foram mensuradas a partir de visualização direta. Dentre as questões analisadas no questionário destacam-se: localização da propriedade (Município e Microrregião); criação dos animais (somente equinos na propriedade/ equinos e bovinos criados simultaneamente na propriedade); condição das instalações (ruim/ moderada/ excelente); condição das pastagens (pasto limpo/ pasto sujo); limpeza da pastagem (sim/ não); manejo sanitário e zootécnico utilizado (baixo/ médio/ alto) (SANTOS et al., 2011); procedência dos animais (interna/ externa); presença ou ausência de carrapatos nos equinos e controle de carrapatos na propriedade e nos animais (sim/ não).

3.4 Coleta de espécimes de carrapatos

As coletas de carrapatos foram realizadas em 28 propriedades, por conveniência, nas regiões de estudo no período de janeiro a agosto de 2013. Os carrapatos de fase de vida não parasitária foram coletados pelo método de arraste de flanela sobre a vegetação (SONENSHINE et al., 1966), por armadilhas de CO₂ (WILSON et al., 1972) e por coleta manual após visualização no ambiente de permanência dos animais.

O arraste de flanela sobre a vegetação foi realizado com flanela branca (1,20m × 0,60m), ligada em cada extremidade a duas barras de madeira (0,70m × 2,0cm), com o objetivo de manter a flanela aberta durante o arraste sobre a vegetação. A distância percorrida variou de acordo com a extensão da área de pastagem, seguindo rota esquematizada na Figura 3 (VIEIRA et al., 2002). O arraste foi realizado usando ambos os lados da flanela em um período de 10 a 20 minutos, através de caminhada do operador da flanela.

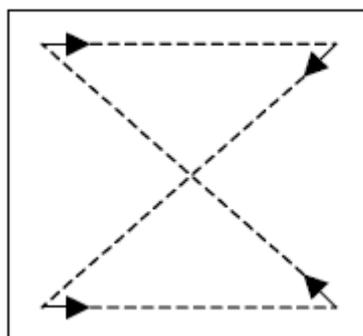


Figura 3. Rota esquematizada para a metodologia de arraste de flanela sobre a vegetação. Fonte: VIEIRA et al., 2002.

A armadilha de CO₂ (gelo seco) foi utilizada como um atrativo químico para os espécimes de carrapatos. Foram colocados aproximadamente 700g de gelo seco em recipiente de isopor vazado no centro de uma flanela branca (0,60m x 0,60m) esticada sobre o solo, contendo fita adesiva de dupla face em suas extremidades. O tempo de permanência da armadilha variou de 30 a 40 minutos.

Os espécimes de carrapatos eventualmente coletados sobre a roupa dos operadores foram coletados e alocados em tubos de polipropileno no local de coleta, para posterior identificação.

As flanelas utilizadas nas coletas foram armazenadas em sacolas plásticas individuais, devidamente identificadas (data de coleta, propriedade, técnica de coleta), e mantidas sob refrigeração até a chegada ao Laboratório de Hemoparasitos e Vetores da Estação Experimental de Pesquisa Parasitológica W.O. Neitz (E.E.P.P. W.O. Neitz), na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. No mesmo dia da coleta, as flanelas foram analisadas e os Ixodídeos coletados individualmente. Todos os carrapatos obtidos durante a coleta foram identificados sob microscópio estereoscópio, separados por estágio de desenvolvimento (larva, ninfa, adulto), e dimorfismo sexual. Finalmente, foram contabilizados e armazenados em “pools” em microtubos de polipropileno de 1,5 mL contendo 100 µL de RNAlater[®] Solution e mantidos a -80°C até o momento da extração de DNA.

A identificação dos Ixodídeos adultos foi realizada utilizando-se chave dicotômica apropriada segundo Aragão e Fonseca (1961) e Barros-Battesti et al. (2006). Estágios imaturos foram identificados por chave dicotômica de acordo com Clifford et al. (1960). Os espécimes coletados caracterizados em nível taxonômico como larvas foram identificados ao nível de gênero, enquanto as ninfas e adultos foram identificados ao nível de espécie.

A formação das amostras contendo *pools* de carrapatos foi composta da seguinte forma: larvas foram dispostas em no máximo 20 espécimes, ninfas em no máximo 3 espécimes e os adultos foram dispostos individualmente. Estas amostras foram separadas de acordo com o município, propriedade, data e metodologia de coleta, respeitando ainda o estágio de desenvolvimento e gênero ou espécie dos carrapatos.

Quando a presença de Ixodídeos na pastagem foi observada, a propriedade foi categorizada em três níveis de infestação: leve (1 até 100 espécimes), moderada (101 até 800 espécimes) e alta (acima de 801 espécimes).

3.5 Extração de DNA total de carrapatos

Para a extração de DNA das amostras (*pools*) de carrapatos (N=414), os espécimes foram macerados em gral e pistilo, com a adição de nitrogênio líquido. Após esta etapa, o

DNA genômico foi extraído pelo método Fenol-Clorofórmio (ANEXO III) baseado no protocolo de Ferreira e Grattapaglia (1998) adaptado às amostras do estudo. Esta etapa foi realizada em baterias de 20 amostras por dia.

As amostras de DNA foram ressuspensas em 80µL de TE (Promega – DNA Rehydration Solution, 10mM Tris; 1mM EDTA), quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop® ND-2000 (Nanodrop Technologies, DE, USA) e separadas em 4 alíquotas de 20µL. Finalmente, as alíquotas foram armazenadas a -80°C até o momento da utilização.

Alguns dos reagentes utilizados no protocolo de extração foram preparados no laboratório, como: Tampão de extração, 5% CTAB e CIA (clorofórmio-álcool isoamílico) (ANEXO IV).

3.6 Detecção Molecular de *Theileria equi*

A detecção molecular de *T. equi* foi realizada por meio do sistema TaqMan de qPCR empregando os iniciadores, protocolo e condições de termociclagem segundo Kim et al. (2008). Para amplificação de uma sequência de 85pb de DNA do gene *18S rRNA* foi utilizado um par de *primers* (oligonucleotídeos iniciadores), sendo eles Be18SF (5'-GCGGTGTTTCGGTGATTCATA-3') e Be18SR (5'-TGATAGGTCAGAACTTGAATGATACATC-3') e uma sonda fluorescente Be18SP (5'-AAATTAGCGAATCGCATGGCTT-3') marcada na extremidade 5' com um *Reporter Dye* 6-carboxyfluoresceína e na extremidade 3' com o *Quencher Dye* 6-carboxy-tetramethylrhodamine.

As reações foram realizadas em volume final de 12µL, no equipamento StepOne Plus® (Applied Biosystems), sendo compostas por: 1X de TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems®), 450nM de cada *primer* (Be18SF e Be18SR), 250nM da sonda Be18SP e 5µL de DNA total. Cada amostra foi analisada em duplicata.

Para o controle positivo utilizou-se DNA de uma amostra de sangue de equino cronicamente infectado com a cepa Jaboticabal de *T. equi*.

As condições de termociclagem foram: um ciclo inicial de 50°C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, e 45 ciclos a 95 °C por 20 segundos, seguidos de 55°C por 1 minuto (KIM et al., 2008). As amostras com *Cq* (*Quantification Cycle*) inferior ou igual a 40 ciclos foram consideradas positivas. O limite de detecção da técnica e a sensibilidade analítica foram verificados em estudo anterior realizado por Peckle et al. (2013).

3.6.1 Confirmação das amostras de carrapatos positivas para *Theileria equi* na qPCR por *nested* PCR

Para a confirmação dos resultados positivos para *T. equi*, obtidos através da qPCR, foi utilizada a técnica de *nPCR*, conforme descrito por Nicolaiewsky et al. (2001), com modificações. Foram realizadas amplificações de dois fragmentos específicos de aproximadamente 396pb para a primeira reação e 102pb para a segunda reação da *nPCR*, ambos baseados no gene *Ema-1*. Para esta confirmação, utilizaram-se dois pares de *primers*: na primeira reação utilizou-se os *primers* EMAE-F (5'- CCGCCCTTCACCTCGTTCTCAA-3') e EMAE-R (5'-TCTCGGCGGCATCCTTGACCTC -3') e na segunda reação os *primers* EMAI-F (5'-CCGTCTCCGTTGACTTGGCCG-3'), EMAI-R (5'-GGACGCGCTTGCCTGGAGCCT-3').

Para a primeira e segunda reação foi utilizado um volume final de 50µL, sendo: 10mM PCR *Buffer*, 3mM de MgCl₂, 250µM de cada dNTP, 0,5µM de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 1,5U de Platinum® *Taq* DNA Polymerase e 12µL de DNA na primeira reação e 6µL do produto de PCR amplificado na segunda, completando-se o volume com água ultrapura.

O processo de amplificação foi realizado em termociclador (Mastercycler Personal, Eppendorf®) programado para desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos e 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 segundos, anelamento a 60°C por 1 minuto, amplificação a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 4 minutos, para primeira reação. Na segunda reação, o termociclador foi programado para desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos e 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 45 segundos, amplificação a 72°C por 45 segundos e extensão final a 72°C por 5 minutos.

3.7 Sensibilidade analítica da PCR para detecção de *Babesia caballi*

Em estudo realizado por Pires (2013) foi possível observar que a melhor concentração dos *primers* (BC48F e BC48R) utilizada na *nPCR* para amplificação do DNA alvo de *B. caballi* (BATTSETSEG et al., 2002) foi de 0,6µM. Nesta concentração houve um aumento no limite de detecção da técnica (10^{-4} ng/µL) e maior quantidade de *amplicons* do DNA alvo de *B. caballi* sendo, portanto preconizada para o presente estudo.

Além disso, com o objetivo de avaliar a capacidade de amplificação do DNA alvo quando este está associado ao DNA do hospedeiro invertebrado (carrapato), foram realizados três testes com oito diluições cada. A sensibilidade analítica da *nPCR* foi verificada na amplificação do DNA alvo de *B. caballi* quando este foi associado ou não ao DNA do hospedeiro invertebrado. Ou seja, a sensibilidade analítica foi realizada em amostras de controle positivo (adquiridas a partir de sangue de equino sabidamente positivo) e com o mesmo controle positivo complexado com o DNA de carrapatos (oriundo de colônia livre de hemoparasitos). Uma amostra contendo somente o DNA positivo para *B. caballi* (10ng/µL até 10^{-7} ng/µL), e duas amostras contendo este mesmo DNA positivo complexado com DNA de *A. cajennense* e *D. nitens*.

3.8 Detecção molecular de *Babesia caballi* por *nested PCR*

Para a detecção molecular de *B. caballi* foi utilizada a técnica de *nPCR*, conforme descrito por Battsetseg et al. (2002), com as adaptações descritas. Foram realizadas amplificações de dois fragmentos específicos de aproximadamente 530pb para a primeira reação e 430pb para a segunda reação da *nPCR*, ambos para o gene que codifica para a proteína de roptria BC48, específico para *B. caballi*. Para esta análise, utilizaram-se dois pares de *primers*: na primeira reação utilizou-se os *primers* BC48F1 (5'-ACGAATTCC CACAACAGCCGTGTT-3') e BC48R3 (5'-ACGAATTCGTAAAGCGTGGCCATG-3'), e na segunda reação os *primers* BC48F11 (5'-GGGCGACGTGACTAAGACCTTATT-3'), BC48R31 (5'-GTTCTCAATGTCAGTAGCAT CCGC-3').

Para a primeira e segunda reação da *nPCR* para *B. caballi* foi utilizado um volume final de 25µL, sendo: 1X PCR *Buffer* (10X), 3mM de MgCl₂ (50mM), 250µM de dNTP (10mM), 0,6µM de cada *primer* (*forward* e *reverse*) (100µM), 1,5U de Platinum® *Taq* DNA Polymerase (5U/µL) e 6µL de DNA na primeira reação, e 3µL do produto de PCR amplificado na segunda, completando-se o volume com água ultrapura.

Para o controle positivo de *B. caballi* utilizou-se DNA de uma amostra de sangue equino naturalmente infectado (UFRRJ), que apresentou sinais clínicos de babesiose, sendo o agente confirmado por microscopia óptica.

O processo de amplificação foi realizado em termociclador (Mastercycler Personal, Eppendorf®) programado para desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos e 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 50 segundos, anelamento a 56°C por 1 minuto, amplificação a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 5 minutos.

3.9 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os produtos de DNA amplificados (*amplicons*) a partir da *n*PCR realizada tanto para *T. equi* quanto para *B. caballi*, foram posteriormente submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% (Agarose NA – Amersham Biosciences) em tampão TBE 1x. Um volume de 10µL dos produtos de PCR homogeneizados em 1,5µL de tampão de corrida foi inoculado em cada poço do gel. Como marcador de massa molecular, foi empregado o *DNA Ladder 1Kb* (Invitrogen).

As eletroforeses foram conduzidas em cuba horizontal programada para corrida a 90 V, durante 60 minutos. Após as corridas, os géis foram corados por imersão em solução de brometo de etídio (0,4 µg/mL) e os produtos amplificados visualizados e fotografados sob a luz ultravioleta em transiluminador de UV (Electronic UV Transilluminator, L-PIX TOUCH).

3.10 Cuidados nas reações de *nested* PCR e da PCR em tempo real

As amostras de DNA foram separadas em quatro alíquotas de 20µL, de forma que cada uma sofresse degelo no máximo três vezes, garantindo a integridade do DNA e a confiabilidade da técnica.

Em cada placa da qPCR foram adicionados dois controles positivos e dois controles negativos, sendo um controle negativo composto por água ultrapura (Nuclease-Free Water, Ambion®) pipetado na área de preparo da reação, e outro na área de pipetagem das amostras. Para garantir a reprodutibilidade do ensaio, cada amostra foi testada pela qPCR duas vezes, em placas distintas e a amplitude média de seus C_q foram comparadas.

Nas placas da *n*PCR foram adicionados quatro controles positivos e seis controles negativos, sendo dois controles negativos compostos por água ultrapura (Nuclease-Free Water, Ambion®) pipetados na área de preparo da reação, e outros quatro na área de pipetagem das amostras.

A extração de DNA, o preparo da reação e a pipetagem das amostras foram realizadas em ambientes separados, evitando contaminação. O preparo da reação e a pipetagem das amostras contendo DNA foram realizados em capela de fluxo laminar distintas, esterilizadas com luz UV (ultravioleta) imediatamente antes cada reação. Ponteiras com filtro foram utilizadas em todas as etapas do estudo. Todas as reações de PCR foram realizadas em sistema fechado.

3.11 Análise Estatística

Foi realizada uma análise descritiva da presença de carrapatos nas propriedades das duas microrregiões estudadas. Os valores médios da presença de carrapatos nas propriedades foram analisados em função da microrregião de origem através do teste Mann-Whitney, em nível de 5% de significância. A frequência de carrapatos nas propriedades foi analisada em função de cada microrregião de origem, através do teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de 5% de significância.

Para a análise das frequências obtidas nos diferentes métodos de captura de Ixodídeos, foi utilizado o teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de 5% de significância. Foi realizada uma análise descritiva das frequências de carrapatos infectados em função da espécie e do estágio evolutivo.

A presença de carrapatos nas pastagens das propriedades foi analisada em função do manejo sanitário e zootécnico da propriedade, das condições das instalações da propriedade, das criações de animais, da limpeza do pasto, da procedência dos equinos, da condição das pastagens, da presença de carrapatos nos equinos, da utilização de produto carrapaticida e da microrregião de origem através do teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de 5% de

significância.

Todas as análises foram feitas através do programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2010), utilizando a interface gráfica R-Studio (The R Project for Statistical Computing, <http://www.r-project.org>).

4 RESULTADOS

4.1 Aspectos epidemiológicos do estudo

Na Tabela 1 estão demonstrados os valores referentes à análise descritiva das propriedades com relação a presença de carrapatos nas duas microrregiões. Das 28 propriedades visitadas, 71,4% (n=20) apresentaram carrapatos nas pastagens. Do total de propriedades avaliadas da microrregião de Itaguaí (N=13), em 92,3% (n=12) foi observada a ocorrência de carrapatos na área de pastagem dos animais, diferindo significativamente ($p<0,05$) da microrregião Serrana (N=15), com 53,3% (n=8) desta ocorrência. Da mesma forma, analisando a média de carrapatos coletados por propriedade, foi possível verificar que o número médio±desvio-padrão de carrapatos coletados na microrregião de Itaguaí foi de 224,8±363,3 (amplitude: 0-1.131), sendo mais elevado ($p<0,05$) quando comparado a média±desvio-padrão de carrapatos coletados na microrregião Serrana, com 119,6±271,4 (amplitude: 0-896).

Tabela 1. Análise descritiva da ocorrência de carrapatos nas pastagens de propriedades de criação de equinos nas microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro, no período de janeiro a agosto de 2013.

Região	N	Prop. com carrapatos		Contagem de carrapatos nas propriedades			
		n	(%)	M	DP	EP	Amp.
Itaguaí	13	12	92,3 ^A	224,8 ^a	363,3	100,8	0 - 1131
Serrana	15	8	53,3 ^B	119,6 ^b	271,4	70,1	0 - 896
Total	28	20	71,4	168,4	315,7	59,7	0 - 1131

^ALetras iguais entre as colunas de mesma legenda não diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de 5% de confiança. ^aValores seguidos de mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente através do teste de Mann-Whitney a 5% de significância. Prop.: Propriedade; N: Total de Propriedades; n: Propriedades com carrapatos; M.: Média; DP: Desvio-padrão; EP: Erro-padrão. Amp.: Amplitude.

Em relação ao grau de infestação das pastagens (Leve, Moderada e Alta) das propriedades de acordo com a microrregião de origem, foi possível observar que, nas três categorias, a microrregião Serrana apresentou percentuais sempre inferiores em relação à microrregião de Itaguaí, em todas as categorias analisadas (Figura 4).

Na figura 5 está demonstrada a variação da infestação de carrapatos nas pastagens de acordo com os gêneros identificados nas propriedades analisadas e sua microrregião de origem. Em mais de 53,8% (n=7) das propriedades da microrregião de Itaguaí, os três gêneros de carrapatos foram encontrados simultaneamente nas pastagens. Já na microrregião Serrana, os três gêneros observados só foram detectados simultaneamente em menos de 6,7% (n=1) das propriedades com as áreas de pastagens infestadas. Na microrregião Serrana, em 26,7% (n=4) das propriedades, somente o gênero *Amblyomma* foi encontrado nas pastagens. Em 13,3% (n=2) das propriedades desta microrregião, as pastagens encontravam-se infestadas simultaneamente pelos gêneros *Amblyomma* e *Dermacentor*, enquanto 6,7% (n=1) pelo gênero *Rhipicephalus*. Por outro lado, em 15,4% (n=2) das propriedades da microrregião de Itaguaí foi possível constatar a presença simultânea dos gêneros *Amblyomma* e *Dermacentor*, e em 7,7% (n=1) das propriedades somente o gênero *Dermacentor* foi encontrado.

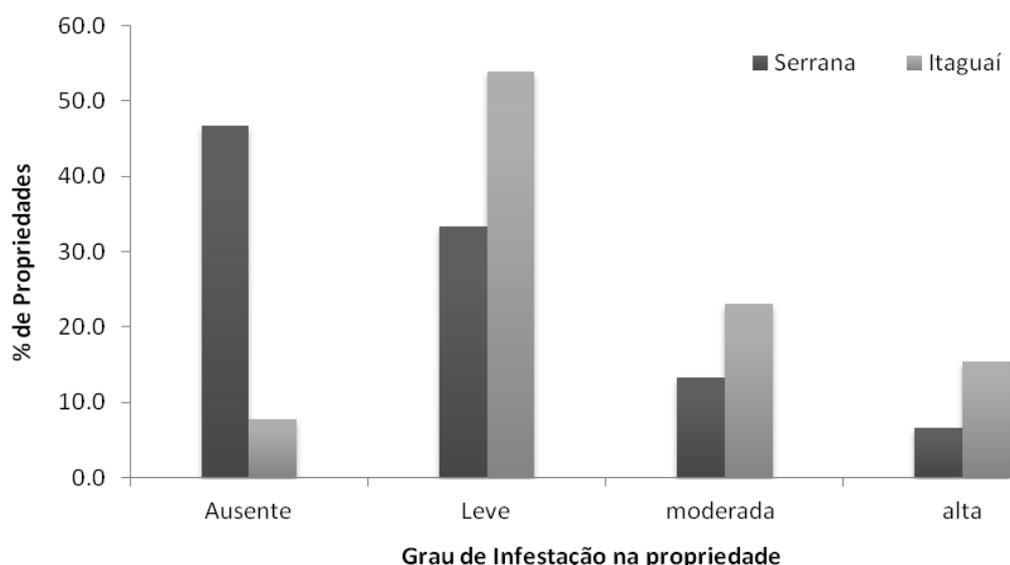


Figura 4. Variação do grau de infestação de carrapatos presentes nas pastagens de acordo com a microrregião de origem da propriedade, RJ.

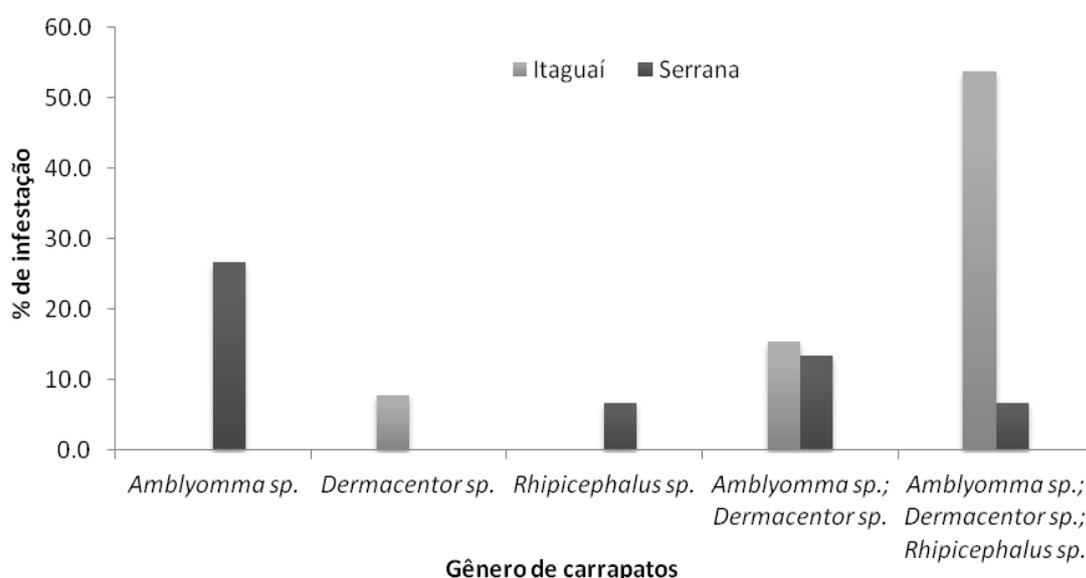


Figura 5. Variação da infestação de carrapatos presentes nas pastagens, de acordo com o número de gêneros identificados nas propriedades analisadas e a microrregião de localização, RJ.

Foram coletados um total de 4.716 Ixodídeos de fase de vida não parasitária em pastagens das Microrregiões de Itaguaí e Serrana. Destes carrapatos, 84,8% (n=3.997) pertenciam ao gênero *Amblyomma*, 10,9% (n=514) pertenciam ao gênero *Dermacentor* e 4,3% (n=205) ao gênero *Rhipicephalus* (Tabela 2). Em relação aos estágios evolutivos destes carrapatos, observou-se um total de 4.276 larvas coletadas, sendo 83,2% (n=3.558) de *Amblyomma*, 12,0% (n=514) de *Dermacentor* e 4,8% (n=204) de *Rhipicephalus*. Em relação às 431 ninfas coletadas, 100% (n=431) pertenciam à espécie *A. cajennense*. Do total de 9 adultos coletados, 88,9% (n=8) pertenciam à espécie *A. cajennense* e 11,1% (n=1) à espécie *R. (B.) microplus*.

Tabela 2. Identificação e frequência dos gêneros e estágios evolutivos de carrapatos coletados em propriedades de criações com equinos, em duas microrregiões do estado do Rio de Janeiro, no período de janeiro a agosto de 2013.

Estágio	N	<i>Amblyomma</i>		<i>Dermacentor</i>		<i>Rhipicephalus</i>	
		n	%	n	%	n	%
Larvas	4276	3558	83,2	514	12,0	204	4,8
Ninfas	431	431	100,0	0	0,0	0	0,0
Adultos	9	8	88,9	0	0,0	1	11,1
TOTAL	4716	3997	84,8	514	10,9	205	4,3

N: Número total de exemplares coletados por estágio evolutivo. n: número de carrapatos respectivos a cada gênero coletados por estágio evolutivo.

Na figura 6 pode-se observar que o maior número de exemplares de larvas de carrapatos coletados, nos três gêneros identificados, ocorreu no mês de junho. Em relação ao estágio ninfal, foram identificados somente exemplares da espécie *A. cajennense*, sendo estes obtidos com maior frequência nos meses de julho e agosto (Figura 7). Embora tenham sido coletados poucos exemplares adultos, a maior frequência obtida tanto os exemplares de *A. cajennense*, quanto de *R. (B.) microplus* ocorreu no mês de março (Figura 8). O período de observação dos exemplares de carrapatos coletados nas pastagens foi obtido analisando as duas microrregiões de janeiro a agosto de 2013.

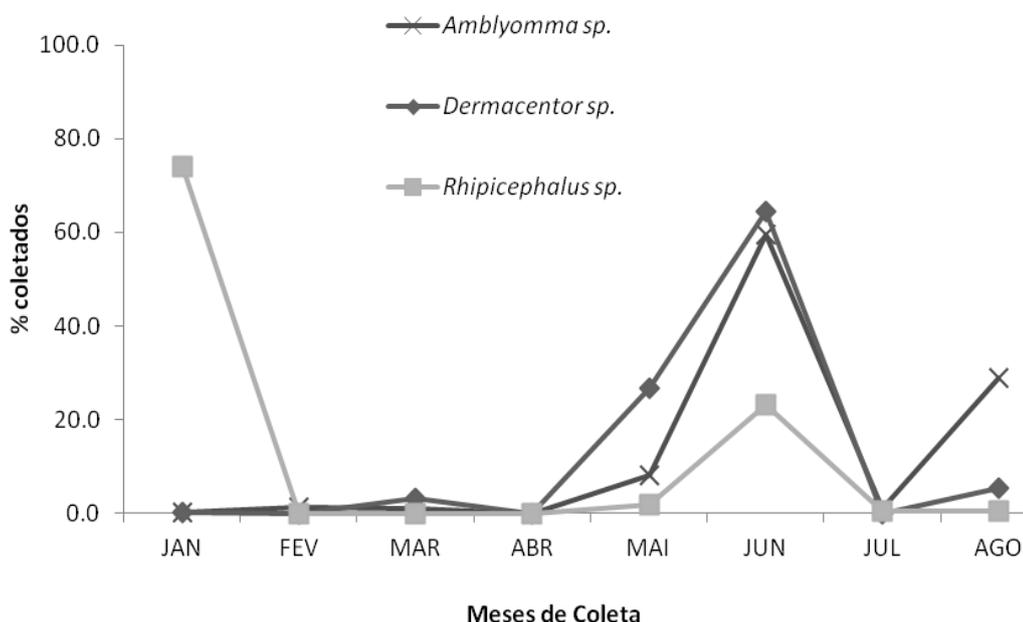


Figura 6. Percentual de larvas de carrapatos coletados de acordo com os gêneros e os meses de coleta, em duas microrregiões do estado do Rio de Janeiro, RJ.

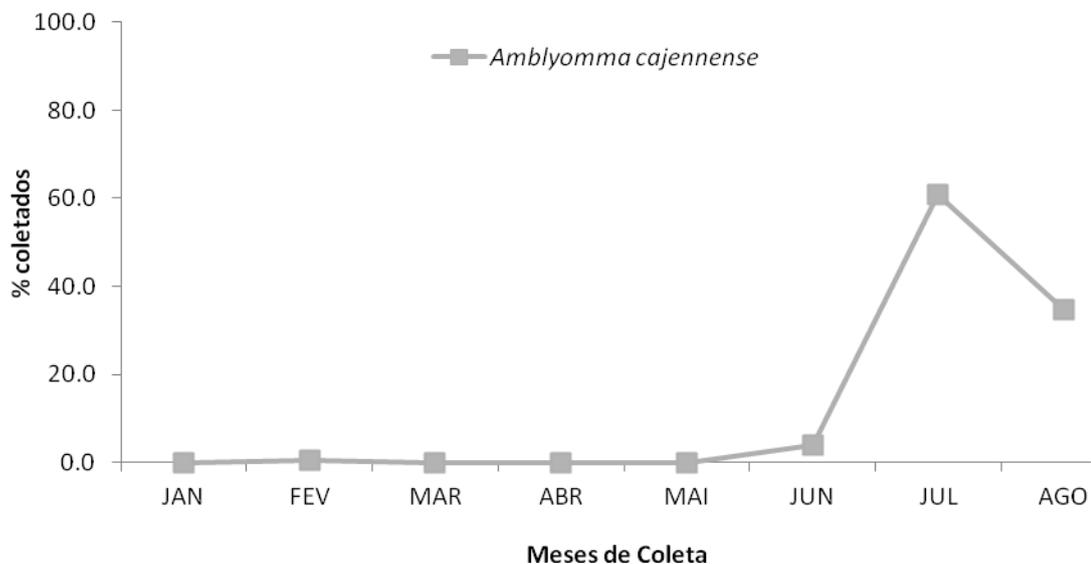


Figura 7. Percentual de ninfas de carrapatos coletados de acordo com a espécie e os meses de coleta, em duas microrregiões do estado do Rio de Janeiro, RJ.

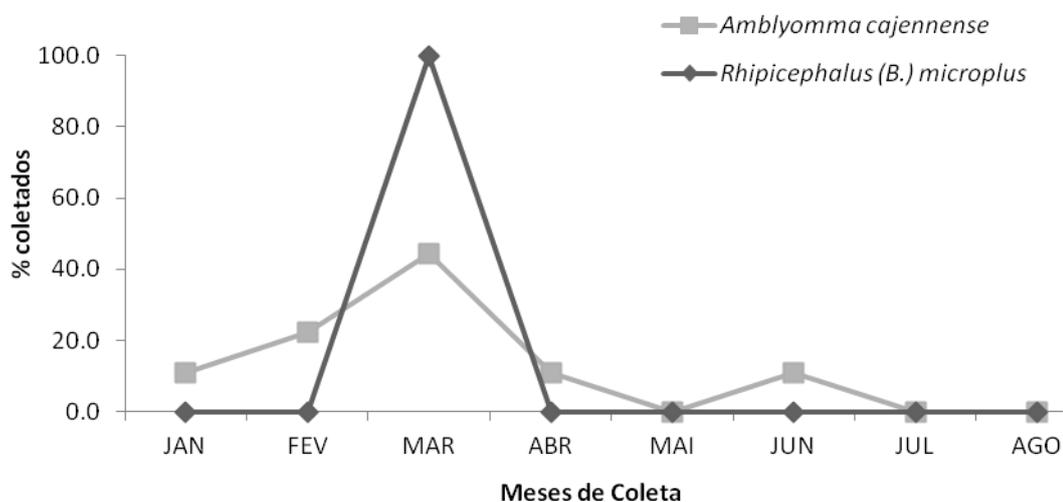


Figura 8. Percentual de adultos de carrapatos coletados de acordo com a espécie e os meses de coleta, em duas microrregiões do estado do Rio de Janeiro, RJ.

Dentre todas as variáveis analisadas através de análise bivariada em relação à criação dos animais (Tabela 3), somente a presença de carrapatos nos equinos apresentou associação estatística ($p < 0,05$, $RF = 3,6$) com a presença de carrapatos nas pastagens das propriedades.

Tabela 3. Análise bivariada da presença de carrapatos nas pastagens das propriedades analisadas em função do manejo sanitário e zootécnico da propriedade, condições das

instalações, criações de animais, limpeza do pasto, procedência dos equinos, condição das pastagens, da presença de carrapatos nos equinos, da utilização de produto carrapaticida, em duas microrregiões do estado do Rio de Janeiro.

Características das propriedades	N	(%)	Bivariada	
			P	RF
Manejo Sanitário e Zootécnico				
Baixa	7	85,7 ^a	0,51	1,43
Média	11	72,7 ^a		1,21
Alta	10	60,0 ^a		-
Condições das instalações				
Ruim	8	87,5 ^a	0,23	1,75
Moderado	12	75,0 ^a		1,50
Excelente	8	50,0 ^a		-
Criações de animais				
Somente Equinos	17	58,8 ^a	0,14	-
Equinos e Bovinos	11	90,9 ^a		1,55
Limpeza de pasto				
Não	5	100,0 ^a	0,28	1,53
Sim	23	65,2 ^a		-
Procedência dos equinos				
Interna	19	63,2 ^a	0,21	-
Externa	9	88,9 ^a		1,41
Condição da Pastagem				
Sujo	23	73,9 ^a	0,60	1,23
Limpo	5	60,0 ^a		-
Presença de carrapatos nos equinos				
Sim	20	90,0 ^a	0,00	3,6
Não	8	25,0 ^b		-
Usa produto carrapaticida				
Sim	25	72,0 ^a	0,98	1,10
Não	3	66,7 ^a		-

N: Número de propriedades analisadas; P: p-valor; Teste Exato de Fisher; RF: Razão de frequência.

Em relação ao estágio evolutivo dos carrapatos e os métodos de coleta utilizados, observou-se que do total de larvas coletadas através destes métodos (4.038), 3,8% (n=152) foram capturadas através de armadilha de CO₂ e 96,2% (n=3886) pelo método de arraste de flanela. Das 406 ninfas coletadas, 12,1% (n=49) foram capturadas pela armadilha de CO₂, enquanto 87,9% (n=357) foram coletadas pelo método de arraste de flanela. Em relação aos adultos, 33,3% (n=1) foram coletados através de armadilha de CO₂ e 66,7% (n=2) pelo método de arraste de flanela sobre a vegetação (Tabela 4).

É importante destacar que foram retirados desta análise comparativa entre técnicas de coleta, 269 espécimes obtidos através de coleta manual sobre as roupas dos próprios pesquisadores, durante a vistoria da propriedade, no percurso do ambiente de permanência dos animais da criação. Devido a este procedimento, o número de exemplares dos espécimes adultos que seriam analisados ficou reduzido consideravelmente, em comparação ao número de exemplares dos demais estágios biológicos, sendo, portanto, retirados da análise comparativa entre técnicas de captura.

Ainda na tabela 4, sob a ótica dos métodos de coleta, observou-se que na armadilha de CO₂ foi possível coletar uma porcentagem maior de ninfas quando comparado à população de

larvas. Por outro lado, no arraste de flanela sobre a vegetação, a porcentagem de larvas coletadas foi maior que a população do outro estágio.

Tabela 4. Análise comparativa dos métodos de arraste de flanela e armadilha de CO₂ para captura de estágios evolutivos de carrapatos em propriedades de criações de equinos, em duas microrregiões do estado do Rio de Janeiro, no período de janeiro a agosto de 2013.

Estágio	N	Armadilha de CO ₂		Arraste de flanela	
		N	%	n	%
Larvas	4038	152	3,8 ^{aA}	3886	96,2 ^{bA}
Ninfas	406	49	12,1 ^{aB}	357	87,9 ^{bB}
Adultos	3 ^{**}	1	33,3	2	66,7
Total	4447 [*]	202	4,5	4245	95,5

^aValores seguidos de mesma letra, na mesma linha, não diferem significativamente através do teste Qui-Quadrado, a 5% de significância. ^AValores seguidos de mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente através do teste Qui-Quadrado, a 5% de significância. *Foram retiradas 269 espécimes desta análise, pois foram coletadas nas roupas do operador das armadilhas utilizadas. **Foram retirados da análise devido ao baixo número de exemplares desta categoria.

4.2 Detecção Molecular de *Theileria equi* em carrapatos coletados de áreas de pastagem

Em relação à detecção de DNA alvo para *T. equi*, do total de *pool* de amostras de carrapatos analisadas, 5,8% (n=24) foram consideradas positivas pelas técnicas de qPCR (Figura 9) e *nested* PCR (Figura 10).

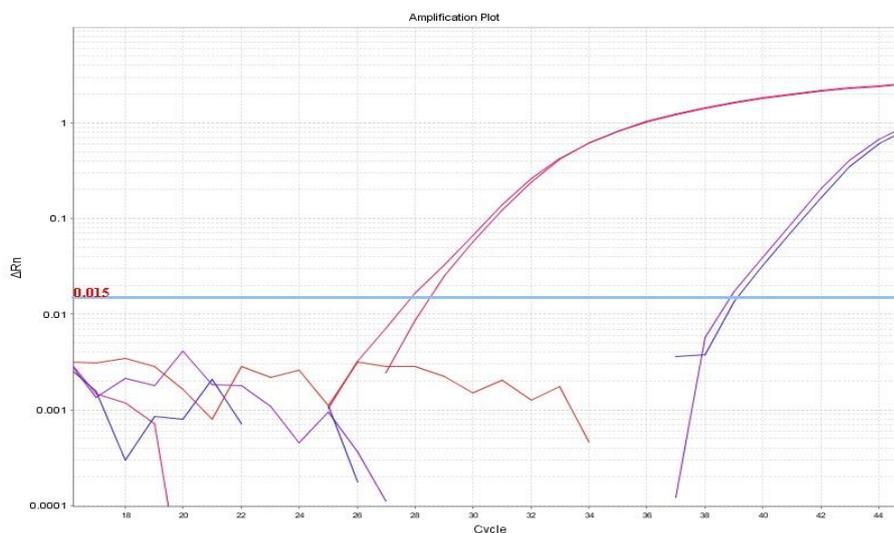


Figura 9. Gráfico de amplificação de um fragmento de 85pb do *gene 18S rRNA* de *Theileria equi* obtidas na PCR em tempo real utilizando o sistema TaqMan. Curvas de amplificação na cor rosa referem-se ao controle positivo, e em azul e roxo demonstram amostras de carrapatos consideradas positivas pela técnica.

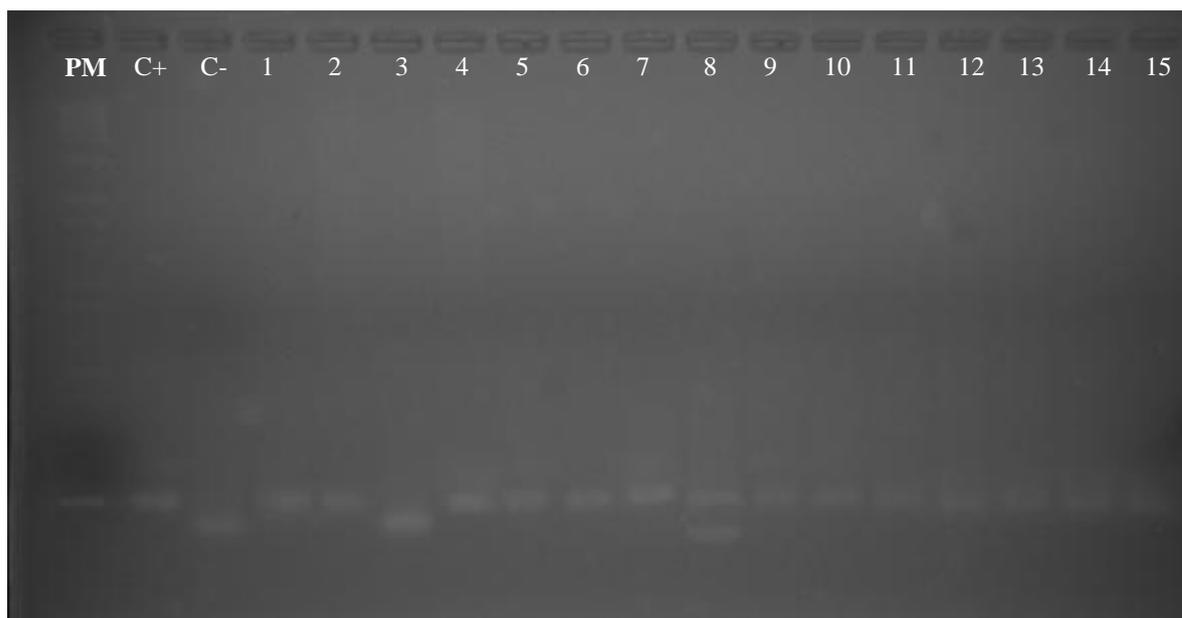


Figura 10. Gel de agarose (1,5%) com produtos da amplificação do fragmento de 102pb do gene *Ema-1* específico para *Theileria equi*. PM: Peso Molecular de 1kb; C+: controle positivo de *T. equi*; C-: controle negativo para *T. equi*; 1-2, 4-15: amostras consideradas positivas para *T. equi* pela técnica de *nested* PCR; 3: amostra considerada negativa para *T. equi*.

Desse total de positivos (n=24), observou-se que 75% (n=18) foi obtido de amostras de DNA de carrapatos do gênero *Amblyomma*, 20,8% (n=5) de amostras do gênero *Dermacentor* e 4,2% (n=1) das amostras do gênero *Rhipicephalus* após amplificação de um fragmento de 85pb do gene *18S rRNA* de *T. equi* através da qPCR. Sobre o total de cada gênero de carrapato analisado, observou-se que 5,1% (n=18) das amostras de *Amblyomma*, 13,2% (n=5) das amostras de *Dermacentor* e 4,0% (n=1) das amostras de *Rhipicephalus* apresentaram amplificação do DNA alvo de *T. equi* na qPCR (Tabela 5).

Analisando a frequência de positividade de *T. equi* nas amostras analisadas em relação ao estágio de vida dos carrapatos, observou-se uma frequência de 7,3% (n=19) para larvas e 3,5% (n=5) para ninfas (Tabela 5). Em relação às microrregiões analisadas, 8,6% (n=17) das amostras de carrapatos consideradas positivas pertenciam à microrregião de Itaguaí, e 3,2% (n=7) à microrregião Serrana (Tabela 5).

Tabela 5. Avaliação da amplificação do DNA alvo de *Theileria equi* através da PCR em tempo real em amostras de carrapatos, de acordo com o gênero, o estágio evolutivo e a microrregião de origem dos exemplares, no estado do Rio de Janeiro (continua).

Gênero de carrapato	N	Positividade para <i>Theileria equi</i> (qPCR)	
		N	%
<i>Amblyomma</i>	351	18	5,1
<i>Dermacentor</i>	38	5	13,2
<i>Rhipicephalus</i>	25	1	4,0
TOTAL	414	24	5,8

Tabela 5. Continuação.

Estágio	N	N	%
Larvas	261	19	7,3
Ninfas	144	5	3,5
Adultos	9	0	0,0
TOTAL	414	24	5,8

Microrregião	N	N	%
Itaguaí	197	17	8,6
Serrana	217	7	3,2
TOTAL	414	24	5,8

Na Tabela 6 pode-se observar que 68,4% (n=13) destas larvas positivas pertenciam ao gênero *Amblyomma*, enquanto 26,3% (n=5) pertenciam ao gênero *Dermacentor* e 5,3% (n=1) ao gênero *Rhipicephalus*. Das amostras de ninfas positivas, 100,0% (n=5) eram do gênero *Amblyomma*. Nas amostras de carrapatos adultos, não foi detectado o fragmento de DNA alvo de *T. equi*.

Tabela 6. Avaliação das amostras de carrapatos positivas para *Theileira equi* através da PCR em tempo real de acordo com o gênero e o estágio evolutivo dos exemplares, no estado do Rio de Janeiro.

Estágio	N	<i>Amblyomma</i>		<i>Dermacentor</i>		<i>Rhipicephalus</i>	
		N	%	n	%	n	%
Larvas	19	13	68,4	5	26,3	1	5,3
Ninfas	5	5	100,0	0	0,0	0	0,0
Adultos	0	0	0	0	0,0	0	0,0
TOTAL	24	18	75	5	20,8	1	4,2

N: Número total de exemplares positivos para *Theileira equi* por estágio evolutivo. n: número de carrapatos respectivos a cada gênero coletados por estágio evolutivo.

4.3 Sensibilidade analítica da PCR para a detecção de *B. caballi*

Observou-se que o limite de detecção do DNA do controle positivo para *B. caballi* utilizando diluições seriadas foi de 10^{-4} ng/ μ L. Quando estas diluições foram complexadas com DNA de *A. cajennense* oriundo de colônia livre deste hemoparasito, o limite de detecção foi de 10^{-3} ng/ μ L. Já quando complexadas com DNA de *Dermacentor nitens* oriundo de colônia livre de hemoparasitos, o limite de detecção foi de 10^{-4} ng/ μ L (Figura 11 A, B, C).

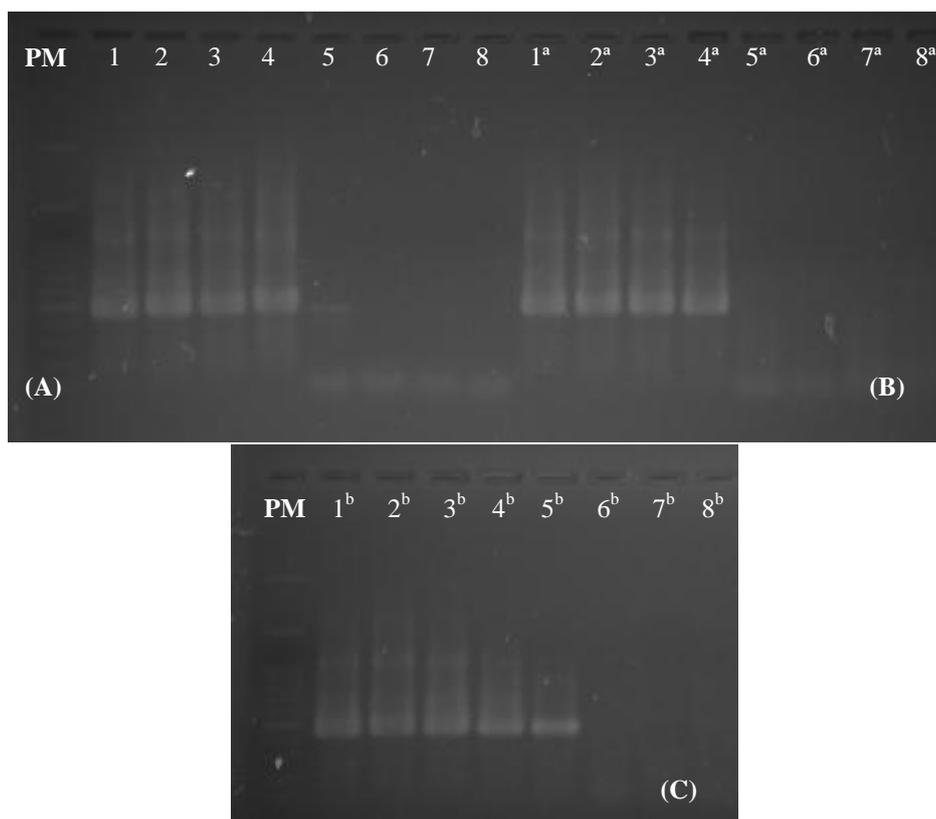


Figura 11. Gel de agarose (1,5%) com produtos da amplificação do fragmento de 430pb do gene BC48, específico para *Babesia caballi*. PM: Peso Molecular de 1kb; Amostras de DNA controle positivo para *B. caballi* através da PCR, em diluições seriadas de 1 à 8 (10ng/μL a 10⁻⁷ ng/μL). (A) Amostras de DNA controle positivo de *Babesia caballi*; (B) Amostras de DNA controle positivo de *Babesia caballi* + DNA de *Amblyomma cajennense*; (C) Amostras de DNA de controle positivo de *Babesia caballi* + DNA de *Dermacentor nitens*.

4.4 Detecção molecular de *Babesia caballi* em carrapatos coletados de áreas de pastagem

Do total de *pools* de carrapatos analisados (n=414), 1,9% (n=8) apresentaram amplificação do fragmento de DNA alvo do gene BC48 (Figura 12), específico para *B. caballi* através da *nested* PCR.



Figura 12. Gel de agarose (1,5%) com produtos da amplificação do fragmento de 430pb do gene BC48, específico para *Babesia caballi*. PM: Peso Molecular de 1kb; C+: controle positivo de *B. caballi*; C-: controle negativo; 1-2: amostras consideradas positivas para *B. caballi* pela técnica da *nested* PCR; 3-4: amostras consideradas negativas para *B. caballi*.

Na Tabela 7 pode-se observar que 1,7% (n=6) das amostras pertencentes ao gênero *Amblyomma* e 5,3% (n=2) das amostras do gênero *Dermacentor* amplificaram o fragmento alvo de 430bp. Dentre as amostras pertencentes ao gênero *Rhipicephalus*, não foi possível detectar o fragmento alvo do DNA de *B. caballi*.

Analisando a frequência de *B. caballi* em relação ao estágio de vida dos carrapatos, pode-se observar que 1,5% (n=4) das amostras de larva, 2,1% (n=3) das ninfas e 11,1% (n=1) dos adultos foram considerados positivos para o agente (Tabela 7). Dentre as amostras de larvas positivas, 50,0% (n=2) pertenciam ao gênero *Amblyomma* e 50,0% (n=2) ao gênero *Dermacentor* (Tabela 8). 100,0% (n=3) das ninfas positivas pertenciam ao gênero *Amblyomma*, assim como 100,0% (n=1) dos adultos positivos.

Em relação às microrregiões analisadas, em 2,0% (n=4) das amostras da microrregião de Itaguaí e em 1,8% (n=4) da microrregião Serrana foi possível detectar a presença do DNA alvo de *B. caballi*.

Tabela 7. Frequência do DNA alvo de *Babesia caballi* através da *nested* PCR (nPCR) em amostras de carrapatos, de acordo com o gênero, o estágio evolutivo e a microrregião de origem dos exemplares, no estado do Rio de Janeiro.

Gênero de carrapato	N	Positividade para <i>Babesia caballi</i> (nPCR)	
		n	%
<i>Amblyomma</i>	351	6	1,7
<i>Dermacentor</i>	38	2	5,3
<i>Rhipicephalus</i>	25	0	0,0
TOTAL	414	8	1,9

Estágio	N	n	%
Larvas	261	4	1,5
Ninfas	144	3	2,1
Adultos	9	1	11,1
TOTAL	414	8	1,9

Microrregião	N	n	%
Itaguaí	197	4	2,0
Serrana	217	4	1,8
TOTAL	414	8	1,9

Tabela 8. Avaliação das amostras de carrapatos positivas para *Babesia caballi* através da *nested* PCR de acordo com o gênero e o estágio evolutivo dos exemplares, no estado do Rio

de Janeiro.

Estágio	N	<i>Amblyomma</i>		<i>Dermacentor</i>		<i>Rhipicephalus</i>	
		n	%	n	%	n	%
Larvas	4	2	50,0	2	50,0	0	0,0
Ninfas	3	3	100,0	0	0,0	0	0,0
Adultos	1	1	100,0	0	0,0	0	0,0
TOTAL	8	6	75	2	25	0	0,0

N: Número total de exemplares positivos para *Babesia caballi* por estágio evolutivo. n: número de carrapatos respectivos a cada gênero coletados por estágio evolutivo.

5 DISCUSSÃO

5.1 Aspectos epidemiológicos do estudo

Diversos estudos relatam que *A. cajennense*, *D. nitens* e *R. (B.) microplus* são as três espécies de carrapatos que infestam equinos no Brasil, sendo *R. (B.) microplus* menos comum nestes animais (MORENO et al., 1984; FALCE et al., 1986; HEUCHERT et al., 1999; LABRUNA et al., 2001). Esse estudo corrobora com essas afirmações, já que essas três espécies e/ou gêneros foram encontradas nas coletas realizadas em pastagens frequentadas por equinos. De acordo com Oliveira et al. (2000), o gênero *Amblyomma* é o mais frequentemente encontrado parasitando equinos no Brasil, sustentando os resultados obtidos neste estudo. Os equinos agem como hospedeiros primários ou preferenciais para *D. nitens* e *A. cajennense*, com o estabelecimento de populações de ambas as espécies em áreas habitadas por equinos, não dependendo da presença de outras espécies hospedeiras (LABRUNA et al., 2001). Por outro lado, os equinos são hospedeiros secundários ou alternativos para *R. (B.) microplus*, sendo a presença desse carrapato dependente da presença de bovinos (hospedeiro primário) em áreas de pastoreio com equinos (MORENO, 1984; HEUCHERT et al., 1999; LABRUNA et al., 2001). Esses dados justificam a menor frequência do gênero *Rhipicephalus* quando comparado com os outros dois gêneros, já que na maioria das propriedades avaliadas não havia criação de bovinos na mesma pastagem que os equinos.

Relacionado à flutuação dos espécimes de carrapatos, observamos neste estudo que, os picos de larvas de *A. cajennense* ocorreram nos meses de junho e agosto, concordando com outros trabalhos em áreas de campo realizados na Argentina (GUGLIELMONE et al., 1982), Trinidad (SMITH et al., 1975) e Brasil (SOUZA; SERRA-FREIRE, 1994; OLIVEIRA et al., 2000; LABRUNA et al., 2002), onde os picos de larvas desta espécie se concentraram na estação mais fria e seca, de abril a outubro.

O estágio de ninfa de *A. cajennense* ocorreu com maior frequência nos meses de julho e agosto (segundo semestre), período que coincide com vários estudos realizados no Brasil, Trinidad e Argentina (SMITH et al., 1975; GUGLIELMONE et al., 1982; SOUZA; SERRA-FREIRE, 1994; OLIVEIRA et al., 2000; LABRUNA et al., 2002), onde as ninfas desta espécie foram observadas com maior frequência nesta época do ano, sendo raras no primeiro semestre do ano.

A elevada frequência de adultos de *A. cajennense* coletados no mês de março está de acordo com o padrão sazonal conhecido para esta espécie de carrapato na região Sudeste do Brasil (SOUZA; SERRA-FREIRE, 1994; LEMOS et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2000; LABRUNA et al., 2002), coincidindo com os índices mais elevados de precipitação pluviométrica, umidade relativa e temperatura, observado nos meses de novembro a março.

Alguns estudos demonstraram que o carrapato *A. cajennense* desenvolve apenas uma geração por ano na região Sudeste do Brasil (SERRA-FREIRE et al., 1982; SOUZA et al., 1990; SOUZA; SERRA-FREIRE, 1994; OLIVEIRA et al., 2000; LABRUNA et al., 2002), o que explica uma ocorrência sazonal bem definida de seus estágios. Em relação à dinâmica sazonal de *D. nitens*, entende-se que ocorrem de três a quatro gerações por ano (SOUZA et al., 1990; BORGES et al., 2000). O padrão de infestação por *D. nitens* é caracterizado por diferentes picos ao longo do ano (LABRUNA et al., 2002), dificultando estabelecer um padrão sazonal bem definido entre os diferentes estágios. Do mesmo modo, *R. (B.) microplus* é caracterizado por um ciclo biológico curto, completando 2 a 3 gerações por ano em regiões onde a temperatura é mais amena (Sul do país) e até 5 gerações em locais mais quentes (Sudeste). Foi observado também que a densidade populacional de cada estágio dos Ixodídeos pode variar de acordo com a ação de predadores naturais, condições climáticas desfavoráveis,

período prolongado em busca por hospedeiros e mecanismos imunológicos destes hospedeiros (OLIVEIRA et al., 2000).

Oliveira et al. (2000) demonstraram que a ocorrência de carrapatos nas pastagens pode variar devido a fatores climáticos e ambientais relacionados a cada região estudada, e também devido a diferentes metodologias utilizadas. Isso pode ser visto no presente estudo, onde observou-se que na microrregião de Itaguaí, a frequência de propriedades com áreas de pastagens infestadas por carrapatos foi superior àquela observada na microrregião Serrana. Possivelmente, os fatores climáticos e de manejo das propriedades de criação equina da microrregião de Itaguaí pode ter favorecido a biologia desses ectoparasitos, contribuindo para a perpetuação e dispersão dos carrapatos nas áreas de pastagem.

As áreas de pastagem em propriedade de criação equina na microrregião Serrana tiveram o grau de infestação inferior em relação à microrregião de Itaguaí, fato também observado por Pires (2013), demonstrando que temperaturas mais baixas (microrregião Serrana) não são favoráveis ao desenvolvimento e reprodução dos carrapatos vetores (CHÁCON et al., 2003). *Amblyomma cajennense* está amplamente distribuído no Brasil, exceto nos estados onde as temperaturas são mais baixas, o que possivelmente limita seu estabelecimento (LABRUNA et al., 2001). Associado às condições climáticas e ambientais desfavoráveis, existem as condições de manejo e tecnificação das propriedades da microrregião Serrana que é superior às condições observadas na microrregião de Itaguaí.

Os carrapatos são extremamente bem adaptados a determinadas condições ambientais, tais como o clima, a vegetação (KLOMPEN et al., 1996), e a presença de espécies de hospedeiros (HOOGSTRAAL; AESCHLIMANN, 1982), sendo portanto, fatores que limitam sua distribuição em diferentes áreas. No presente estudo observou-se que na maioria das propriedades da microrregião de Itaguaí, os três gêneros de carrapatos encontrados estavam presentes simultaneamente nas pastagens, fato pouco observado na microrregião Serrana.

O Brasil é um país grande, com várias regiões ecologicamente distintas, onde os equinos são criados para fins diferentes (LABRUNA et al., 2001), e estão amplamente distribuídos pelo país. Os carrapatos são parasitas obrigatórios de grande parte dos vertebrados terrestres, dentre eles os equinos, dependendo desse hospedeiro para completar o seu ciclo biológico. Por este motivo, a presença de carrapatos nas pastagens foi uma variável fortemente associada ($p < 0,05$, $RF=3,6$) com a presença de carrapatos nos equinos. A presença de pastos “sujos” e a periodicidade na limpeza da pastagem não influenciou a presença de carrapatos coletados à pasto no estudo. Estes fatores têm influencia direta na presença e no grau de infestação por carrapatos, conforme estudo realizado por Labruna et al. (2001), onde observaram que propriedades com pasto “sujo” (com crescimento simultâneo de diferentes forrageiras e presença de arbustos) foi um fator associado não só a presença de carrapatos nos animais como também ao maior grau de infestação neles. Além disso, a limpeza periódica do pasto também tem papel fundamental na manutenção da pastagem, evitando o estabelecimento de plantas invasoras e expondo o solo, podendo afetar significativamente as condições microclimáticas ideais para a sobrevivência e o desenvolvimento dos carrapatos (LABRUNA et al., 2001).

A predominância de larvas capturadas através do arrasto de flanela em comparação com a armadilha de CO₂ observada no presente estudo estão de acordo com os resultados obtidos por Oliveira et al. (2000), onde a técnica do arraste de flanela branca foi um método eficiente para captura de larvas de carrapatos. Por outro lado, embora em menor número, esta técnica também foi capaz de coletar ninfas quando comparado com a armadilha de CO₂. Esta foi menos eficiente na coleta de todos os estágios de carrapatos quando comparada ao arraste de flanela, discordando com Solberg et al. (1992) e Wilson et al. (1972), que referiram serem estas armadilhas eficientes para a coleta de todos os estágios de carrapatos, nos Estados Unidos. Contudo, sob a ótica deste método de coleta em específico, observou-se que na

armadilha de CO₂ foi possível coletar uma porcentagem maior de ninfas quando comparado à população de larvas, corroborando com Oliveira et al. (2000).

5.2 Detecção Molecular de *Theileria equi*

Determinadas espécies de carrapatos são vetores e hospedeiros de *T. equi* (STILLER; COAN, 1995), que realizam uma parte do seu ciclo de desenvolvimento no vetor, semelhante a outros hemoparasitos do filo Apicomplexa (ZAPF; SCHEIN, 1994). Até o momento, sabe-se que a transmissão experimental de *T. equi* está associada à carrapatos do gênero *Rhipicephalus* (GUIMARÃES et al., 1998; STILLER; COAN, 1995; DE WALL, 1992; UETI et al., 2005). Torres et al. (2012) verificaram que nas propriedades em que os equinos não conviviam diretamente com bovinos observou-se sorologia positiva para theileriose equina em 10 animais (40%), enquanto nas propriedades em que existia o convívio direto com bovinos observou-se sorologia positiva em 20 animais (90,9%), reforçando o envolvimento do carrapato *R. (B.) microplus*. Apesar das evidências, a participação dessa espécie de carrapato como vetor natural ainda não foi comprovada.

A circulação internacional de equinos portadores assintomáticos representa um risco para a introdução da piroplasmose equina em regiões livres da doença (Austrália, Grã-Bretanha, Japão, Estados Unidos e Canadá), mas a transmissão biológica ocorre somente em regiões com vetores competentes. Assim sendo, a presença do carrapato é essencial para que haja transmissão dos agentes da piroplasmose.

O presente estudo foi realizado em áreas endêmicas para *T. equi* no estado do Rio de Janeiro, onde estudos sorológicos e moleculares foram realizados (SANTOS, 2009; SANTOS et al., 2011; PECKLE et al., 2013). No presente estudo, observou-se a detecção de DNA alvo para *T. equi* em amostras de Ixodídeos.

Dentre os carrapatos do gênero *Rhipicephalus*, a positividade para *T. equi* encontrada no presente estudo corrobora com estudos citados anteriormente, que asseguram o envolvimento deste Ixodídeo na transmissão deste protozoário. Em relação ao gênero *Dermacentor*, Kerber et al. (2009) observaram que o alto nível de infestação por este carrapato esteve epidemiologicamente associado a soropositividade de equinos para *T. equi*. Além disso, estudos moleculares apontam para presença de DNA de *T. equi* em carrapatos deste gênero coletados a campo (BATTSETSEG et al., 2001; 2002). Porém, sua participação como vetor não foi comprovada. No presente estudo, a detecção molecular de *T. equi* em *Dermacentor* é mais um indicativo da participação desta espécie de carrapato na transmissibilidade deste protozoário, contudo a simples detecção indica apenas que esta espécie de carrapato é capaz de se infectar, porém a capacidade de transmissão ainda é motivo de investigação.

A respeito da positividade para *T. equi* encontrada neste estudo em carrapatos do gênero *Amblyomma*, estudos como o de Kerber et al. (2009) e de Peckle et al. (2013) encontraram associação entre o alto nível de infestação por *A. cajennense* e a positividade dos equinos nestes estudo, sugerindo que esta espécie estaria atuando como vetor deste agente em condições naturais. Do mesmo modo, Scoles et al. (2011) observaram que carrapatos *A. cajennense* são capazes de adquirir a infecção naturalmente, e atuar como um vetor intraestadial experimental ao se alimentarem em equinos não infectados.

O envolvimento do gênero *Amblyomma* como vetor de *T. equi* cresce a medida que observa-se uma elevada distribuição natural desse carrapato em locais onde existem equinos soropositivos para theileriose. Além disso, todas as suas fases de vida são conhecidas por se alimentar de forma agressiva em seus hospedeiros. Por outro lado, estudos experimentais mostraram que esta espécie não atua como vetor competente de *T. equi* (DENNIG, 1988; STILLER; COAN, 1995; RIBEIRO et al., 2011).

Quando foi realizada a análise da frequência de carrapatos positivos para *T. equi* nas amostras analisadas em relação ao estágio de vida, observou-se larvas, dos três gêneros analisados, infectadas por *T. equi*, sugerindo a ocorrência de transmissão transovariana nestes carrapatos. Este resultado discorda de diversos estudos que afirmam ocorrer apenas transmissão transestadial e intraestadial de *T. equi* em carrapatos (GUIMARÃES et al., 1998; MEHLHORN; SCHEIN, 1998; UETI et al., 2005, 2008; SCOLES; UETI, 2013). Além disso, estudos experimentais realizados no laboratório de Hemoparasitos e Vetores da UFRRJ confirmam, através da qPCR, a infecção por *T. equi* em ovos de *R. (B.) microplus* (dados não publicados).

Essas descobertas são consideradas surpreendentes ao tempo que existe uma grande lacuna no conhecimento da transmissibilidade deste agente. A infecção destas espécies de carrapatos e estágios de desenvolvimento pode ser ratificada, porém a capacidade de transmissão não pode ser confirmada, conforme os resultados obtidos por Ribeiro et al. (2011). Sendo assim, estudos adicionais são necessários para caracterizar plenamente a capacidade vetorial destas espécies de carrapatos, como demonstrado em estudo realizado por Scoles et al. (2011) no Texas, EUA, onde foi caracterizada a capacidade vetorial de *A. cajennense* (transmissão intraestadial).

Nas microrregiões analisadas, a maioria das amostras de carrapatos consideradas positivas pertenciam à microrregião de Itaguaí. Isto está relacionado possivelmente às diferenças nos aspectos climáticos entre as microrregiões, além do grau de infestação das pastagens. Segundo Heim et al. (2007), a transmissão de hemoparasitos geralmente é influenciada pela dinâmica de populações de vetores, devido às condições climáticas, que podem favorecer uma melhor disseminação e proliferação de carrapatos vetores.

5.3 Detecção Molecular de *Babesia caballi*

Apesar do caráter endêmico da babesiose equina, as informações sobre os carrapatos vetores naturais e/ou experimentais ainda são limitadas (STILLER; COAN, 1995; TENTER; FRIEDHOFF, 1986). Até o presente momento, *D. nitens* é a única espécie de carrapato conhecida que transmite *B. caballi* em equinos no Novo Mundo (ROBY; ANTHONY, 1963).

Muitos estudos foram conduzidos no Brasil relacionados à epidemiologia da infecção por *B. caballi* em equinos (LINHARES et al., 1997; KERBER et al., 1999; RIBEIRO et al., 1995; PFEIFER-BARBOSA et al., 1995; PFEIFER-BARBOSA et al., 2000). No país, *A. cajennense* e *D. nitens* são os carrapatos mais comuns que infestam equinos (RIBEIRO et al., 1999).

No presente estudo, foi observada positividade para *B. caballi* em amostras de carrapatos dos gêneros *Amblyomma* e *Dermacentor*. Vale ressaltar que a porcentagem em *Dermacentor* foi mais elevada que a observada em *Amblyomma*, porém em números absolutos, este último gênero obteve uma frequência três vezes maior. Possivelmente este resultado foi obtido pelo fato de ter sido avaliado um número maior de carrapatos do gênero *Amblyomma*.

Em relação à positividade do gênero *Dermacentor*, sabe-se que *D. nitens* é um importante vetor de *B. caballi* (PFEIFER-BARBOSA et al., 1995), e que a transmissão natural deste protozoário no Brasil está associada a carrapatos desta espécie (PFEIFER-BARBOSA et al., 1992; LINHARES, 1994). Corroborando com estas afirmativas, Kerber et al. (2009) observaram uma associação entre o alto nível de infestação por *D. nitens* e a positividade de equinos para este agente.

A positividade encontrada no gênero *Amblyomma*, discorda de outros estudos que admitem a não participação deste carrapato na cadeia de transmissão de *B. caballi* (KERBER et al., 2009; PIRES, 2013). Porém, de acordo com os resultados obtidos neste estudo,

possivelmente esta espécie de carrapato é capaz de se infectar, no entanto a capacidade de transmissão deve ser investigada em estudos posteriores.

Analisando a frequência de *B. caballi* em relação ao estágio de vida dos carrapatos, pode-se observar nos três estágios de desenvolvimento uma positividade para o agente. Concordando com esses achados, Mujica (2002) observou formas de multiplicação deste protozoário em ovários e ovos de *D. nitens*. Além disso, Holbrook et al. (1968) apontam a ocorrência de transmissão transovariana de *B. caballi* nestes carrapatos, e Schwint (2008) considera todos os estágios desta espécie de carrapato vetores competentes, não sendo comprovada essa capacidade de transmissão por *A. cajennense*.

Dentre as microrregiões analisadas, a microrregião de Itaguaí teve maior positividade. Isso pode estar associado à diferença nos aspectos climáticos, além do grau de infestação das pastagens em cada microrregião, condições que podem favorecer uma melhor disseminação e proliferação de carrapatos vetores. Segundo Bastos et al. (1996), a temperatura de 18°C possui efeito deletério sobre a biologia de *D. nitens*, dificultando a dispersão ou manutenção desse carrapato em equinos. Esta temperatura é verificada em áreas de elevada altitude, como na microrregião Serrana.

6 CONCLUSÕES

O gênero *Amblyomma* é o carrapato mais frequentemente encontrado nas pastagens das microrregiões de Itaguaí e Serrana, no estado do Rio de Janeiro.

A microrregião de Itaguaí apresenta condições mais favoráveis à ocorrência simultânea de *Amblyomma*, *Dermacentor* e *Rhipicephalus* nas pastagens das propriedades avaliadas quando comparada a microrregião Serrana.

A infestação dos equinos por carrapatos é um fator determinante para a presença de carrapatos nas pastagens.

A armadilha de CO₂ é mais eficiente na coleta de ninfas, enquanto a técnica do arraste de flanela sobre a vegetação se destacou na captura de larvas dos carrapatos *Amblyomma*, *Dermacentor* e *Rhipicephalus*.

Dentre os carrapatos investigados no diagnóstico de *T. equi*, além do gênero *Rhipicephalus*, os gêneros *Amblyomma* e *Dermacentor* são capazes de se infectar por este protozoário de forma natural.

A detecção de *T. equi* em larvas de carrapatos do gênero *Amblyomma*, *Dermacentor* e *Rhipicephalus* indica que há ocorrência de transmissão transovariana nessas espécies.

Além do gênero *Dermacentor*, o gênero *Amblyomma* também é capaz de se infectar por *B. caballi* de forma natural.

A detecção de *B. caballi* em larvas de Ixodídeos reafirma a transmissão transovariana deste agente em seus vetores biológicos.

7 REFERÊNCIAS

- ALHASSAN, A.; GOVIND, Y.; TAM, N.T.; THEKISOE, O.M.; YOKOYAMA, N.; INOUE, N.; IGARASHI, I. Comparative evaluation of the sensitivity of LAMP, PCR and in vitro culture methods for the diagnosis of equine piroplasmosis. **Parasitology Research**, v.100, p.1165–1168, 2007.
- ALI, S.; SUGIMOTO, C.; ONUMA, M. Equine Piroplasmosis. **Journal of Equine Science**, v.7, n. 4, p. 67-77, 1996.
- ALLSOPP, M.T.E.P. The phylogeny of *Babesia*, *Theileria* and related parasites and the development of species-specific probes for diagnostic purposes. 1994. Tese (Doutorado). University of the Witwatersrand, Johannesburg, Johannesburg, South Africa.
- ALLSOPP, M.T.E.P.; LEWIS, B.D.; PENZHORN, B.L. Molecular evidence for transplacental transmission of *Theileria equi* from carrier mares to their apparently healthy foals. **Veterinary Parasitology**, v.148, n.2, p.130–136, 2007.
- American Veterinary Medical Association (2006). Equine Piroplasmosis Background.
- ARAGÃO, H.B.; FONSECA, F. Notas de Ixodologia, VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.59, p.115–155, 1961.
- BALDANI, C.D.; CANOLA, P.A.; NETO, J.C.L.; MACHADO, R.Z. In vitro culture, PCR, and nested PCR for the detection of *Theileria equi* in horses submitted to exercise. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 3, p. 550-558, 2008.
- BASTOS, K.M.S.; DAEMON, E.; FACCINI, J.L.H.; CUNHA, D.W. Efeito de diferentes temperaturas sobre a fase não parasitária de *Dermacentor (Anocentor) nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.5, n.1, p.29-32, 1996.
- BARREIRA, J.D.; ROSSI, M.I.D.; SILVA, G.V.O.; PIRES, F.A.; MASSARD, C.L. Caracterização morfológica e aspectos biológicos das formas evolutivas de *Babesia bigemina* (SMITH; KILBORNE, 1893) (Protozoa: Babesiidae) em *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.14, n.1, p.1-6, 2005.
- BARROS–BATTESTI, D.M.; ARZUA, M.; BECHARA, G.H. **Carrapatos de importância Médico-Veterinária da Região Neotropical**. Um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo, Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006, 223p.
- BASHIRUDDIN, J.B.; CAMMÀ, C.; REBÊLO, E. Molecular detection of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horse blood by PCR amplification of part of the 16S rRNA gene. **Veterinary Parasitology**, v.84, n.1-2, p.75-83, 1999.
- BATTSETSEG, B.; XUAN, X.; IKADAI, H.; JOSE, R.B.L.; BYAMBAA, B.; BOLDBAATAR, D.; BATTUR, B.; BATTSETSEG, G.; BATSUKH, Z.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; MIKAMI, T.; FUJISAKI, K. Detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in the *Dermacentor nuttalli* adult tick. **International Journal Parasitology**, v.31, p.384–386, 2001.
- BATTSETSEG, B.; LUCERO, S.; XUAN, X.; CLAVERIA, F.G.; INOUE N.; ALHASSAN, A.; KANNO, T.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; MIKAMI T.; FUJISAKI K. Detection of natural infection of *Boophilus microplus* with *Babesia equi* and *Babesia caballi* in Brazilian

- horses using nested polymerase chain reaction. **Veterinary Parasitology**, v.107, n.4, p.351-357, 2002.
- BHOORA, R.; FRANSSSEN, L.; OOSTHUIZEN, M.C.; GUTHRIE, A.J.; ZWEYGARTH, E.; PENZHORN, B.L.; JONGEJAN, F.; COLLINS, N.E. Sequence heterogeneity in the 18S rRNA gene within *Theileria equi* and *Babesia caballi* from horses in South Africa. **Veterinary Parasitology**, v.159, p.112-120, 2009.
- BHOORA, R.; QUAN, M.; MATJILA, P.T.; ZWEYGARTH, E.; GUTHRIE, A.J.; COLLINS, N.E. Sequence heterogeneity in the equi merozoite antigen gene (*ema-1*) of *Theileria equi* and development of an *ema-1*-specific TaqMan MGB™ assay for the detection of *T. equi*. **Veterinary Parasitology**, v.172, p.33-45, 2010.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; MASSARD, C.A. Aspectos epidemiológicos da babesiose Equina na microrregião Fluminense do Grande Rio-Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.4, n.1, p.13-17, 1997.
- BOLDBAATAR, D.; XUAN, X.; BATTSETSEG, B.; IGARASHI, I.; BATTUR, B.; BATSUKH, Z.; BAYAMBAA, B.; FUJISAKI, K. Epidemiological study of equine piroplasmiasis in Mongolia. **Veterinary Parasitology**, v.127, n.1, p.29-32, 2005.
- BORGES, L.M.F.; OLIVEIRA, P.R.; RIBEIRO, M.F.B. Seasonal dynamics of *Anocentor nitens* on horses in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.89, n.1, p.165-171, 2000.
- BOSE, R.; JORGENSEN, W.K.; DALGLIESH, R.J.; FRIEDHOFF, K.T.; DE VOS, A.J. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 57, n. 1/3, p. 61-74, 1995.
- BOTTEON, P.T.L.; MASSARD, C.L.; BOTTEON, R.C.C.M.; LOSS, Z.G.; LINHARES, G.F.C. Soroprevalence de *Babesia equi* em tres diferentes sistemas de criaçãde equinos. **Parasitologia Latinoamericana**, v. 57, n. 3-4, p. 141-145, 2002.
- BOTTEON, P.T.L.; BOTTEON, R.C.C.M.; REIS, T.P.; MASSARD, C.L. Babesiose em cavalos atletas portadores. **Ciência Rural**, v.35, n. 5, p.1136-1140, 2005.
- CAMACHO, A.T.; GUITIAN, F.J.; PALLAS, E.; GESTAL, J.J.; OLMEDA, A.S.; HABELA, M.A.; TELFORD III, S.R.; SPIELMAN, A. *Theileria (Babesia) equi* and *Babesia caballi* Infections in Horses in Galicia, Spain. **Tropical Animal Health and Production**, v.37, p.293-302, 2005.
- CANÇADO, P.H.D.; ZUCCO, C.A.; PIRANDA, E.M.; FACCINI, J.L.H.; MOURÃO, G.M. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) as a parasite of pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) and cattle in Brazil's Central Pantanal. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 42-46, 2009.
- CHACÓN, S.C.; CORREIA, P.G.; BARBIERI, F.S.; DAEMON, E.; FACCINI, J.L.H. Efeito de três temperaturas constantes sobre a fase não parasitária de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: ixodidae). **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.12, n.1, p.13-20, 2003.
- CLIFFORD, C.M.; ANASTOS, G. The use of chaetotax in the identification of larval ticks (Acarina: Ixodidae). **The Journal of Parasitology**, v.46, n.5, p.567-578, 1960.
- CORDERO del CAMPILLO, M.; ORDÁZ ALVAREZ, J.; ROJO VÁZQUEZ, F.A.; ESCUDERO DIAZ, A. Equine babesia infection in Spain. **Trabajos de la Estación Agrícola Experimental de León**, v. 11, p. 11-22, 1974.

- COSTA, R.P.; MELO, R.P. Nota prévia sobre a ocorrência de *Babesia caballi* (Nutall, 1910) em *Equus caballus* no Brasil. **Veterinária**, v.16, p.74-75, 1963.
- CUNHA, C.W.; SILVA, S.S.; RODRIGUES, A.L.; GUERREIRO, G. Avaliação do Efeito da Esplenectomia em Equinos Portadores e Livres de *Babesia* spp. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.6, n.2, p.157-160, 1997.
- CUNHA C.W.; SILVA S.S.; OSÓRIO B.L.; DUTRA C.L. Alterações hematológicas e sorológicas em equinos experimentalmente infectados com *Babesia equi*. **Ciência Rural**, v.28, p. 283-286, 1998.
- DE WALL, D.T.; HEERDEN, J. van; BERG, S.S. van den; STEGMANN, G.F.; POTGIETER, F.T. Isolation of pure *Babesia equi* and *Babesia caballi* organisms in splenectomized horses from endemic areas in South Africa. **Onderstepoort Journal Veterinary Research**, v.55, p.33-353, 1988.
- DE WALL, D.T. The transovarial transmission of *Babesia caballi* by *Hyalomma truncatum*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.57, p.99-100, 1990.
- DE WALL, D.T. Equine piroplasmiasis: a review. **British Veterinary Journal**, v.148, n.1, p.6-14, 1992.
- DE WALL, D.T.; HEERDEN, J.V. Equine Piroplasmiasis. **Infectious Diseases of Livestock**, USA: Oxford University Press, 2 ed., p.425-432, 2004.
- ECHAIDE, S.T.; DALGLIESH, D.P.; MCGUIRRE, T.C.; PALMER, G.H.; SUAREZ, C.E.; McELWAIN, T.F. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.777-782, 1998.
- DENNIG, F. Unsuccessful attempts at transmission of *Babesia equi* by *Anocentor nitens* and *Amblyomma cajennense*. 1988. 122f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Hannover Veterinary College, Hannover.
- DONNELLY, J.; PHIPPS, L.P.; WATKINS, K.L. Evidence of maternal antibodies to *Babesia equi* and *B. caballi* in foals of seropositive mares. **Equine Veterinary Journal**, v.14, n.126-128, 1982
- FALCE, H.C. Infestações múltiplas por Ixodídeos (Acari: Ixodidae) em bovinos e equídeos no primeiro planalto do Estado do Paraná. **Revista do Setor de Ciências Agrárias**, v.5, n.1-2, p.11-13, 1986.
- FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. Hemolytic anemias caused by blood rickettsial agents and protozoa. **Schalm's Veterinary Hematology**, 5 ed., p.154-62, 2000.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. **Embrapa-Cenargen**, 3 ed., p.103, 1998.
- FRIEDHOFF, K.T. Transmission of Babesia. In: RISTIC, M. **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 1988, p.23-52.
- FRIEDHOFF, K.T.; TENTER, A.M.; MULLER, I. Haemoparasites of equines: impact on international trade of horses. **Revue Scientifique et Technique (International office of Epizootics)**, v.9, n.4, p.1187 – 1194, 1990.
- FRIEDHOFF, K.T.; SOULÉ, C. An account on equine babesiosis. **Revue Scientifique et Technique (Office international Epizooties)**, v.15, n.3, p.1191-1201, 1996.

- FULGÊNCIO, G.O. Prevalência de oftalmopatias em cães Naturalmente infectados com *Leishmania (leishmania) chagasi* no município de Belo Horizonte – estudo clínico e histopatológico. 2006. 48f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.
- GUGLIELMONE A.A.; MANGOLD A.J.; HADANI A. *Amblyomma tigrinum* Koch, 1844 en la Argentina. Su diagnóstico erróneo como *Amblyomma maculatum* y su distribución geográfica. **Gac Veterinary**, v.44, p.57–63, 1982.
- GUIMARÃES, L.M.; ARAÚJO, T.L.; LACERDA JR, P.M.G. de. Ocorrência de nutaliose em equinos puro sangue de corrida, em São Paulo. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária de São Paulo**, v.4, p. 357-362, 1950.
- GUIMARÃES, A.M.; LIMA, J.D.; RIBEIRO; M.F.B.; CAMARGOS, E.R.S.; BOZZI, I.A. Ultrastructure of sporogony in *Babesia equi* in salivary glands of adult female *Boophilus microplus* ticks. **Parasitology Research**, v.60, p.69-74, 1998.
- HAILAT, N.Q.; LAFI, S.Q.; AL-DARRAJI, A.M.; AL-ANI, F.K. Equine babesiosis associated with strenuous exercise: clinical and pathological studies in Jordan. **Veterinary Parasitology**, v.69, n.1-2, p.1–8, 1997.
- HEIM, A.; PASSOS, LF.; RIBEIRO, M.F.B.; COSTA-JÚNIOR, L.; BASTOS, C.V.; CABRAL, D.D.; HIRZMANN, J.; PFISTER, K. Detection and molecular characterization of *Babesia caballi* and *Theileria equi* isolates from endemic areas of Brazil. **Parasitology Research**, v.102, n.1, p.63-68, 2007.
- HENRY, M.M. Hemolytic Anemia. In: ROBINSON, N. E. **Current Therapy in Equine Medicine**, v. 3. Philadelphia: Saunders, 1993, p.495-501.
- HEUCHERT, C.M.S.; GIULLI, V.; ATHAIDE, D.F.; BOSE, R.; FRIEDHOFF, K.T. Seroepidemiologic studies on *Babesia equi* and *Babesia caballi* infections in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.85, p.1-11, 1999.
- HOLBROOK, A.A.; ANTHONY, D.W.; JOHNSON, A.J. Observations on the Development of '*Babesia caballi* (Nuttall) in the Tropical Horse Tick *Dermacentor nitens* (Neumann). **Journal Protozoology**, v.15, n.2, p.391-396, 1968.
- HOLBROOK, A.A.; FRERICHES, W.M. Equine piroplasmiasis. **Proceedings, Annual Meeting of the United States Animal Health Association**, v.72, p.220-222, 1969.
- OMER, M.J.; AGUILAR-DELFIN, I.; TELFORD, S.R.; KRAUSE, P.J.; PERSING, D.H. Babesiosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, n.3, p.451-469, 2000.
- HOOGSTRAAL, H.; AESCHLIMANN, A. Tick host specificity. **Bulletin de la Société Entomologique Suisse**, v.55, p.5–32, 1982.
- IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Acesso em 17 de outubro de 2012.
- IKADAI, H.; NAGAI, A.; XUAN, X.; IGARASHI, I.; KAMIO, T.; TSUJI, N., OYAMADA, T.; SUZUKI, N.; FUJISAKI, K. Seroepidemiologic Studies on *Babesia caballi* and *Babesia equi* Infections in Japan. **Journal Veterinary Medicine Science**, v.64, n.4, p.325-328, 2002.
- KAPPMAYER, L.S.; THIAGARAJAN, M.; HERNDON, D.R.; RAMSAY, J.D.; CALER, E.; DJIKENG, A.; GILLESPIE, J.J.; LAU, A.O.T.; ROALSON, E.H.; SILVA, J.C.; SILVA, M.G.; SUAREZ, C.E.; UETI, M.W.; NENE, V.M.; MEALEY, R.H.; KNOWLES, D.P. Comparative genomic analysis and phylogenetic position of *Theileria equi*. **BMC Genomics**, v.13, n.603, p.1471-2164, 2012.

- KAWAZU, S.I.; KAMIO, T.; SEKIZAKI, T.; FUJISAKI, K. *Theileria sergenti* and *T. buffeli*: Polymerase chain reaction-based marker system for differentiating the parasite species from infected cattle blood and infected tick salivary gland. **Experimental Parasitology**, v.81, p.430-435, 1995.
- KERBER, C.E.; FERREIRA, F.; PEREIRA, M.C. Control of equine piroplasmiasis in Brazil. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.66, p.123-127, 1999.
- KERBER, C.E.; LABRUNA, M.B.; FERREIRA, F.; DE WAAL, D.T.; KNOWLES, D.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of equine Piroplasmiasis and its association with tick infestation in the State of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, n.4, p.1-8, 2009.
- KIM, C.M.; BLANCO, L.B.C.; ALHASSAN, A.; ISEKI, H.; YOKOYAMA, N.; XUAN, X.; IGARASHI, I. Diagnostic real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria equi* from equine blood samples. **Veterinary Parasitology**, v.151, p.158-163, 2008.
- KLOMPEN, J.S.H.; BLACK, W.C.I.V.; KEIRANS, J.E. OLIVER, J.H. JR. Evolution of ticks. **Annual Review of Entomology**, v.41, p.141-161, 1996.
- KNOWLES, D.P.; LOWELL, D.P.; KAPPEMEYER, S.; STILLER, D.; HENNAGER, S.G.; PERRYMAN, L.E. Antibody to a recombinant merozoite protein epitope identifies horses infected with *Babesia equi*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, p.3122-3126, 1992.
- KNOWLES, Jr.D. Equine babesiosis (Piroplasmiasis): a problem in the international movement of horses. **British Veterinary Journal**, v.52, n.2, p.123-126, 1996.
- KOBLUCK, C.N. Diseases of the hematopoietic system. In: SELTON, D. C. **The Horse, Diseases and Clinical Management**, vol. 2. Philadelphia: Saunders, 1995, p. 1073-110.
- KUMAR S.; GUPTA, A.K.; PAL, Y.; DWIVEDI, S.K. In-vivo therapeutic efficacy trial with artemisinin derivative, buparvaquone and imidocarb dipropionate against *Babesia equi* infection in donkeys. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.65, n.11, p.1171-7, 2003.
- KUTTLER, K.L. World-wide impact of babesiosis. In: RISTIC, M. **Babesiosis of Domestic Animals and Man**. Boca Raton: CRC Press, 1988, p.1-22.
- LABRUNA, M.B.; KERBER, C.E.; FERREIRA, F.; FACCINI, J.L.H.; DE WALL, D.T.; GENNARI, S.M. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the State of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.97, n.1, p.1-14, 2001.
- LABRUNA, M.B.; KASAI, N.; FERREIRA, F.; FACCINI, J.L.H.; GENNARI, S.M. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.105, n.1, p.65-77, 2002.
- LEMOS E.R.S.; MACHADO R.D.; AVILA PIRES F.D.; MACHADO S.L.; COSTA L.M.C.; COURA J.R. Rickettsiae-infected ticks in an endemic area of spotted fever in the state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.92, p.477-481, 1997.
- LEUTENEGGER, C.M. The Real-Time TaqMan PCR and Applications in Veterinary Medicine. **Veterinary Sciences Tomorrow**, v.1, p.1-15, 2001.
- LIMA, J.D.; BIONDINI, J.; REIS, R. Babesiose causada por *Babesia caballi* (Nuttal & Strickland, 1910) em um equino da raça Postier em Minas Gerais, Brasil. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, v.28, n.1, p.87-92, 1976.
- LINHARES, G.F.C. Aspectos biológicos e epidemiológicos das babesioses de equídeos, com ênfase à microrregião de Goiânia, Goiás, Brasil. 105f. Tese (Doutorado em Ciência). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

- LINHARES, G.F.C.; MASSARD, C.L.; ARAÚJO, J.L.B. Estudos sobre a epizootiologia de *Babesia caballi* (Nuttall; Strickland, 1910) na microrregião de Goiânia, Estado de Goiás. **Anais da Escola de Agronomia e Veterinária**, v.27, n.2, p.27-33, 1997.
- MAHONEY, D.F.; MIRRE, G.B. The selection of larvae of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infected with *Babesia bovis* (syn. *B. argentina*). **Research in Veterinary Science**, v.23, p.37-126-127, 1977.
- MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Acesso em 17 de outubro de 2012.
- MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. The piroplasm: Cycle and sexual stages. **Advance in Parasitology**, v. 23, p. 37-103, 1984.
- MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein 1998. **Parasitology Research**, v. 84, p. 467-475, 1998.
- MOLTMANN, U.G.; MEHLHORN, H.; SCHEIN, E.; REHBEIN, G., VOIGT, W.P.; ZWEYGARTH, E. Fine structure of *Babesia equi* Laveran, 1901 within lymphocytes and erythrocytes of horses: an in vivo and in vitro study. **Journal Parasitology**, v.69, p.111-120, 1983.
- MORENO, E.C. Incidência de ixodídeos em bovinos de leite e prevalência em animais domésticos da região metalúrgica de Minas Gerais, Belo Horizonte, M.G. 1984. 105f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- MORETTI, A.; MANGILI, V.; SALVATORI, R.; MARESCA, C.; SCOCCIA, E.; TORINA, A.; MORETTA, I.; GABRIELLI, S.; TAMPIERI, M.P.; PIETROBELLI, M. Prevalence and diagnosis of *Babesia and Theileria* infections in horses in Italy: A preliminar study. **The Veterinary Journal**, v.184, p.346-350, 2009.
- MUJICA, F.F.L. *Babesia caballi* (Nuttall & Strickland, 1912), Patogenia, transmissão e alterações hemocitárias no carrapato *Anocentor nitens* (Neumann, 1897), vetor biológico nas Américas. 2002. 106f. Tese (Doutorado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.
- NAVARRETE, I.; SERRANO F.J. Babesiosis. In: CAMPILLO, M.C.; VASQUEZ, F.A.R.; FERNANDEZ, A.R.M.; ACEDO, M.C.S.; RODRIGUEZ, S.H.; LOPEZ-COZAR, I.N.; BAÑOS, P.D.; ROMERO, H.Q.; VARELA, M.C. **Parasitologia Veterinária**. Madrid: McGraw-Hill – Interamericana de España.1999. p.587-592.
- NEITZ, W.O. Classification, transmission and biology of piroplasms of domestic animals. **Annals New York Academic Science**, v.64, n.2, p.56-111, 1956.
- NICOLAIEWSKY, T.B.; RICHTER, M.F.; LUNGE, V.R.; CUNHA, C.W.; DELAGOSTIN, O.; IKUTA, N.; FONSECA, A.S.; DA SILVA, S.S.; OZAKI, L.S. Detection of *Babesia equi* (Laveran, 1901) by nested polymerase reaction. **Veterinary Parasitology**, v.101, p.9-21, 2001.
- NOGUEIRA, C.E.W.; SILVA, S.S.; NIZOLI, L.Q.; RIBAS, L.M.; ALBUQUERQUE, L.P.A.N. Efeito quimioprolático do dipropionato de imidocarb na prevenção da agudização de babesiose equina em cavalos portadores da infecção. **A Hora Veterinária**, v.146, p.14-17. 2005.
- NUTTALL, G.H.F.; STRICKLAND, C. On the occurrence of two species of parasites in equine “Piroplasmosis” or “Biliary Fever”. **Parasitology**, v.5, n.1, 1912.

- OLIVEIRA, P.R.; BORGES, L.M.F.; LOPES, C.M.L.; LEITE, R.C. Population dynamics of the free-living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) on pastures of Pedro Leopoldo, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.92, n.4, p.295-301, 2000.
- PAULAUSKAS, A.; RADZIJEVSKAJA, J.; AMBRASIENE, D.; ROSEF, O. Detection of tick-borne pathogens by molecular methods. **Biologia**, v.54, n.3, p.192–197, 2008.
- PECKLE, M.; PIRES, M.S.; DOS SANTOS, T.M.; ROIER, E.C.; DA SILVA, C.B.; VILELA, J.A.; SANTOS, H.A.; MASSARD, C.L. Molecular epidemiology of *Theileria equi* in horses and their association with possible tick vectors in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitology Research**, v.112, n.5 p.2017-2025, 2013.
- PEREIRA, M.A.V.C.; MASSARD, C.L.; FACCINI, J.L.H.; SIQUEIRA, L.F.G. de. Ocorrência de *Babesia equi* (LAVERAN, 1901) e *Babesia caballi* (NUTTALL & STRICKLAND, 1912) em equos de raça Puro Sangue Inglês de pequenos estabelecimentos equestres. **Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo**, v.71, n.4, p. 405-409, 2004.
- PFEIFER-BARBOSA, I.B.; FRIEDHOFF, K.T.; MASSARD, C.L.; LINHARES, G.F.C. Diagnosis of natural infection with *Babesia caballi* (Nuttall & Strickland, 1910) in horses and *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) in Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v.15, n.1, p.105-107, 1992.
- PFEIFER-BARBOSA, I.B.F. Epidemiologische untersuchungen über infectionen von pferden mit *Babesia equi* und *Babesia caballi* in Brasilien. 1993. 109f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Escola de Medicina Veterinária de Hannover, Hannover.
- PFEIFER-BARBOSA, I.B.; BOSE, R.; PEYMANN, B.; FRIEDHOFF, K.T. Epidemiological aspects of equine babesioses in a herd of horses in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 58, v.1-2, p. 1-8, 1995.
- PFEIFER-BARBOSA, I.B.; MOLNÁR, L.É.; DIAS, T. Determination of the serological prevalence of equine babesioses by IFA Test in the state of Pará, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.9, p.7-10, 2000.
- PIRES, M.S. Aspectos epidemiológicos de *Rickettsia* sp. e *Babesia caballi* em equinos e carrapatos vetores em duas microrregiões do estado do Rio de Janeiro. 2013. 126f. Tese (Doutorado) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.
- R Development Core Team. R: *A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2009. [cited 2010 jan 31]. Available from: <http://www.R-project.org>.
- RAMPERSAD, J.; CESAR, E.; CAMPBELL, M.D.; SAMLAL, M.; AMMONS, D. A field evaluation of PCR for the routine detection of *Babesia equi* in horses. **Veterinary Parasitology**, v.114, n.2, p.81-87, 2003.
- REGO, B.M. da C.D. Estudo da infecção natural por protozoários dos géneros *Babesia* e *Theileria* numa exploração coudélica do Ribatejo. 2008. 69f. Tese (Doutorado). Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- RIBEIRO, M.F.B.; LIMA, J.D. Diagnóstico sorológico da babesiose equina por *Babesia equi* em Minas Gerais. In: 6º Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Bagé, p. 111, 1989.
- RIBEIRO, M.F.B.; SAITO, J.F.; PIMENTEL, P.V. Babesiose equina I – Primo-infecção de potros em área endêmica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.47, n.5, p.641-647, 1995.

- RIBEIRO, M.F.; COSTA, J.O.; GUIMARÃES, A.M. Epidemiological aspects of *Babesia equi* in horses in Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Research Communications**, v.23, n.6, p.385-390, 1999.
- RIBEIRO, M.F.B.; SILVEIRA, J.A.G.; BASTOS, C.V. Failure of the *Amblyomma cajennense* nymph to become infected by *Theileria equi* after feeding on acute or chronically infected horses. **Experimental Parasitology**, v.128, n.4, p.324-327, 2011.
- ROBERTS, L.S.; JANOVY, J. Parasitic Protozoa: Form, Function, and Classification. In:____, **Foundations of Parasitology**, 7 ed., 2005. p.42-60.
- ROBY, T.O.; ANTHONY, D.W. Transmission of equine piroplasmiasis by *Dermacentor nitens* Neumann. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.142, p.768-769, 1963.
- ROBY, T.O.; ANTHONY, D.W.; THORNTON, C.W.; HOLBROOK, A.A. The heredity transmission of *Babesia caballi* in the tropic horse ticks, *Dermacentor nitens*, Neumann. **American Journal of Veterinary Research**, v.25, p. 494-499, 1964.
- ROCHA, J.M.; COSTA, N.A.; VIEIRA FILHO, H.; ALENCAR, S.P. Diagnóstico da babesiose por *Babesia caballi* no Município de Garanhuns - PE. In: XXI Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Salvador, p. 202, 1988.
- RUDOLPH, W.; CORREA, J.; ZURITA, L.; MANLEY, W. Equine piroplasmiasis: leukocytic response to *Babesia equi* (Laveran, 1901) infection in Chile. **British Veterinary Journal**, v.131, p.601-609, 1975.
- SANTOS, T.M.; SANTOS, H.A.; MASSARD, C.L. Diagnóstico molecular de babesiose congênita em potros neonatos no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, n.1, p.348-350, 2008.
- SANTOS, N.M. Análise da influência da cobertura do solo sobre os valores das variáveis físicas da atmosfera em diferentes localidades no Estado do Rio de Janeiro. 2009. 37f. Monografia (Curso de Engenharia Florestal). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.
- SANTOS, T.M.; FERRAZ, P.Q.; ALMEIDA, F.Q.; MASSARD, C.L.; BALDANI, C.D.; BOTTEON, P.T.L.; SANTOS, H.A.; MACHADO, R.Z.; ANDRADE, C.M. Estudo comparativo de três métodos de diagnóstico para detecção de anticorpos anti-*Theileria equi* em equinos de áreas endêmicas do estado do Rio de Janeiro. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.46, n.6, p.484-490, 2009.
- SANTOS, T.M.; ROIER, E.C.R.; SANTOS, H.A.; PIRES, M.S.; VILELA, J.A.R.; MORAES, L.M.B.; ALMEIDA, F.Q.; BALDANI, C.D.; MACHADO, R.Z.; MASSARD, C.L. Factors associated to *Theileria equi* in equids of two microregions from Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.20, n.2, p.235-241, 2011.
- SCHEIN, E.; REHBEIN, G.; VOIGT, W.P.; ZWEYGARTH, E. *Babesia equi* (Laveran 1901) 1. Development in horses and in lymphocyte culture. **Tropenmedizin und Parasitologie, Stuttgart**, v.32, n.4, p.223-227, 1981.
- SCHEIN, E. Equine babesioses. In: RISTIC, M. **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton: CRS Press, 1988. p.197-208.
- SCHWINT, O.N.; KNOWLES, D.P.; UETI, M.W.; KAPPMAYER, L.S.; SCOLES, G.A. Transmission of *Babesia caballi* by *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) Is Restricted to

One Generation in the Absence of Alimentary Reinfection on a Susceptible Equine Host. **Journal of Medical Entomology**, v.45, n.6, p.1152-1155, 2008.

SCOLES, G.A.; HUTCHESON, H.J.; SCHLATER, J.L.; HENNAGER, S.G.; PELZEL, A. M.; KNOWLES, D.P. Equine Piroplasmiasis Associated with *Amblyomma cajennense* Ticks, Texas, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v.17, n.10, p.1903-1905, 2011.

SCOLES, G.A.; UETI, W.M. *Amblyomma cajennense* is an intrastadial biological vector of *Theileria equi*. **Parasites & Vectors**, v.6, n.306, 2013.

SERRA-FREIRE, N.M. Epidemiologia de *Amblyomma cajennense*: Ocorrência estacional e comportamento dos estágios não parasitários em pastagens do Estado do Rio de Janeiro. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v.5, p.187-193, 1982.

SIGRIST, B. Übertragung von *Babesia equi* durch *Hyalomma anatolicum anatolicum* und *Rhipicephalus turanicus*. 1983. 58f. Tese (Doutorado). Hannover School of Veterinary Medicine, Hannover.

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

SMITH, M.W. Some aspects of the ecology and lifecycle of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) in Trinidad and their influence on tick control measures. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.69, n.1, p.121-129, 1975.

SOLBERG, V.B.,K; NEIDHARDT, M.R.; SARDELIS, F.J.; HOFFMANN, R.; STEVENSON, L.R.; BOOBAR, H.J.; HARLAN. Field evaluation of two formulations of cyfluthrin for control of *Ixodes dammini* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v.29, p.634-638, 1992.

SONENSHINE, D.E.; ATWOOD, E.L.; LAMB JR., J.T. The ecology of ticks transmitting rocky mountain spotted fever in a study area in Virginia. **Annual Entomology Society of America**. v.59, p.1234-1262, 1966.

SOULSBY, E.J.L. Protozoos. In:____. **Parasitología y Enfermedades Parasitarias em los Animales Domésticos**. 7. ed. México: Nueva Editorial Interamericana, 1987, p.513-823.

SOUZA, A.P. Variação Populacional dos principais Ixodídeos parasitas de bovinos e equinos em diferentes condições de manejo, nos municípios de Paracambi e Itaguaí no Estado do Rio de Janeiro. 1990. 81f. Tese (Doutorado em Ciências em Medicina Veterinária). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, RJ.

SOUZA, A.P; SERRA-FREIRE, N.M. Variação sazonal da fase não parasitária de *Amblyomma cajennense* e *Anocentor nitens* no município de Itaguaí, RJ: Avaliação epidemiológica e metodológica. **Revista Universidade Rural: Série Ciência Vida**, v.16, n.1-2, p. 67-74, 1994.

STICH, R.W.; RIKIHISA, Y.; EWING, S.A.; NEEDHAN, G.R.; GROVER, D.L.; JITTAPALAPONG, S. Detection of *Ehrlichia canis* in canine carrier blood and in individual experimentally infected ticks with a pp30-based PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 540-546, 2002.

STILLER, D. et al. Transmission of equine babesiosis and bovine anaplasmosis by *Dermacentor albipictus*, (Packard) (Acari: Ixodidae). **Journal of the New York Entomological Society**, v. 88, p.75-76, 1980.

- STILLER, D.; COAN, M.E. Recent developments in elucidating tick vector relationships for anaplasmosis and equine piroplasmosis. **Veterinary Parasitology**, v.57, p.97-108, 1995.
- STILLER, D.; GOFF, W.L.; JOHNSON, L.W.; KNOWLES, D.P. *Dermacentor variabilis* and *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae): experimental vectors of *Babesia equi* to equids. **Journal of Medical Entomology**, v.39, p.667–670, 2002.
- TANAKA, T. et al. Expression of *Babesia equi* merozoite antigen-2 by recombinant baculovirus and its use in the ELISA. **International Journal of Parasitology**, v.29, n.11, p.1803-1808, 1999.
- TAYLOR, W.M.; BRYANT, J.E.; ANDERSON, J.B; WILLERS, K.H. Equine piroplasmosis in the United States: a review. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.155, p.915-919, 1969.
- TENTER, A.M.; FRIEDHOFF, K.T. Serodiagnosis of experimental and natural *Babesia equi* and *B. caballi* infections. **Veterinary Parasitology**, v.20, n.1-3, p.49-61, 1986.
- THOMPSON, P.H. Ticks as vectors of equine piroplasmosis. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.155, p.454-457, 1969.
- TORRES, A.J.; FINGER, I.S.; FARIAS, N.A.R.; NIZOLI, L.Q.; SILVA, S.S.; NOGUEIRA, C.E.W. Aspectos epidemiológicos da Theileriose equina e sua relação com o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em duas propriedades na região da campanha do Rio Grande do Sul – Brasil. **Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitologia**, v.71, n. 1, p.70-77, 2012.
- TREVOR, P.F.; BARBET, A.F.; ALLEMAN, A.R.; SIMBI, B.H.; BURRIDGE, M.J.; MAHAN, S.M.; Detection of the agent of heartwater, *Cowdria ruminantium*, in Amblyomma ticks by PCR: validation and application of the assay to field ticks. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p.1539-1544, 2000.
- UILENBERG, G. *Babesia* – a historical overview. **Veterinary Parasitology**, v.138, n.1-2, p.3-10, 2006.
- UETI, W.M.; PALMER, G.H.; KAPPEMEYER, L.S.; STATFIELD, M.; SCOLES, G.A.; KNOWLES, P.D. Ability of vector tick *Boophilus microplus* to acquire and transmit *Babesia equi* following feeding on chronically infected horses with low-level parasitemia. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.8, p. 3755-3759, 2005.
- UETI, W.M.; PALMER, G.H.; SCOLES, G.A.; KAPPEMEYER, L.S.; KNOWLES, P.D. Persistently infected horses are reservoirs for intrastadial tick-borne transmission of the apicomplexan parasite *Babesia equi*. **Infection and Immunity**, v.76, n.8, p.3525-3529, 2008.
- VIEIRA, A.M.L.; SOUZA, C.E.; LABRUNA, M.B.; MAYO, R.C.; SOUZA, S.S.L.; CAMARGO-NEVES, V.L.F. Manual de Vigilância Acarológica – Estado de São Paulo. **Superintendência de Controle de Endemias**, dez 2012.
- WATT, D.; KIARA, H.; SPARAGANO, O.A.E. A PCR-based Field evaluation of Theileria infections in cattle and ticks in Kenya. **Annals New York Academia Science**, v.849, p.69-77, 1998.
- WEILAND, G. Species-specific serodiagnosis of equine piroplasma infections by means of complement fixation test (CFT), immunofluorescence (IIF), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Veterinary Parasitology**, v.20, p.43-48, 1986.

- WILSON, J.G., KINZER, D.R., SAUER, J.R., HAIR, J.A. Chemo-attraction in the lone star tick (Acarina: Ixodidae). 1. Response of different developmental stages to carbon dioxide administered via traps. **Journal of Medical Entomology**, v.9, p.245–252, 1972.
- XU, Y.; ZHANG, S.; HUANG, X.; BAYING, C.; XUAN, X.; IGARASHI, I; FUJISAKI, K. KABEYA, H.; MARUYAMA, S. MIKAMI, T. Seroepidemiologic studies on Babesia equi and Babesia caballe infections in horses in Jilin province of China. **Journal Veterinary Medical Science**, v.65, n.9, p.1015–1017, 2003.
- YOUNG, A.S.; PURNELL, R.E. Observations on Babesia equi in the salivary glands of Rhipicephalus evertsi. **Bulletin of Epizootic Diseases in Africa**, v. 21, p.377-383, 1973.
- YOUNG, A.S.; MORZARIA, S.P. Biologic of Babesia. **Parasitology Today**, v.2, p.211-218, 1986.
- ZAPF, F.; SCHEIN, E. New findings in the development of Babesia (Theileria) equi (Laveran, 1901) in the salivary glands of the vector ticks, Hyalomma species. **Parasitology Research**, v.80, p.543-548, 1994.
- ZAUGG, J.L.; LANE, V.M. Evaluations of buparvaquone as a treatment for equine babesiosis (Babesia equi). **American Journal Veterinay Research**, v.50, n.5, p.782-785, 1989.
- ZAUGG, J.L. Babesiosis. In: SMITH, B.P., **Large Animal Internal Medicine**. St. Louis, Missouri, USA: Mosby Inc. 2002, p.1051-1055.
- ZEIMER, E.L.; BLOOM, J.C. Diseases Affecting Erythrocytes. In: COLAHAN, P. T. **Manual of Equine Medicine and Surgery**. Missouri: Mosby, 1999, p.505-7.
- ZWEYGARTH, E.; AHMED, J.S.; REHBEIN, G. The effect of halofuginone, welcome 993c, oxytetracycline and diminazene diaceturate on Babesia equi infected lymphoblastoid cell cultures. **Journal of Parasitology**, v.70, p.542-544, 1984.

8 ANEXOS

Anexo I – Termo de Consentimento Livre Esclarecido apresentado ao responsável pela propriedade e preenchido para autorização da realização das coletas.

Anexo II - Questionário epidemiológico semi-estruturado aplicado aos responsáveis pelas propriedades nos municípios de Seropédica, Itaguaí, Teresópolis e Petrópolis, Rio de Janeiro.

Anexo III - Protocolo de extração manual Método Fenol-Clorofórmio desenvolvido a partir de testes realizados em nosso laboratório, baseado em Ferreira e Grattapaglia (1998) para a extração de DNA genômico de carrapatos.

Anexo IV - Preparo de soluções para o protocolo de extração do DNA total por Método Fenol-Clorofórmio.

Anexo I – Termo de Consentimento Livre Esclarecido apresentado ao responsável pela propriedade e preenchido para autorização da realização das coletas.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO (TCLE)

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA ANIMAL

Eu, _____

propriedade: _____ telefone: _____, recebi

explicações sobre o projeto “**Infecção natural por *Theileria equi* (Piroplasmida: Theileriidae) e *Babesia caballi* (Piroplasmida: Babesiidae) em carrapatos coletados em pastagens frequentadas por equídeos e bovinos nas microrregiões de Itaguaí e Serrana, estado do Rio de Janeiro**” do curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, visando estudos epidemiomoleculares de hemoparasitos de equinos, autorizo a coleta de carrapatos caso presentes na propriedade, estando ciente que minha identidade será preservada e que não haverá danos nos animais decorrentes da coleta do material e ausência de custos na realização dos exames.

Em ____/____/____

Assinatura: _____

Anexo II - Questionário epidemiológico semi-estruturado aplicado aos responsáveis pelas propriedades nos municípios de Seropédica, Itaguaí, Teresópolis e Petrópolis, Rio de Janeiro.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
IV - CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
INFORMAÇÕES GERAIS SOBRE A PROPRIEDADE

FICHA DA PROPRIEDADE, n^o: _____

Data: ____/____/____

Entrevistador: _____

Microrregião: () Itaguaí () Serrana

Município: () Itaguaí () Petrópolis

() Seropédica () Teresópolis

Zona: () Rural () Urbana

Dados Gerais da Propriedade

Nome: _____

Endereço: _____ Nº: _____

Bairro: _____ CEP: _____ - _____

Área da propriedade: _____ ha ou _____ alqueires

GPS: Latitude: _____ Longitude: _____ Altitude: _____

OBSERVACIONAL - Condição econômica: () Baixa () Média () Alta

Dados do Responsável

Nome: _____ Função: _____

Telefone: _____ Celular: _____

Características da Propriedade

Sistema de criação: () Intensivo () Extensivo () Semi-intensivo

Pastejo: () Contínuo () Rotacionado

Principal forrageira do pasto: () Capim gordura () Capim elefante () Pangola

() Tifton () *Coast cross* () Napier () Alfafa () Brachiaria

() Outra.: _____

Limpeza do pasto: () Sim () Não

Tipo: () Queimada () Roçada () Herbicida – químico

Frequência: _____

Criação de: () Equinos () Bovinos () Equinos e Bovinos

Outras sp animais: () Sim () Não Quais? _____

Os animais tem contato direto: () Sim () Não

Presença de bovinos ao redor da propriedade: () Sim () Não

Número de animais da propriedade: Equi. _____ Bov. _____ Outr. _____

Densidade populacional: _____

Atividade do equino: () Trabalho () Esporte () Exposição () Recreação

() Criação () Reprodução

Atividade do bovino: () Corte () Leite () Reprodução () Criação

OBSERVACIONAL:

Condições de criação: () Excelente () Bom () Moderado () Ruim

Condições das instalações: () Excelente () Bom () Moderado () Ruim

Condições do pasto: () Limpo () Sujo

Histórico de carrapatos no pasto: () Sim () Não Época do ano: _____

Já usou algum produto para combate a carrapato no pasto? () Sim () Não () Não sabe

Qual? _____

Histórico de carrapatos na vizinhança: () Sim () Não

Fragmento florestal: () Sim () Não

Características dos Animais

Procedência dos animais: () Interna () Externa, onde: _____

Faz quarentena dos animais recém-adquiridos? () Sim () Não () Não sabe

Sexo: Equi. - Fêmeas _____ Machos _____

Bov. - Fêmeas _____ Machos _____

Raça: Equi. _____ Bov. _____

Faixa etária dos animais: Equi. _____ Bov. _____

Os animais tem infestação por ectoparasitas? () Sim () Não

Época do ano: _____

Ectoparasita: () Carrapato () Piolho () Sarna Outra: _____

Carrapatos no animal – estágios: _____

Usa produtos parasiticidas nos animais: () Sim () Não

Qual a base: _____

Frequência: _____

Aplicação: () Banheiros () Aspersão () Pour-on () Injeção () Tópico – Orelha

Dose: _____

Doença mais comum:

Equi. () Laminite () Cólica () Verminose () Babesiose Outr.: _____

Bov. () Mastite () Tristeza parasitária () Diarreia Outr.: _____

Os animais apresentam alterações clínicas? () Sim () Não () Não sabe

Quais? _____

Ocorre aborto: Éguas () Sim () Não Vacas () Sim () Não

Presença de infestação de carrapatos em humanos: () Sim () Não

Presença de cão: () Sim () Não

Anexo III - Protocolo de extração manual Método Fenol-Clorofórmio desenvolvido a partir de testes realizados em nosso laboratório, baseado em Ferreira e Grattapaglia (1998) para a extração de DNA genômico de carrapatos.

Protocolo de extração de DNA de Carrapato

1. Ligue o banho-maria a 62,5°C. Prepare três conjuntos idênticos de tubos devidamente identificados para cada amostra.
2. Para cada extração serão utilizados **700 µL** de tampão de extração. Calcule a quantidade total necessária de tampão de extração com alguns mililitros a mais para segurança. Adicione 2-mercaptoetanol à quantidade necessária de tampão na proporção de **2 µL** de 2-mercaptoetanol **para cada mililitro** de tampão de extração. Mantenha o tampão de extração aquecido em banho-maria a 62,5 °C.
3. Lave os carrapatos com água milique pelo menos 2 vezes para a retirada total do RNAlater[®] Solution.
4. Coloque os carrapatos dentro do gral, adicione nitrogênio líquido e espere até que o tecido fique bem congelado (crocante) antes de iniciar a maceração com pistilo.
5. Macere o tecido até o mesmo se mostrar bem pulverizado. Adicione **700 µL de tampão de extração** continue macerando até a solução ficar homogênea (sem a presença de grumos de tecidos do carrapato).
6. Pipete toda a solução para um tubo de 2 mL estéril. Misture o tecido no tampão por inversão do tubo.
7. Incube os tubos em banho-maria a uma temperatura de 62,5 °C por um mínimo de **60 minutos**. Durante a incubação agite os tubos a cada 10 minutos para homogeneizar a suspensão.
8. Retire os tubos do banho-maria. Deixe-os esfriar. Adicionar 10 µg/mL de RNase (~**2,5 µL de RNase**). Incube a 37°C por **60 minutos** para a digestão de RNA (Thermomixer – 950 rpm/20seg de 9 em 9 min).
9. Em capela de exaustão, faça a primeira extração com solvente orgânico adicionando **600 µL de Fenol-clorofórmio-álcool isoamílico 24:1** (Phenol: Chloroform: Isoamyl Alcohol 25:24:1, USB[®]). Agite os tubos durante 5 minutos, invertendo-os no mínimo 20 vezes ou até fazer uma emulsão homogênea.
10. Centrifugue os tubos em microcentrífuga a velocidade máxima 18.000xg durante 5 minutos.
11. Retire os tubos da centrifuga cuidadosamente. Evitando perturbar a interface entre as duas fases formadas, pipete a fase superior (aquosa) para um novo tubo (~**500 µL**).

12. A fase aquosa no novo tubo adicione 1/5 do volume (~**100 µL**) de uma solução 5% **CTAB**, 0.7M NaCl. Misture bem durante 5 minutos até homogeneizar a solução. Repita a extração com **600 µL de CIA** (Clorofórmio-álcool isoamílico 24:1) (Passos 9, 10 e 11). Retire novamente a fase aquosa superior e transfira-a para um novo tubo.
13. Adicione 2/3 do volume da solução aquosa (~**400 µL**) de **Isopropanol frio** (-20°C). Misture gentilmente para precipitar os ácidos nucleicos. Se o precipitado não for visível, coloque o tubo a -20°C por 30 minutos ou mais.
14. Este é um ponto adequado para parar o procedimento de extração se não for possível continuar no mesmo dia.
15. Centrifugue os tubos a 18.000xg em centrífuga refrigerada durante 5 minutos, para formar um *pellet*. Se o *pellet* não for visível coloque o tubo a -20°C por 30 minutos ou mais, e centrifugue novamente.
16. Gentilmente descarte o máximo possível de sobrenadante sem perder o *pellet*. Este em geral será difuso e solto e estará no fundo ou ao longo da parede do tubo dependendo do ângulo do rotor utilizado.
17. Lave o *pellet* com **1 mL de etanol 70%**. Deixe o *pellet* imerso por 5 a 10 minutos. Geralmente o *pellet* fica mais branco a este ponto. Centrifugue os tubos em centrífuga refrigerada a velocidade máxima 18.000xg durante 5 minutos.
18. Retire o etanol 70%.
19. Lave o *pellet* uma vez em **1 mL de etanol 95%** (ou etanol absoluto) durante 2 a 3 minutos. Centrifugue os tubos em centrífuga refrigerada a velocidade máxima 18.000xg durante 5 minutos.
20. Retire o máximo possível de etanol por capilaridade ou mesmo usando a pipeta.
21. Deixe o *pellet* secar ao ar durante alguns minutos (aprox. 15 min) se possível em fluxo laminar, ou seque-os em centrífuga a vácuo.
22. Ressuspenda o *pellet* em **80 µL** de tampão TE (Promega – DNA Rehydration Solution, 10mM Tris; 1mM EDTA).

Anexo IV – Preparo de soluções para o protocolo de extração do DNA total por Método Fenol-Clorofórmio.

Tampão de Extração 2x CTAB – 100mL (AUTOCLAVAR)

Em Becker de 200mL, colocar 50mL de água milique e dissolver 2,0g de CTAB, 8,12g de NaCl, 4,0mL de estoque de EDTA 0,5M pH8,0, 10,0mL de estoque de Tris-Cl 1,0M pH 8,0 e 1,0g de Polyvinylpyrrolidone. Avolumar para 100mL com água milique.

Obs.: Adicionar imediatamente antes do uso 2 μ L de 0,2% 2-Mercaptoetanol para cada mL de tampão.

Estoque EDTA 0,5M pH 8,0 – 25mL

PM = 372,24 g/L (EDTA)

Pesar 4,653 g de EDTA e dissolver em parte dos 15 mL de água milique;

Ajustar o pH para 8,0 com NaOH 10M;

Completar o volume para 25 mL com água milique.

Estoque Tris-Cl 1,0M pH 8,0 – 100mL

PM = 121,14 g/L (Tris Base)

Pesar 12,114 g de Tris Base e dissolver em parte dos 80 mL de água milique;

Ajustar o pH para 8,0 com HCl concentrado;

Completar o volume para 100 mL com água milique.

5% CTAB 0,7M NaCl – 10mL (AUTOCLAVAR)

Em Becker de 20mL, adicionar 5mL de água milique e dissolver lentamente sob agitação 0,5g de CTAB e 0,409g de NaCl. Avolumar para 10mL com água milique.

CIA (Clorofórmio-álcool isoamílico 24:1) – 500mL

Misturar 20mL de álcool isoamílico com 480mL de clorofórmio.