

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

DISSERTAÇÃO

Aspectos epidemiológicos e hematológicos de equinos naturalmente infectados por *Theileria equi* (Piroplasmida: Theileriidae) e sua associação com carrapatos no Estado do Rio de Janeiro

Maristela Peckle Peixoto

2013



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

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E HEMATOLÓGICOS DE
EQUINOS NATURALMENTE INFECTADOS POR *THEILERIA*
EQUI (PIROPLASMIDA: THEILERIIDAE) E SUA
ASSOCIAÇÃO COM CARRAPATOS NO ESTADO DO RIO DE
JANEIRO**

MARISTELA PECKLE PEIXOTO

Sob a orientação do professor
Carlos Luiz Massard

e Co-orientação do professor
Huarrisson Azevedo Santos

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 2013

636.1089

P379a

T

Peixoto, Maristela Peckle, 1986-

Aspectos epidemiológicos e hematológicos de eqüinos naturalmente infectados por *Theileria equi* (Piroplasmida: Theileriidae) e sua associação com carrapatos no Estado do Rio de Janeiro/ Maristela Peckle Peixoto. - 2013.

68 f.: il.

Orientador: Carlos Luiz Massard.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 41-50.

1. Cavalo - Doenças - Teses. 2. Cavalo - Parasito - Teses. 3. Carrapato como transmissor de doenças - Teses. 4. Theileriose - Epidemiologia - Rio de Janeiro (Estado) - Teses. 5. Theileriose - Diagnóstico - Teses. 6. Parasitologia veterinária - Teses. I. Massard, Carlos Luiz, 1947- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

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

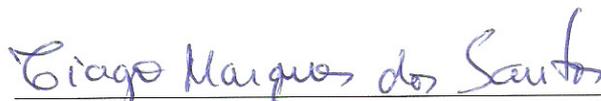
MARISTELA PECKLE PEIXOTO

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.

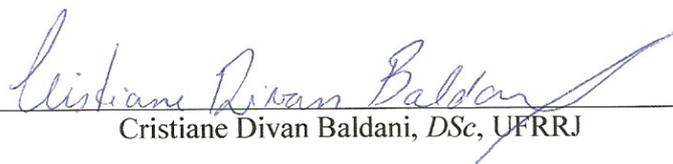
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 20/02/2013



Carlos Luiz Massard, *DSc*, UFRRJ
(Orientador)



Tiago Marques dos Santos, *DSc*, UFMT



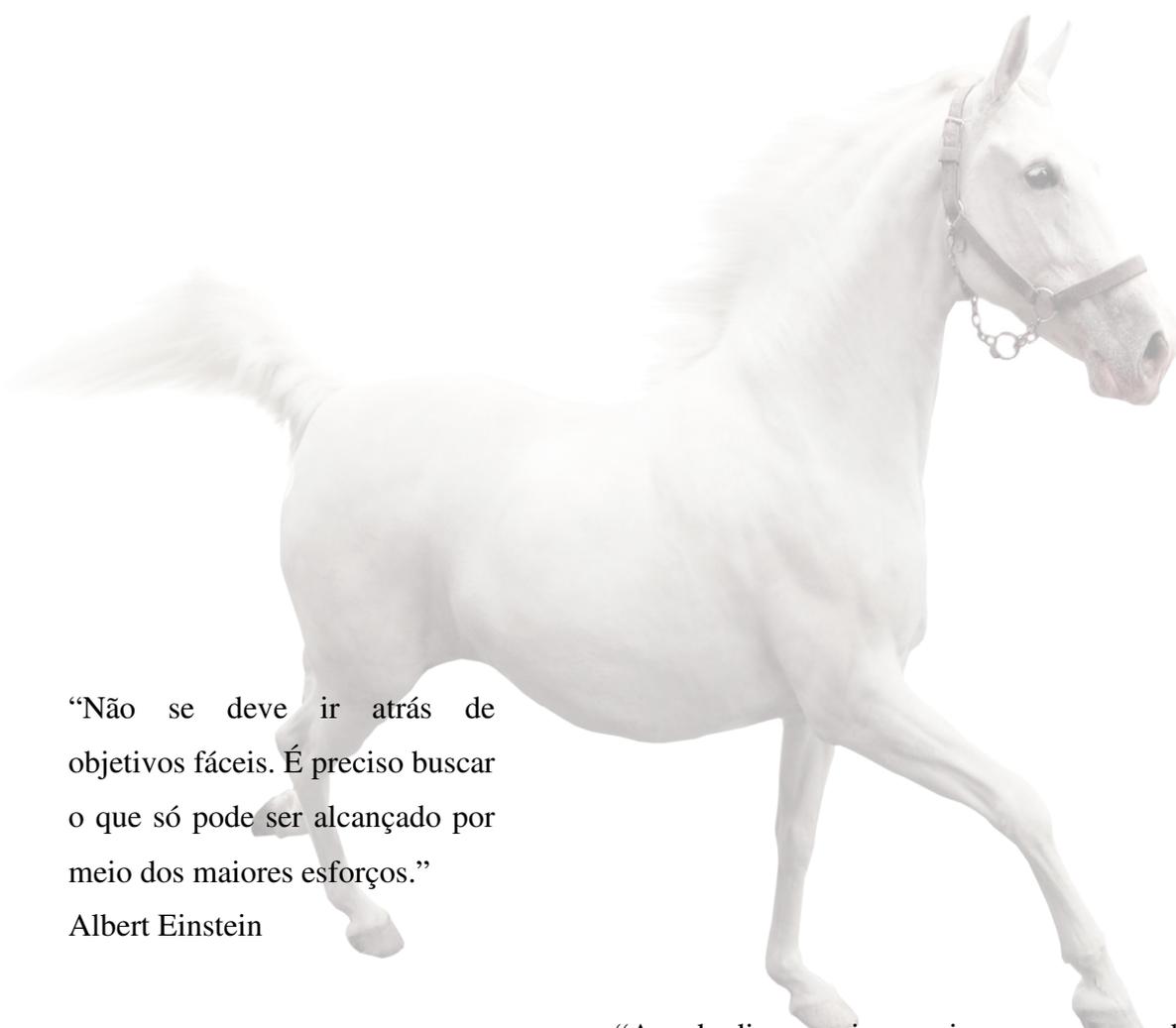
Cristiane Divan Baldani, *DSc*, UFRRJ

DEDICATÓRIA

Dedico esta obra Àquele que sempre esteve comigo: Deus. Aos meus queridos pais: Gilnéa Peckle Peixoto e Carlos Alberto Dias Peixoto, pela dedicação, apoio, conselhos e carinho. À minha irmã: Carla Peckle Peixoto que sempre me apoiou em todos os momentos. Ao meu querido sobrinho: Guilherme, pelos momentos de alegria. Aos amigos e familiares, que sempre estiveram comigo, me apoiando e incentivando em todas as tomadas de decisão. Aos meus queridos amigos de profissão, que caminharam ao meu lado nesta jornada!

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível.”

São Francisco de Assis



“Não se deve ir atrás de objetivos fáceis. É preciso buscar o que só pode ser alcançado por meio dos maiores esforços.”

Albert Einstein

“A cada dia que vivo, mais me convengo de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca, e que, esquivando-se do sofrimento, perdemos também a felicidade.”

Carlos Drummond de Andrade

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre esteve ao meu lado, me guiando pelos caminhos do bem.

Aos meus pais, Carlos e Gilnéa, e a minha irmã, Carla, pelo apoio e amor, fundamentais para a concretização dos meus sonhos; aos meus padrinhos e demais familiares pelo incentivo.

Ao amado Fábio Nicolau Gomes, que me acompanhou durante toda minha carreira acadêmica, me incentivando e compreendendo a minha ausência.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, minha segunda casa, onde pude realmente viver, no sentido amplo da palavra, a vida universitária.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa durante o Mestrado e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo suporte financeiro deste projeto.

Ao meu orientador e amigo, prof. Dr. Carlos Luiz Massard, por me ensinar a amar a Parasitologia Animal, pela dedicação aos alunos que orienta e pela vontade de ensinar e aprender cada vez mais.

Ao meu co-orientador e amigo, prof. Dr. Huarrisson Azevedo Santos, por se preocupar tanto com minhas conquistas, pelo brilhantismo individual que faz questão de compartilhar e pela dedicação ao eterno aprendizado e ensino.

Ao prof. Dr. Argemiro Sanavria, por ter me guiado pelos caminhos da Parasitologia Animal e da pesquisa científica.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, pelos ensinamentos fundamentais para a realização desta obra, principalmente ao prof. Dr. Wagner Tassinari, pela paciência e disponibilidade nos ensinamentos sobre Estatística e a prof^a. Teresa Cristina pela disponibilidade. Ao Professor Leandro Azevedo dos Santos (Departamento de Solos) por suas contribuições em biologia molecular e por sua disponibilidade.

À equipe do Laboratório de Hemoparasitos e Vetores do Departamento de Parasitologia Animal (DPA/IV-UFRJ), Claudia Silva, Joice Vilela, Renata Lins, Gabriela Vitari, Aline Falqueto, Nelson Silva, Larissa Amorim, Simone Quinelato, Andresa Guimarães e Juliana Raimundo. Em especial ao grande amigo Marcus Sandes Pires por todos os ensinamentos, paciência, incentivos, e por estar ao meu lado em todas as etapas da execução desta obra. Agradeço também a equipe do Laboratório de Controle Microbiano (LCM), em especial à querida Patrícia S. Gôlo, pela companhia, amizade e estímulo constante. Aos amigos queridos do CPGCV, em especial à Bianca, Letícia e Fabiano, pelo companheirismo.

Ao professor e amigo, Dr. Tiago Marques dos Santos por sempre estar à disposição; à Dra. Érica Cristina Rocha Roier, pelos auxílios clínicos fundamentais durante este estudo.

Aos meus “amigos do peito”, que desde sempre estiveram ao meu lado, compreendendo a minha ausência e me incentivando a continuar o meu caminho.

Às colegas de profissão e amigas, Viviane Garrido e Roberta Rose, pelos ensinamentos e oportunidade, que me forneceu base e experiência no diagnóstico direto de diversos hemoparasitos.

À colega de profissão e amiga Dayanne Araujo de Melo, que morou comigo durante toda a graduação e Mestrado e me acompanhou em todas as etapas da vida acadêmica, pessoa que hoje considero como uma irmã e da qual sentirei falta no curso de Doutorado.

Aos animais, principal motivo das minhas escolhas acadêmicas e minha grande paixão desde sempre, aos quais devo meu respeito e minha gratidão.

E a todos que de alguma maneira contribuíram para realização deste trabalho.

Muito obrigada!

BIOGRAFIA

Maristela Peckle Peixoto, filha de Gilnéa Peckle Peixoto e Carlos Alberto Dias Peixoto, nasceu em 27 de junho de 1986, na cidade de São João de Meriti, estado do Rio de Janeiro. Iniciou o ensino fundamental no Colégio Santa Maria, localizado em São João de Meriti, dando continuidade no Colégio Santo André, em São José do Rio Preto, São Paulo e retornando para o primeiro onde concluiu o ensino fundamental. Iniciou o Ensino Médio e Técnico em Administração de Empresas na FAETEC João Luiz do Nascimento, localizado em Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, local onde concluiu o Ensino Médio em 2004.

No ano de 2006 ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), concluindo o curso no segundo semestre de 2010.

Durante a graduação realizou estágios na área de Clínica médica no Hospital Veterinário de Grandes Animais (HVGA), assim como no Laboratório de Doenças Parasitárias no Instituto de Veterinária, e Laboratório de criação de Dípteros da Estação para Pesquisas Parasitológicas W.O.Neitz, na UFRRJ. Participou de diversos projetos de pesquisa no Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública.

Entre os anos de 2007 e 2008, foi bolsista de Extensão Rural, trabalhando questões da etnobotânica sobre o uso de plantas medicinais na promoção da saúde animal em dois assentamentos rurais localizados em Seropédica. Seu enfoque era a busca de plantas utilizadas como repelentes ou acaricidas em animais, bem como plantas com propriedades antihelmínticas. Nestas localidades forneceu apoio técnico e ministrou palestras.

Foi bolsista de Iniciação Científica (Pibic/Balcão - CNPq), entre os anos de 2009 e 2010. O projeto consistia no controle de *Haematobia irritans* utilizando-se compostos orgânicos e artificiais em sistema de produção convencional de bovinos de aptidão leiteira, localizado na Pesagro - EMBRAPA.

Fez estágio externo em laboratório de Patologia Clínica comercial, no Centro de Exames Laboratoriais Veterinários (CELV), por 1.140 horas, realizando exames coproparasitológicos, pesquisa de hemoparasitos e identificando ectoparasitos de importância Médico Veterinária.

Em março de 2011 ingressou no Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Parasitologia Veterinária, ao nível de Mestrado, da UFRRJ, sendo contemplada com Bolsa do CNPq.

Entre os anos de 2011 e 2013, participou de diversos projetos de dissertação e tese do laboratório de Hemoparasitos e Vetores, localizado na Estação de Pesquisas Parasitológicas W.O.Neitz.

RESUMO

PECKLE, Maristela Peixoto. “Aspectos epidemiológicos e hematológicos de equinos naturalmente infectados por *Theileria equi* (Piroplasmida: Theileriidae) e sua associação com carrapatos no Estado do Rio de Janeiro”, 2013. 55p. Dissertação (Mestre em Ciências, Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Theileriose equina é uma doença causada pelo protozoário intraeritrocítico e linfocítico *Theileria equi* (Laveran, 1901), que em diversos animais assume caráter crônico, dificultando o diagnóstico por métodos parasitológicos tradicionais. O objetivo deste estudo foi detectar a presença do DNA de *T. equi* em equinos e carrapatos através da PCR em tempo real (qPCR) e associar com fatores relacionados ao equino (sexo, idade, raça), ao ambiente e ao manejo dos equinos, além de avaliar as alterações hematológicas nos animais cronicamente infectados criados nos municípios de Seropédica e Petrópolis, estado do Rio de Janeiro. Foram testadas 314 amostras de sangue e 300 amostras de carrapatos ixodídeos, sendo 191 de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787), 104 de *Dermacentor nitens* (Neumann, 1897) e 5 larvas de Ixodidae. Fatores inerentes ao equino, à propriedade e ao manejo dos animais foram obtidos através de questionário epidemiológico e associados à presença do DNA de *T. equi* nos animais. As amostras de sangue foram também submetidas à análise hematológica em contador automático de células, à refratometria e à confecção de esfregaços, para a realização da contagem diferencial de leucócitos por microscopia óptica. Do total de equinos analisados, 81% (n=253/314) apresentaram DNA de *T. equi*, sendo o município de Seropédica o de maior frequência (90,1%; n=128/141; p<0,001). As frequências que diferiram estatisticamente pelo Qui-quadrado (p<0,2) e apresentaram colinearidade pelo teste de Spearman abaixo de 0,6 foram incluídas no modelo de regressão logística utilizando o programa R. Observou-se que os equinos destinados ao trabalho e passeio (OR=5,7, IC=2,3-14,4), à reprodução (OR=3,8, IC=1,3-11,5) e a infestação por carrapatos nos animais (OR=2,6, IC=1,1-6,2) foram fatores associados à presença do DNA de *T. equi* nos equinos (p<0,05). Das amostras de carrapatos coletadas, *A. cajennense* e *D. nitens* foram as espécies identificadas. A presença do DNA de *T. equi* foi observada em 9,9% (n=19/191) das amostras de *A. cajennense* e 3,8% (n=4/104) de *D. nitens*. A análise multivariada simples demonstrou que a presença de *A. cajennense* nos equinos (OR=4,1, IC=1,8-9,1) apresentou associação com a presença do DNA de *T. equi* nos animais. Com relação às análises hematológicas das amostras de Seropédica, de forma geral foi observada anemia e eosinofilia como principais alterações nos grupos positivo e negativo. Estas alterações parecem estar relacionadas ao manejo animal inadequado instituído em grande parte das propriedades deste município. No município de Petrópolis, a anemia foi uma alteração frequente (p<0,05) nos animais positivos para *T. equi*, sugerindo uma possível associação deste protozoário com esta alteração hematológica no referido município. Equinos destinados ao trabalho, passeio e reprodução, assim como a infestação por carrapatos, principalmente a intensa infestação por *A. cajennense*, são fatores que favoreceram a presença de *T. equi* em equinos nos municípios estudados.

Palavras-chave: Theileriose equina, PCR em tempo real, Epidemiologia.

ABSTRACT

PECKLE, Maristela Peixoto. “**Epidemiological and hematological aspects of horses naturally infected by *Theileria equi* (Piroplasmida: Theileriidae) and its association with ticks in the State of Rio de Janeiro**”, 2013. 55p. Dissertation (Master Science, Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

The aim of this study was to detect *Theileria equi* (Laveran 1901) DNA in horses and ticks using real-time PCR, to list the factors associated with infection and to evaluate hematological changes in chronically infected animals located in Seropédica and Petrópolis municipalities of the state of Rio de Janeiro. We tested blood samples from 314 horses and samples from 300 ticks were tested, including 191 *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787), 104 *Dermacentor nitens* (Neumann, 1897) and 5 Ixodida larvae. Factors inherent to the horse, the ownership and animal management were obtained from an epidemiological questionnaire and were evaluated in association with the presence of *T. equi* DNA in the animals. Among the horses in the study, 81% (n=253/314) presented *T. equi* DNA, and the animals of the Seropédica municipality had the highest infection frequency (90,1%, n=128/141, p<0.001). The factors that had significantly different infection frequencies by chi-squared or Fisher's exact tests (p<0.2) and had collinearity by Spearman test below 0.6 were included in a logistic regression model using the R programming package. Work and walking activity (OR=5.7, CI=2.3-14.4), reproductive activity (OR=3.8, CI=1.3-11.5) and tick infestation (OR=2.6, CI=1.1-6.2) were factors that favored the presence of *T. equi* DNA in the animals (p<0.05). Among the tick samples, *A. cajennense* and *D. nitens* were the identified species. The presence of *T. equi* DNA was observed in 9.9% (n=19/191) of the *A. cajennense* samples and 3.8% (n=4/104) of the *D. nitens* samples. A multivariate analysis revealed that the presence of *A. cajennense* on the animals (OR=4.1, CI=1.8-9.1) was associated with the presence of *T. equi* DNA in the horses. Regarding Seropédica hematological analyses, anemia and eosinophilia was observed as major changes in both groups. These changes may be related to the poor animal management, instituted largely the properties of this municipality. In Petrópolis, anemia characterized only in positive animals indicates the possibility of *T. equi* participation, especially because this group differed from the negative. In the studied municipalities, activities related to work, walking and reproduction and the presence of ticks on horses, particularly an intense infestation of *A. cajennense*, are factors that lead to infection with *T. equi* in the horses.

Keywords: Equine theileriosis, Real-time PCR, Epidemiology.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Análise bivariada e multivariada dos fatores associados à positividade por <i>Theileria equi</i> nos equinos, através da técnica da PCR em tempo real, em função das características dos animais, local de coleta, manejo de criação, atividade dos animais, sistema de criação, infestação por carrapatos e origem do animal, no estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	20
Tabela 2.	Análise multivariada da positividade de <i>Theileria equi</i> em equinos, através da técnica da PCR em tempo real, em relação à espécie de carrapato observada nos animais no estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	21
Tabela 3.	Regressão logística simples na avaliação do grau de infestação por <i>Amblyomma cajennense</i> em comparação com a positividade dos equinos para <i>Theileria equi</i> , no estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	22
Tabela 4.	Análise bivariada dos fatores associados à positividade de <i>Theileria equi</i> nas amostras de carrapatos, através da técnica da PCR em tempo real, em função das características das amostras de carrapatos, como local de coleta, espécie identificada, estágio evolutivo e o sexo do carrapato, no estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	23
Tabela 5.	Eritrograma, plaquetas, proteína plasmática total e fibrinogênio de equinos positivos e negativos na PCR em tempo real para <i>Theileria equi</i> no município de Seropédica, Rio de Janeiro.....	25
Tabela 6.	Leucograma de equinos positivos e negativos na PCR em tempo real para <i>Theileria equi</i> no município de Seropédica, Rio de Janeiro.....	26
Tabela 7.	Número de hemácias, concentração de hemoglobina plasmática, volume globular, número de leucócitos, número de plaquetas e volume plaquetário médio, analisados em três grupos distintos de equinos, de acordo com o C_q da amostra dos positivos no município de Seropédica, Rio de Janeiro. Grupos: negativo, positivos I ($C_q \leq 29$) e positivo II ($C_q > 29$).....	29
Tabela 8.	Eritrograma, plaquetas, proteína plasmática total e fibrinogênio de equinos positivos e negativos na PCR em tempo real para <i>Theileria equi</i> no município de Petrópolis, Rio de Janeiro.....	30
Tabela 9.	Leucograma de equinos positivos e negativos na PCR em tempo real para <i>Theileria equi</i> no município de Petrópolis, Rio de Janeiro.....	31
Tabela 10.	Número de hemácias, concentração de hemoglobina plasmática, volume globular, número de leucócitos, número de plaquetas e volume plaquetário médio analisados em três grupos distintos de equinos de acordo com o C_q da amostra dos positivos no município de Petrópolis, Rio de Janeiro. Grupos: negativo, positivos I ($C_q \leq 29$) e positivo II ($C_q > 29$).....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ilustração da reprodução assexuada de <i>Theileria equi</i> no sangue do hospedeiro vertebrado segundo Nuttall, Strickland (1912). 1: Entrada do parasito em eritrócito; 2,3,4,5: Crescimento em tamanho, passando pela forma amebóide e piriforme; 6,7,8,9,10: Mudança na forma da cromatina, multiplicação e divisão celular; 11,12,13: Forma característica em “Cruz de Malta”; 14: Dispersão das células filhas no eritrócito; 15: Saída das células filhas do eritrócito.....	5
Figura 2.	Localização geográfica dos municípios de Petrópolis e Seropédica, Rio de Janeiro.....	13
Figura 3.	Curvas com padrões de amplificação do fragmento de 85pb do gene <i>18S rRNA</i> de <i>Theileria equi</i> em algumas amostras de sangue de equinos dos Municípios de Petrópolis e Seropédica, obtidas pela PCR em tempo real utilizando o sistema TaqMan. Duas curvas deslocadas à esquerda: controle positivo; oito curvas deslocadas à direita: amostras positivas.....	19
Figura 4.	Infestação simultânea por <i>Amblyomma cajennense</i> e <i>Dermacentor nitens</i> na região da tábua do pescoço de dois equinos do município de Seropédica, Rio de Janeiro.....	21
Figura 5.	Curvas com padrões de amplificação do fragmento de 85 pares de bases do gene <i>18S rRNA</i> de <i>Theileria equi</i> em algumas amostras de carrapatos <i>Amblyomma cajennense</i> e <i>Dermacentor nitens</i> , obtidas pela PCR em tempo real utilizando o sistema TaqMan. Duas curvas deslocadas à esquerda: controle positivo; três curvas deslocadas à direita: amostras positivas.....	22
Figura 6.	Curva padrão construída a partir de diluições decimais seriadas do DNA plasmidial, contendo o gene <i>18S rRNA</i> de <i>Theileria equi</i> ($\cong 1.600$ pb). O valor do Ciclo de Quantificação obtido pela PCR em tempo real utilizando o sistema Taqman foi plotado em função do número inicial de cópias do plasmídeo.....	24
Figura 7.	Sensibilidade analítica da PCR em tempo real utilizando sistema Taqman, mostrando as curvas de amplificação do DNA plasmidial contendo o gene <i>18S rRNA</i> de <i>Theileria equi</i> ($\cong 1.600$ pb), em diluições seriadas (3 – 30.000 cópias).....	24
Figura 8.	Frequência de equinos de Seropédica com alterações no volume globular, número de hemácias, concentração de hemoglobina plasmática, número de leucócitos, número de plaquetas e volume plaquetário em função do resultado positivo na PCR em tempo real para <i>Theileria equi</i> . ^a Letras 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.....	28
Figura 9.	Frequência de equinos de Petrópolis com alterações no volume globular, número de hemácias, concentração de hemoglobina plasmática, número de leucócitos, número de plaquetas e volume plaquetário em função do resultado positivo na PCR em tempo real para <i>Theileria equi</i> . ^a Letras 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.....	33

LISTA DE ABREVIACOES

ADH	Amplitude de distribuo das hemácias
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato aminotransferase
BAS	Número de basófilos
CFT	Teste de fixao de complemento
CHCM	Concentrao de hemoglobina corpuscular média
COMEP	Comissão de tica na Pesquisa
CPK	Creatinofosfoquinase
C _q	Ciclo de quantificao
DNA	cido desoxirribonucleico
EPPWON	Estaao experimental de pesquisas parasitológicas Wilhelm Otto Neitz
EDTA	cido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EOS	Número de eosinófilos
FIB	Fibrinognio
GGT	Gama-Glutamiltransferase
HB	Concentrao de hemoglobina plasmática
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HEM	Número de hemácias
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgG	Imunoglobulina G
LEUC	Número de leucócitos
LIN	Número de linfócitos
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MON	Número de monócitos
NEUT	Número de neutrófilos
OIE	Organizao Internacional de Epizootias
ONG	Organizao não governamental
OR	“Odds ratio”
PCR	Reao em cadeia da polimerase
PLAQ	Plaquetas
PPT	Proteína plasmática total
qPCR	PCR em tempo real
RFC	Reao de fixao do complemento
RIFI	Reao de imunofluorescência indireta
RNA	cido ribonucleico
TE	Tris-(hidroximetil) aminometano EDTA
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
UR	Uréia
UV	Ultravioleta
VCM	Volume corpuscular médio
VG	Volume globular
VPM	Volume plaquetário médio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Breve Histórico.....	3
2.2 Mudança na Sistemática de <i>Theileria equi</i>	3
2.3 Atual Posição Taxonômica.....	4
2.4 Ciclo de Vida.....	4
2.4.1 Esquizogonia no hospedeiro vertebrado.....	4
2.4.2 Gametogonia e esporogonia no hospedeiro invertebrado.....	5
2.5 Ecologia e Epidemiologia.....	6
2.5.1 Possíveis vetores.....	6
2.5.2 Outras formas de transmissão.....	7
2.5.3 Distribuição e prevalência no Brasil e no mundo.....	7
2.5.4 Fatores associados à infecção por <i>Theileria equi</i>	8
2.6 Patogenia.....	9
2.6.1 Manifestações clínicas.....	9
2.6.2 Alterações hematológicas.....	10
2.7 Diagnóstico Laboratorial.....	11
2.8 Theileriose e sua Importância Econômica na Criação de Equinos.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Descrição da Área de Estudo.....	13
3.2 Princípios Éticos.....	13
3.3 Tamanho da Amostra e Amostragem.....	13
3.4 Coleta e Armazenamento das Amostras de Sangue e Carrapatos.....	14
3.5 Análise Hematológica.....	14
3.6 Questionário Epidemiológico.....	15
3.7 Extração do DNA das Amostras de Sangue e Carrapato.....	15
3.8 Sensibilidade Analítica da PCR em Tempo Real para Detecção de <i>Theileria equi</i>	15
3.9 Ensaio da PCR em Tempo Real.....	16
3.9.1 Cuidados nas reações da PCR em tempo real.....	16
3.10 Análise estatística.....	17
3.10.1 Epidemiologia.....	17
3.10.2 Hematologia.....	17
4 RESULTADOS	19
4.1 Detecção Molecular Através da PCR em Tempo Real de <i>Theileria equi</i> em Equinos dos Municípios de Seropédica e Petrópolis.....	19
4.2 Detecção Molecular Através da PCR em Tempo Real de <i>Theileria equi</i> em Carrapatos Coletados de Equinos nos Municípios de Petrópolis e Seropédica.....	22
4.3 Sensibilidade Analítica da PCR em Tempo Real para Detecção de <i>Theileria equi</i>	23
4.4 Avaliação dos Controles Negativos e Reprodutibilidade das Reações da PCR em Tempo Real.....	25
4.5 Análise Hematológica.....	25
4.5.1 Município de Seropédica.....	25
4.5.2 Município de Petrópolis.....	30

5. DISCUSSÃO.....	35
5.1 Detecção Molecular Através da PCR em Tempo Real de <i>Theileria equi</i> em Equinos dos Municípios de Seropédica e Petrópolis.....	35
5.2 Detecção Molecular Através da PCR em Tempo Real de <i>Theileria equi</i> em Carrapatos Coletados de Equinos nos Municípios de Petrópolis e Seropédica.....	36
5.3 Análise Hematológica.....	37
6. CONCLUSÕES.....	40
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
ANEXOS.....	51
Anexo I – Questionário epidemiológico semi-estruturado aplicado aos responsáveis pelas propriedades nos municípios de Seropédica e Petrópolis, Rio de Janeiro.....	52
Anexo II – Parecer da Comissão de Ética na Pesquisa da UFRRJ/COMEP.....	55

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui atualmente o terceiro maior rebanho de equídeos do mundo, sendo a maior concentração desta população na região sudeste do país. Os equídeos estão envolvidos em mais de 30 segmentos da economia, gerando em torno de 7,3 bilhões de reais anualmente (MAPA, 2012). No entanto, devido ao precário controle sistemático do plantel nacional, este segmento perde em número e importância.

Dentre as doenças que atingem a maioria dos plantéis de equídeos no Brasil, as piroplasmoses têm destaque. Seus agentes etiológicos são protozoários de localização intraeritrocítica denominados *Theileria equi* (Laveran, 1901) Mehlhorn e Schein 1998 e *Babesia caballi* Nuttall e Strickland, 1912. Além das perdas econômicas a nível nacional, 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; FRIEDHOFF, 1990).

Theileriose equina, causada pelo agente *T. equi*, apresenta caráter endêmico em diversos estados do país, com uma prevalência em torno de 90% (PFEIFER BARBOSA et al., 1995; BATTSETSEG et al., 2002; SANTOS et al., 2011). Após a infecção os equinos se tornam portadores crônicos de *T. equi*, mantendo a infecção provavelmente por toda a sua vida. Animais cronicamente infectados atuam com muita eficiência como fonte de infecção para carrapatos vetores. Além disso, é de difícil tratamento através de fármacos atualmente disponíveis e, portanto, é considerado um dos principais agentes que influencia consideravelmente nas perdas econômicas da produção equina em nível nacional.

Até o presente momento, as espécies de carrapatos que foram identificadas como vetores de *T. equi*, listam dez espécies de carrapatos, agrupadas em três gêneros: *Dermacentor*, *Rhipicephalus* e *Hyalomma* (THOMPSON, 1969; MEHLHORN; SHEIN, 1998). No continente Americano, *Dermacentor variabilis* e *Rhipicephalus microplus* foram identificados como vetores experimentais de *T. equi* (GUIMARÃES, 1998a; UETI et al., 2005; 2008) sendo a transmissão natural de *T. equi* por estes ainda não comprovada (FRIEDHOFF et al., 1990). Além da transmissão biológica, a forma iatrogênica, congênita e transplacentária já foram relatadas.

O diagnóstico da piroplasmose equina pode ser realizado principalmente utilizando-se o exame microscópico de esfregaços sanguíneos, o ensaio imunoenzimático (ELISA), a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), a reação de fixação do complemento (RFC) e a reação em cadeia da polimerase (PCR). 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) e pela técnica da PCR (UETI et al., 2005; 2008).

A sensibilidade da reação da PCR é mais elevada quando comparada ao exame microscópico de esfregaços sanguíneos (RAMPERSAD et al., 2003; ALHASSAN et al., 2007). A PCR em tempo real (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). Além disso, é caracterizada como método alternativo para o ensaio da PCR convencional, pois utiliza marcadores moleculares específicos (sondas de hidrólise), que aumentam ainda mais a especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade do teste.

Diversos fatores têm sido associados à infecção de equinos por *T. equi*. Dentre os fatores já descritos, destacam-se equinos criados a pasto, condições de manejo na criação, infestação por carrapatos, principalmente relacionada às espécies *R. microplus* e *Amblyomma cajennense*, criação de equinos em contato com bovinos e condições climáticas da localidade.

Devido à necessidade do melhor entendimento dos mecanismos de infecção e transmissão de *T. equi*, tanto nos equinos como nos carrapatos, a presente pesquisa está

embasada na importância que a piroplasmose equina possui para a equideocultura do Brasil e do mundo, e na busca de conhecimentos sobre os carrapatos vetores desse agente em condições naturais, utilizando métodos epidemiológicos e ferramentas moleculares. A carência de informações sobre as espécies de carrapatos envolvidos na transmissão e distribuição de *T. equi* na América do Sul, principalmente no Brasil, demonstra a necessidade de desenvolver novos estudos para elucidar estes fatores, o que permitirá estabelecer medidas de controle mais eficazes.

Os objetivos do presente estudo foram: a) Avaliar a qPCR como técnica de diagnóstico para theileriose equina; b) Avaliar a frequência do DNA de *T. equi*, em equinos e carrapatos nos municípios de Seropédica e Petrópolis, estado do Rio de Janeiro, pela técnica da PCR em tempo real, e identificar através de análise multivariada os fatores associados aos equinos (sexo, idade e raça), ao ambiente e ao manejo dos animais; c) Avaliar as alterações hematológicas em equinos naturalmente infectados por *T. equi*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Breve Histórico

No final do século XIX, Babés associou microrganismos intra-eritrocíticos com hemoglobínúria ou “febre da água vermelha” em bovinos na Romênia (BABÉS, 1888). Na mesma época, este pesquisador observou organismos similares em ovelhas.

Em 1893, Smith e Kilborne denominaram o agente da “Febre do Texas” dos bovinos de *Pyrosoma bigeminum* e observou que os carrapatos desempenhavam o papel da transmissão do agente para os animais. Este foi um dos primeiros relatos sobre a transmissão de protozoários parasitas por artrópodes. Ainda em 1893, Starcovici renomeou o gênero, nomeando os hematozoários *Babesia bovis*, *Babesia ovis* e *Babesia bigemina* (UILENBERG, 2006).

O pequeno piroplasma dos equinos foi denominado inicialmente *Piroplasma equi* (Laveran, 1901). Este organismo foi estudado por Laveran (1901) a partir de esfregaços sanguíneos da África do Sul, enviados a ele por Theiler (NUTTALL; STRICKLAND, 1912). *Piroplasma* foi o nome proposto devido a sua forma muito semelhante à pera, denominação que ainda hoje é utilizada como sinonímia para o gênero *Babesia* (UILENBERG, 2006).

Em 1909, França percebeu que o organismo descrito não apresentava características de forma e modo de multiplicação do gênero *Piroplasma*, denominando-o de *Nuttallia*. Em 1912, o estudo de França (1909) foi confirmado por Nuttall e Strickland, reafirmando o gênero *Nuttallia*, nome criado para os piroplasmas que após reprodução assexuada em hemácias formam quatro células filhas.

Após estudos em *Rhipicephalus turanicus* e *Hyalomma anatolicum* sobre a transmissão transtadial e falha na transmissão transovariana deste agente (SIGRIST, 1983), a descoberta da esquizogonia em linfócitos de equinos por Schein et al. (1981), Uilenberg (1986) pensou em retirar *Babesia equi* do gênero *Babesia* e transferir para *Theileria*. No entanto, com receio de uma reclassificação precipitada, Mehlhorn e Schein (1993) mantiveram este protozoário no mesmo gênero, classificando-o como *Babesia* com estágio intralinfocítico. Mehlhorn e Schein (1998), finalmente reclassificaram *B. equi* para o gênero *Theileria*, amplamente aceito por pesquisadores da área.

Em 1910, Dr. Carini, na época diretor do Instituto Pasteur de São Paulo, fez uma comunicação assinalando a presença da piroplasmose equina pela primeira vez no Brasil, baseado em sintomas clínicos e exame microscópico de esfregaço sanguíneo (DUPONT; TERRA, 1952). Pela descrição da morfologia parecia tratar-se de *T. equi*.

Na América do Norte, *T. equi* foi diagnosticado pela primeira vez em um equino do estado da Flórida em 1964 (TAYLOR et al., 1969; FRIEDHOFF et al., 1990), não havendo dispersão deste hemoparasito para outros estados dos Estados Unidos da América até hoje. No Uruguai, *T. equi* foi diagnosticado pela primeira vez por Cassamagnaghi (1948). O primeiro isolamento de *T. equi* no Brasil foi realizado por Ribeiro e Lima (1989) em equinos naturalmente infectados no intuito de produzir um antígeno para fins sorológicos.

2.2 Mudança na Sistemática de *Theileria equi*

A mudança na sistemática de *Babesia equi* para *Theileria equi* vem sendo discutida desde a década de 80, quando diversos estudos morfológicos e experimentais foram desenvolvidos, dando origem a informações detalhadas sobre o ciclo de vida deste hemoparasito.

O gênero *Babesia* compreende hemoparasitos que, uma vez no hospedeiro vertebrado, adentram diretamente nos eritrócitos. Em contraste, os esporozoítos do gênero *Theileria*, não

infectam os eritrócitos diretamente, realizando sua esquizogonia em linfócitos, e desenvolvendo-se em esquizontes (SCHEIN et al., 1981; MOLTSMANN et al., 1983). Devido a esta característica, Mehlhorn e Schein (1993) inicialmente, mantiveram esta espécie como pertencente ao gênero *Babesia*, porém, com estágios intralinfocíticos.

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*, os zigotos invadem a hemolinfa do carrapato movendo-se direto para a glândula salivar e, portanto, não há desenvolvimento reprodutivo nos órgãos de carrapatos vetores, incluindo ovários (ZAPF; SCHEIN, 1994).

Um aspecto singular da morfologia dos trofozoítos de *T. equi* é a presença de uma estrutura de alimentação tubular envolvida no mecanismo de alimentação, característica já observada em algumas espécies de *Theileria* (GUIMARÃES et al., 2003).

Além dessas características, *T. equi* apresenta resistência a fármacos “babesicidas”, o que sugeriu um metabolismo distinto (MEHLHORN; SCHEIN, 1984).

No estudo de Mehlhorn e Schein (1998), a reclassificação de *T. equi* foi embasada no pequeno tamanho dos trofozoítos intraeritrocíticos ($1.5 \pm 2.5 \mu\text{m}$); na comprovação de que os esporozoítos adentram primeiro em linfócitos; na motilidade dos merozoítos produzidos no início da fase esquizogônica; no processo de desenvolvimento de *T. equi* na glândula salivar, idêntico ao do gênero *Theileria*; na ausência de desenvolvimento reprodutivo desta espécie de protozoário nos órgãos dos carrapatos, incluindo ovários; nas proteínas de superfície homólogas às encontradas no gênero *Theileria*; na susceptibilidade de *T. equi* a compostos efetivos aos protozoários do gênero *Theileria*; pela comparação, na biologia molecular, da subunidade menor do RNA ribossomal, observou-se que *B. equi* pertencia ao gênero *Theileria*. A partir destas informações, foi possível então concluir que *Babesia equi* não pertencia ao gênero *Babesia*, mas sim *Theileria*, como bem demonstrado neste estudo.

2.3 Atual Posição Taxonômica

Reino: Protista;

Sub-reino: Protozoa Goldfuss, 1818;

Filo: Apicomplexa Levine, 1970;

Classe: Sporozoea Leuckart, 1879;

Sub-classe: Piroplasmae Levine, 1961;

Ordem: Piroplasmida Wenyon, 1926;

Família: Theileriidae Du Toit, 1918;

Gênero: *Theileria* Bettencourt, 1907;

Espécie: *Theileria equi* (Laveran, 1901) Mehlhorn e Schein, 1998.

2.4 Ciclo de Vida (Segundo Mehlhorn e Schein, 1998)

2.4.1 Esquizogonia no hospedeiro vertebrado

O carrapato vetor inocula esporozoítos através de sua saliva. Estes esporozoítos penetram primeiramente em linfócitos, onde ocorre a formação de macroesquizontes e microesquizontes, em um processo denominado esquizogonia. Os esquizontes dão origem aos merozoítos, que penetram nos eritrócitos, se tornam esféricos e iniciam a reprodução por fissão binária, dando origem a quatro células-filhas, formando tétrades, muitas vezes na forma de “Cruz de Malta”. Os organismos podem escapar dos eritrócitos por três mecanismos distintos: podem passar pela membrana do eritrócito sem nenhum dano evidente; podem intensificar sua atividade e passar pela membrana de eritrócitos que perderam sua hemoglobina (chamados de “fantasmas”); ou podem escapar junto com a hemoglobina

quando há o rompimento do eritrócito (HOLBROOK, 1969). Após escapar das hemácias, os merozoítos podem ficar livres na circulação, adentrar em outras hemácias ou apenas aderir à sua superfície. As formas livres na circulação podem ser fagocitadas por leucócitos ou simplesmente degenerar (HOLBROOK, 1969). Ao penetrarem nos eritrócitos, fazem novas divisões assexuadas (Figura 1).

Alguns merozoítos tornam-se esféricos, similares à forma em anel encontrada na Malária, e são denominados gamontes. Estes gamontes podem ser ingeridos por carrapatos vetores.

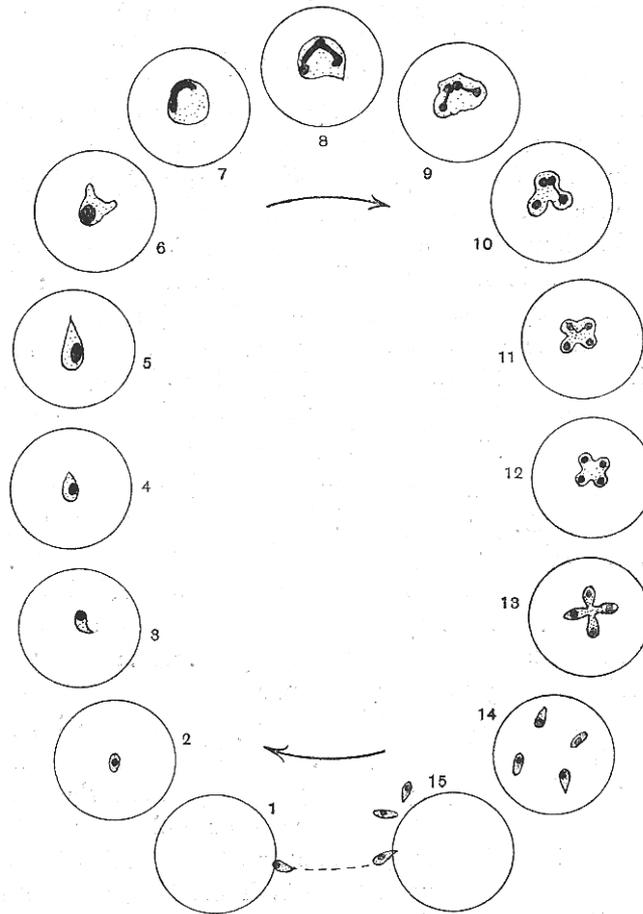


Figura 1. Ilustração da reprodução assexuada de *Theileria equi* no sangue do hospedeiro vertebrado segundo Nuttall, Strickland (1912). 1: Entrada do parasito em eritrócito; 2,3,4,5: Crescimento em tamanho, passando pela forma amebóide e piriforme; 6,7,8,9,10: Mudança na forma da cromatina, multiplicação e divisão celular; 11,12,13: Forma característica em “Cruz de Malta”; 14: Dispersão das células filhas no eritrócito; 15: Saída das células filhas do eritrócito.

2.4.2 Gametogonia e esporogonia no hospedeiro invertebrado

Os carrapatos vetores ingerem os gamontes formados na circulação do hospedeiro vertebrado. Estas formas permanecem no intestino do vetor por 48 horas e em seguida, começam a crescer. Muitos gamontes mudam sua conformação, iniciando a divisão binária do núcleo e formam protrusões, sendo conhecidos nesta fase como corpos raiados. Em seguida, dividem-se em microgametas uninucleados. Alguns gamontes não mudam, e são considerados macrogametas multinucleares. Os macrogametas e microgametas fusionam formando o

zigoto. Dentro deste, finalmente, é formado um cineto. Os cinetos são vistos livres na hemolinfa em 5-7 dias pós-infecção.

Os cinetos penetram nas glândulas salivares, aproximadamente 7-8 dias após a infecção. Após esta entrada, ocorre a formação de uma massa esporogônica multinuclear, denominada esporontes, que se dividem em esporoblastos multinucleados e posteriormente em esporozoítos de tamanho menor.

2.5 Ecologia e Epidemiologia

2.5.1 Possíveis vetores

A transmissão biológica de *T. equi* ocorre através da inoculação de esporozoítos no equídeo pelo carrapato vetor. Até o presente momento, dez espécies de carrapatos, de três gêneros distintos, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* e *Hyalomma*, já foram identificadas como vetores de *T. equi* no mundo (NEITZ, 1956; THOMPSON, 1969; MEHLHORN; SHEIN, 1998).

Battsetseg et al. (2001) demonstraram por meio das técnicas da PCR e nested PCR, que o carrapato da espécie *Dermacentor nuttalli* é o vetor de maior importância na transmissão e na manutenção da condição endêmica de theileriose equina na Mongólia. Posteriormente, esses autores detectaram o ácido desoxirribonucleico (DNA) do protozoário em ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas de *D. nuttalli*, sugerindo a possibilidade de transmissão transovariana nessa espécie de carrapato (BATTSETSEG et al., 2002).

Na América do Norte e América do Sul, até o momento, *D. variabilis* Say, 1821 e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) Murrell e Barker, 2003 são os carrapatos identificados, respectivamente, como vetores experimentais de *T. equi* (STILER; COAN, 1995; GUIMARÃES, 1998a; UETI et al., 2005; 2008), sendo a transmissão natural de *T. equi* por estes ainda não comprovada (FRIEDHOFF et al., 1990).

No Brasil, *T. equi* é transmitido transestadialmente e intraestadialmente por *R. microplus* (GUIMARÃES et al., 1998b; UETI et al., 2005, 2008). Em condições experimentais, foram identificados esporoblastos e esquizontes de *T. equi* nas glândulas salivares de *R. microplus* (GUIMARÃES et al., 1998a). Posteriormente, a transmissão transestadial de *T. equi* foi demonstrada por Guimarães et al. (1998b). Ueti et al. (2005; 2008) comprovaram a participação de *R. microplus* como vetor experimental de *T. equi* nas modalidades transestadial e intraestadial. Também demonstraram que equinos cronicamente infectados são competentes reservatórios para infecção de carrapatos vetores de *T. equi*. No entanto, a participação do carrapato *R. microplus* como vetor na cadeia epidemiológica de theileriose equina permanece indefinida, já que os equinos são hospedeiros alternativos dessa espécie de carrapato. Consequentemente, a presença deste carrapato em equinos depende do contato com bovinos, hospedeiros primários, nas condições em que ambas as espécies são criadas juntas na mesma pastagem (HEUCHERT et al., 1999; LABRUNA et al., 2001). Além disso, *R. microplus* é um carrapato monoxeno e a transmissão transovariana de parasitos do gênero *Theileria* até o momento não foi detectada. Dessa forma, sua importância epidemiológica tem sido discutida (HEUCHERT et al., 1999; KERBER et al., 2009; SANTOS et al., 2011).

A transmissão de *T. equi* de forma experimental não foi observada utilizando-se os ixodídeos *D. nitens* (DENNIG, 1988) e *A. cajennense* (DENNIG, 1988; RIBEIRO et al., 2011). Kerber et al. (2009) observaram uma associação significativa entre a abundância de *A. cajennense* sobre os equinos e a presença de anticorpos contra *T. equi*. Em estudo realizado no Texas por Scoles et al. (2011), demonstraram que *A. cajennense* adquire a infecção por *T. equi* enquanto se alimenta em equinos infectados e transmite transestadialmente quando se alimenta em equinos não infectados. Vale destacar que, no Brasil, as principais espécies de

carrapatos que parasitam equinos são *D. nitens* e *A. cajennense* (SOUZA; SERRA-FREIRE, 1992; LABRUNA et al., 2001), contudo, até o presente momento, não foi demonstrado a participação destes artrópodes como vetores de *T. equi*, sob condições naturais ou experimentais.

2.5.2 Outras formas de transmissão

Acredita-se que a forma principal de transmissão de *T. equi* para os equinos é a transmissão biológica, que ocorre através da inoculação de esporozoítos no equídeo pelo carrapato vetor. Além da forma biológica, o piroplasma *T. equi* pode ser transmitido de forma iatrogênica através de sangue infectado (TENTER; FRIEDHOFF, 1986). No entanto, segundo Kerber et al. (2009), em todas as fazendas utilizavam-se agulhas estéreis e, portanto, esta parece ser uma via de transmissão mínima frente à alta prevalência deste hemoparasito encontrada nos animais. A transmissão mecânica por dípteros hematófagos ainda não foi relatada (FRIEDHOFF, 1988).

A infecção por via transplacentária também foi relatada (ALLSOPP et al., 2007). Neste caso, os potros nascem apenas portadores do agente, podendo desenvolver rapidamente a doença clínica ou já nascer mortos. As perdas por este tipo de transmissão são relativamente comuns (DE WAAL, 1992). A transmissão congênita foi observada por Phipps e Otter (2004) e Santos et al. (2008).

2.5.3 Distribuição e prevalência no Brasil e no mundo

A prevalência desta doença em equinos apresenta elevada taxa no continente Africano (TENTER; FRIEDHOFF, 1986; FRIEDHOFF et al., 1990). Bhoora et al. (2009) realizaram estudo no Sul da África com 488 amostras de equinos e zebras, e observaram prevalência de 50% para *T. equi* através da técnica da PCR.

Esta doença ocorre de forma enzoótica em alguns países da Ásia como a Turquia (SEVINC et al., 2008), Israel (SHKAP et al., 1998) e Jordânia (ABUTARBUSH et al., 2012), no entanto as prevalências entre os estudos divergem. Na Jordânia, por exemplo, Abutarbush et al. (2012) observaram 14,6% das amostras positivas para *T. equi*. Em Israel, observou-se prevalência de 33,7% e na Turquia, uma positividade de 16,2%.

Theileria equi parece estar amplamente disperso em diversos países da Europa, sendo a prevalência deste agente descrita na Hungria (32%) (FARKAS et al., 2013), Itália (12%) (MORETTI et al., 2010), Grécia (11%) (KOUAM et al., 2010), Espanha (40%; 56,1%) (CAMACHO et al., 2005; GARCIA-BOCANEGRA et al., 2012). Além desses países, já foi descrito em Portugal, Bélgica, Rússia e França (FRIEDHOFF, 1982; FRIEDHOFF et al., 1990). Neste continente, também foi possível observar grande diferença entre as prevalências de cada país ou região estudada. Em países como Alemanha, Áustria, Suíça e Grã-Bretanha a theileriose equina ainda não se estabeleceu (FRIEDHOFF et al., 1990).

Na América Latina, *T. equi* já foi descrito em diversos países como República de Trinidad e Tobago (ASGARALI et al., 2007; RAMPERSAD et al., 2003), Venezuela, com prevalência de 50,3% (MUJICA et al., 2011) e Colômbia (TENTER; FRIEDHOFF, 1986).

Os Estados Unidos e o Canadá são considerados livres de *T. equi* e *B. caballi*, com exceção do estado da Flórida (HOLBROOK, 1969). O continente Australiano é o único em que a piroplasmose equina não se estabeleceu (MAHONEY et al., 1977; FRIEDHOFF et al., 1990).

A prevalência de *T. equi* relatada em alguns estudos no Brasil é de aproximadamente 90% (LINHARES, 1994; PFEIFER BARBOSA et al., 1995; BATTSETSEG et al., 2002; SANTOS et al., 2011). Sabendo-se que este agente permanece no organismo do animal infectado por provavelmente toda a sua vida (MEHLHORN; SCHEIN, 1998; RÜEGG et al.,

2008), além de ser de difícil tratamento através de fármacos, é considerado um dos principais agentes de influência nas perdas econômicas da produção equina em nível nacional.

Na região sul do Brasil há relatos sobre prevalência abaixo da média observada nas outras regiões do país. Em estudo conduzido por Golynsky et al. (2008), foi observada soropositividade em torno de 35% na zona norte do estado do Rio Grande do Sul. Já no município de Bagé, do referido estado, Nizoli et al. (2008) observaram soroprevalência de 22,1% para *T. equi* através da RIFI e positividade de 15% através da PCR.

No estado de São Paulo, região sudeste do país, observou-se soroprevalência de 21,6% (KERBER et al., 2009) e 75% (BALDANI et al., 2004). No Rio de Janeiro, Botteon et al. (2002) observaram soroprevalência de 89%, em equinos criados em sistema extensivo, 87% em equinos criados em sistema semi-confinado e 45% de soropositividade para animais criados em regime confinado. No mesmo estado, Santos et al. (2011) observaram soroprevalência de 89% nos equinos testados pela RIFI.

No Centro-Oeste do país, em estudo conduzido por Linhares (1994) foi observado prevalência de 94,7% para *T. equi* nos equinos testados pela RIFI.

A diferença entre as prevalências observadas em estudos sobre a piroplasmose equina é comum. Isso ocorre pelas diferenças climáticas dos locais de coleta das amostras, pela abundância de carrapatos vetores na região de estudo, pelas diferenças entre sensibilidade das técnicas de diagnóstico utilizadas nestes estudos, pelo tipo de manejo adotado na criação dos equinos e pelas medidas de controle e profilaxia aplicadas contra ectoparasitos.

2.5.4 Fatores associados à infecção por *Theileria equi*

No Brasil, a theileriose equina é endêmica e a identificação de fatores de risco e/ou associados à infecção por *T. equi* pode ter um papel fundamental na adoção de medidas profiláticas. Além disso, os fatores associados à ocorrência de *T. equi* no animal podem sugerir evidências epidemiológicas sobre os mecanismos pelos quais o referido agente se distribui na população de hospedeiros vertebrados e invertebrados. Buscar a causa e os fatores que influenciam a ocorrência de eventos relacionados ao processo saúde-doença é uma das principais questões da epidemiologia (PEREIRA, 1995).

Existem diversos fatores incriminados como de influência para a ocorrência de theileriose equina. Heuchert et al. (1999) relataram o tipo de fazenda criadora de equinos como um fator associado à infecção por *T. equi*. Este fato foi observado, pois fazendas de criação de equinos do tipo convencional (sistema de criação extensivo) possuíam alta infestação por carrapatos nos animais, índice considerado muito maior em detrimento das fazendas de criação profissional. Os autores concluíram que o tipo de manejo empregado na criação parecia ser um fator associado à prevalência de *T. equi* na propriedade. Shkap et al. (1998) observaram a baixa positividade no grupo dos garanhões estudados, e atribuíram este fato ao excelente manejo que estes animais recebem, e não à classe de equinos investigada. No Rio de Janeiro, Santos et al. (2011) observaram que animais criados em propriedades consideradas de nível ruim tem mais chances de exposição à *T. equi* em detrimento aos animais criados em condições boas, ótimas ou moderadas.

A criação de equinos em contato próximo a bovinos também foi considerado por Heuchert et al. (1999), um fator de risco para infecção por *T. equi*, porque a infestação de equinos com *R. microplus* foi associada ao contato direto destes animais com a criação de bovinos, nas mesmas pastagens. Além disso, *R. microplus* não foi detectado em equinos criados em fazendas profissionais no estudo, reforçando a sugestão dos autores.

A atividade diária do animal na propriedade também parece ter relação com a positividade para *T. equi*. Para Camacho et al. (2005), a utilização dos animais para recreação e passeio pode predispor à exposição aos carrapatos vetores, aumentando as chances de exposição aos agentes da piroplasmose equina. Da mesma forma, Shkap et al. (1998)

associaram a alta prevalência de equinos soropositivos para *T. equi* em Israel aos animais com atividade de passeio, que possuíam acesso à pastagem. Animais utilizados para trabalho na propriedade tiveram alta taxa de positividade para *T. equi* em relação aos animais de corrida (KOUAM et al., 2010).

O sistema de criação extensivo, semi-confinado e confinado, também foi um fator associado à positividade para *T. equi* em diversos estudos. Botteon et al. (2002) observaram que a soroprevalência de animais criados em sistema extensivo foi o dobro da observada em animais criados confinados (sistema intensivo de criação) na mesma região de estudo. Na Itália, Moretti et al. (2010) observaram que animais que pastejam tem 9,2 vezes mais chances de terem contato com os agentes da piroplasmose equina.

Os fatores relacionados à interação do equino com o meio ambiente que o cerca, em muitos casos, influenciam a taxa de infestação por carrapatos nos animais, como é o caso de equinos que tem acesso livre ao pasto. A infestação por carrapatos é outro fator associado à positividade de equinos para *T. equi*, avaliada de forma direta, pela visualização de carrapatos nos animais (KERBER et al., 2009) ou indireta, pela suposição através de outras variáveis do estudo como sistema de criação, acesso a pasto (BOTTEON et al., 2002; MORETTI et al., 2010).

Com relação às variáveis inerentes ao equino, Rüegg et al. (2007) observaram que a soropositividade dos animais para *T. equi* aumentava em relação à idade e que, a partir dos dois anos de idade pode-se esperar uma prevalência de 50%. Além disso, é esperado que 12,5% dos animais já estejam infectados ao nascimento. Porém, outros autores não identificaram nenhuma relação da idade com a presença do agente nos animais (SHKAP et al., 1998; MORETTI et al., 2010; MUJICA et al., 2011; SANTOS et al., 2011; FARKAS et al., 2013).

A raça do animal e o sexo são fatores que parecem não estar relacionados à prevalência de *T. equi* no rebanho equino (ASGARALI et al., 2007; MUJICA et al., 2011; FARKAS et al., 2013).

A elaboração de modelos na compreensão da realidade de uma doença é uma representação visual da concepção de que as doenças são produtos de vários fatores, e da interação bastante complexa destes (PEREIRA, 1995). Quando são múltiplos os fatores a serem considerados no processo saúde-doença, indica-se o uso da análise multivariada de dados. Ela tem por objetivo determinar quais são os fatores que significativamente concorrem para o aparecimento da doença, e sobre eles atuar com medidas preventivas (PEREIRA, 1995). A cadeia epidemiológica de transmissão de *T. equi* permanece sem algumas respostas, impossibilitando a tomada de medidas de prevenção mais eficazes.

2.6 Patogenia

2.6.1 Manifestações clínicas

Após a infecção por *T. equi*, o período de incubação do piroplasma é de 12-19 dias, ocorrendo então os primeiros sintomas (DE WAAL, 1992). Para os animais portadores assintomáticos desse agente, o exercício físico intenso pode predispor às manifestações clínicas (HAILAT et al., 1997).

Durante a fase aguda da doença o animal apresenta como sinais clínicos: febre acima de 40°C, anorexia, anemia, icterícia, vários graus de hemoglobinúria, esplenomegalia, fraqueza, respiração e batimentos cardíacos elevados (NUTTALL; STRICKLAND, 1912; DUPONT; TERRA, 1952; DE WAAL, 1990; 1992), petéquias e edemas (CASSAMAGNAGHI, 1948; DUPONT; TERRA, 1952). A forma clínica de theileriose geralmente ocorre quando equinos susceptíveis são movidos para áreas endêmicas, quando equinos portadores são movidos para áreas que contenham carrapatos vetores, devido à

capacidade de transmissão do agente para equinos susceptíveis (KNOWLES, 1988), ou ainda quando o animal infectado por *T. equi* apresenta-se imunodeprimido.

Após a inoculação de *T. equi* em três equinos livres desta protozoose, Nuttall e Stickland (1912) observaram que o parasito pôde ser detectado em esfregaço de sangue a partir do sétimo dia após a inoculação experimental. Observaram também que o pico febril coincidiu com a elevada parasitemia, o que ocorreu por volta do 11º dia após inoculação de sangue contendo *T. equi*.

Em casos subagudos, ainda podem ser observados anorexia, perda de peso, taquipnéia e taquicardia, petéquias e equimoses nas mucosas e sinais de cólica (DE WAAL, 1992). A febre pode ocorrer ou não. A urina pode apresentar-se de amarela à castanho avermelhada.

Em áreas endêmicas, o agente pode ser mais prevalente do que o número de casos clínicos, sendo característica nestes casos, a cronicidade da doença. Em casos crônicos, os sinais clínicos não são específicos, podendo cursar com baixo desempenho, leve inapetência e redução de massa corpórea (DE WAAL, 1992). Os animais portadores são os principais responsáveis pela manutenção da infecção em uma região criadora de equinos.

Animais cujo diagnóstico e tratamento foram negligenciados, podem apresentar acentuado grau de anemia e fraqueza, além de edema na região distal dos membros, podendo vir a óbito (DE WAAL, 1992). A insuficiência renal aguda, cólica, pneumonia, redução na fertilidade de garanhões e éguas são algumas complicações já relatadas em casos de piroplasmose equina (DE WAAL, 1992).

2.6.2 Alterações hematológicas

As alterações hematológicas mais frequentes encontradas em equinos infectados por *T. equi* são: a redução do número de hemácias (HEM), redução no volume globular (VG), redução na concentração de hemoglobina (HB) e redução do número de plaquetas (PLAQ) (DE WAAL, 1987; HAILAT et al., 1997; CAMACHO et al., 2005). Em casos agudos, a neutrofilia e a linfopenia também são observadas (RUBINO et al., 2006), além da redução no fibrinogênio, ferro sérico e fósforo. A bilirrubina sérica é encontrada em taxa elevada (DE WAAL, 1987).

Em estudo realizado por Camacho et al. (2005) na Espanha, os animais infectados por *T. equi* que apresentaram alguma sintomatologia clínica tiveram seus valores de VG, HEM, HB e PLAQ reduzidos, além de bilirrubina total aumentada. Além disso, estes valores diferiram significativamente dos demonstrados pelo grupo controle. A anemia associada às altas taxas de bilirrubina total sustenta o quadro de anemia hemolítica nos animais infectados (CAMACHO et al., 2005; HAILAT et al., 1997).

Segundo Zobba et al. (2008), trombocitopenia foi um achado encontrado em 39,1% dos equinos infectados por *T. equi*, em 80% dos infectados por *B. caballi*, e em 100% dos que apresentaram coinfeção. O mecanismo de redução de plaquetas ainda é mal compreendido nas piroplasmoses. Algumas hipóteses apontam a coagulação intravascular disseminada local e sistêmica, destruição imunomediada e o sequestro de plaquetas pelo baço (BOOZER; MACINTIRE, 2003).

O aumento das enzimas Aspartato aminotransferase (AST) e Creatinofosfoquinase (CPK) em equinos estão relacionados em muitos casos a disfunções musculares e hepáticas (DA CÁS et al., 2001). Já a enzima γ -Glutamilttransferase (GGT) pode estar aumentada em disfunções hepáticas associadas à colestase e a Uréia (UR) em casos de disfunção renal (EVANS, 2009). Em estudo realizado por Camacho et al. (2005), observaram aumento significativo nas taxas de UR, AST, GGT e CPK entre o grupo de equinos que apresentaram sintomatologia clínica e o grupo controle. A UR elevada em casos de infecção por *T. equi* nos animais pode estar associada à desidratação, em decorrência da prostração e anorexia ou à insuficiência renal aguda, complicação já relatada em casos de piroplasmose equina (DE

WAAL, 1992). Já as enzimas AST, GGT e CPK podem estar aumentadas em manifestações clínicas devido à degeneração centrolobular e necrose de hepatócitos (CAMACHO et al., 2005; HAILAT et al., 1997).

2.7 Diagnóstico Laboratorial

A piroplasmose equina tem sido diagnosticada principalmente através da pesquisa do agente etiológico, por microscopia direta em amostras de sangue através da técnica de esfregaço sanguíneo; pela PCR; por métodos indiretos, como o ELISA, a RIFI e a RFC. É importante ressaltar que cada teste diagnóstico tem uma indicação adequada e que todos possuem vantagens e desvantagens.

As técnicas sorológicas, utilizadas para detecção de IgG, aplicam-se a estudos de levantamento epidemiológico, pois detectam infecções subclínicas ou crônicas devido à alta sensibilidade (BRÜNING, 1996; SANTOS et al., 2009; DE WAAL, 2012; IKADAI et al. 2002).

Em 1969, a RFC foi declarada como o teste oficial na detecção de babesiose equina (FRIEDHOFF, 1982). Porém, a partir de estudos desenvolvidos, observou-se que esta é uma técnica subjetiva, cuja resposta depende da classe de imunoglobulina presente na amostra, e apresenta muitos resultados falso-negativos, além da necessidade de equinos esplenectomizados como única fonte de antígeno suficiente para a RFC (KNOWLES, 1996). Em estudo realizado por Santos et al. (2009), foi observada baixa sensibilidade da RFC em relação ao ELISA e à RIFI. Por todos estes motivos, a Organização Internacional de Epizootias (OIE) recomendou que a RIFI, ou mesmo o ELISA, sejam utilizados em substituição à RFC (TENTER; FRIEDHOFF, 1986).

O ELISA é um teste simples, porém no caso de piroplasmose equina, podemos observar reação cruzada entre *T. equi* e *B. caballi* e portanto, ele perde em especificidade (BRÜNING et al., 1997). Neste mesmo estudo, ainda relatam que a técnica Western blotting pode ser utilizada posterior ao ELISA para determinar a espécie do piroplasma. No entanto, dependendo do objetivo do teste, não é necessária a determinação da espécie na infecção, como é o caso de testes realizados para o trânsito internacional de animais, onde um animal soro reagente para *T. equi* ou *B. caballi* fica impossibilitado de transitar a nível internacional.

A RIFI tem se mostrado mais sensível que a RFC e raramente observa-se um resultado falso-negativo a partir desta técnica (TENTER; FRIEDHOFF, 1986). No entanto, consome mais tempo, é subjetiva e requer profissional habilitado para a interpretação dos resultados (BRÜNING et al., 1997). Além disso, a produção e disponibilidade do antígeno é uma das principais barreiras da técnica (SHKAP et al., 1998). Devido às desvantagens apresentadas em diversos estudos, a elaboração de uma técnica sorológica de baixo custo, rápida, sensível e específica é necessária, principalmente porque estes testes têm assumido um papel internacional importante na movimentação de equinos (BALDANI et al., 2007).

Levando em consideração a baixa sensibilidade do exame microscópico de esfregaço de sangue, principalmente na fase latente da doença, e a limitação dos métodos sorológicos por detectarem apenas anticorpos e/ou a possibilidade de reações cruzadas com outros agentes, a utilização dos métodos moleculares como ferramenta de diagnóstico assume grande importância. Estudos observaram que a PCR é um método direto de diagnóstico mais sensível que a técnica de microscopia para a visualização do agente por esfregaço sanguíneo em lâminas (BASHIRUDDIN et al., 1999; RAMPERSAD et al., 2003; ALHASSAN et al., 2007; BALDANI et al., 2008).

Vários estudos têm utilizado a ferramenta molecular de diagnóstico, baseada na PCR, para a detecção do DNA de piroplasmas em equinos (BASHIRUDDIN et al., 1999; RAMPERSAD et al., 2003; ALHASSAN et al., 2007; KIM et al., 2008; BHOORA et al., 2010).

Os primeiros passos para desenvolver um teste molecular no início da década de 90 contaram com sondas do DNA espécies-específicas, desenhadas para detectar parasitos em amostras de sangue de animais experimentalmente e naturalmente infectados (POSNETT et al., 1991; POTGIETER et al., 1992). No entanto, as técnicas baseadas na hibridização através de sondas do DNA foram substituídas pela PCR, uma vez que essa apresenta maior especificidade e menor custo quando comparada à hibridização (OHTA et al., 1995).

Atualmente, a PCR em tempo real (qPCR) vem apresentado bons resultados na detecção de patógenos transmitidos por carrapatos em amostra de sangue (UETI et al., 2005; 2008; KIM et al., 2008). Esta técnica é caracterizada como um método alternativo para o ensaio da PCR convencional, pois utilizam marcadores moleculares específicos (sondas), quando no sistema Taqman, que aumenta ainda mais a especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade do teste (LEUTENEGGER, 2001).

Em amostras de carrapato, a detecção do DNA de *T. equi* já foi descrito a partir do exame direto de hemolinfa (ZAPF; SCHEIN, 1994a), esfregaço de órgãos (ZAPF; SCHEIN, 1994a; ZAPF; SCHEIN, 1994b), pela técnica da PCR (BATTSETSEG et al., 2001; BATTSETSEG et al., 2002; UETI et al., 2005; UETI et al., 2008; IORI et al., 2010; RIBEIRO et al., 2011; ZAKKYEYH et al., 2012) e qPCR em tecido do carrapato (PAULAUSKAS et al., 2008).

2.8 Theileriose e sua Importância Econômica na Criação de Equinos

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 animais movimentando 7,3 bilhões de reais em todo o país (MAPA, 2012). A região Sudeste do país concentra o maior número de animais, sendo que o estado do Rio de Janeiro abriga cerca de 120 mil animais (IBGE, 2010).

A piroplasmose equina é considerada no mundo inteiro o principal impedimento para o trânsito internacional de equinos, seja para exportação de animais, seja para participação em esportes, comprometendo de forma considerável o negócio equestre brasileiro. Da mesma forma, esta doença causa prejuízos decorrentes de gastos com tratamentos, abortamentos e mortes (DE WALL, 1992; ALLSOPP et al., 2007). Theileriose equina, em especial, é endêmica em quase todas as regiões brasileiras, com alta prevalência no Sudeste do país. Além disso, persiste provavelmente durante toda a vida do animal e é de difícil eliminação do organismo por fármacos convencionais (DE WAAL; VAN HEERDEN, 1994). Neste aspecto, a prevenção da doença é de suma importância nas criações de equinos, porém, pouco se sabe sobre o papel do vetor ixodídeo natural como responsável pela alta prevalência de *T. equi* no rebanho de equídeos do Brasil.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição da Área de Estudo

O estudo foi realizado nos municípios de Petrópolis e Seropédica, estado do Rio de Janeiro, Brasil (Figura 2).

Coordenadas geográficas:

- Município de Seropédica (22° 44' 38'' latitude Sul; 43° 42' 27'' longitude Oeste; Altitude 26 a 300 metros ao nível do mar).
- Município de Petrópolis (22°30'18'' latitude Sul; 43°10'44'' longitude Oeste; altitude: 809 a 1200 metros ao nível do mar).

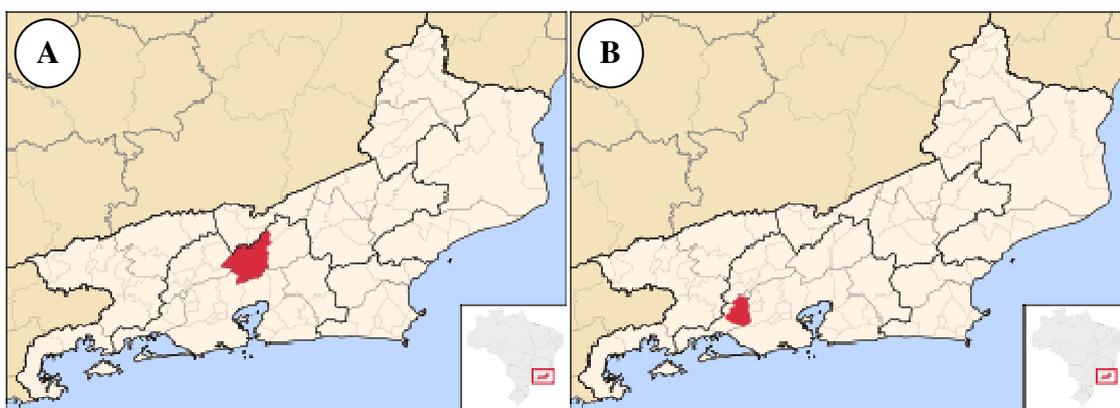


Figura 2. Localização geográfica dos municípios de Petrópolis (A) e Seropédica (B), Rio de Janeiro. Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Petr%C3%B3polis>/<http://pt.wikipedia.org/wiki/Serop%C3%A9dica>

O município de Seropédica, localizado em região de baixa altitude no Rio de Janeiro, possui clima tropical semi-úmido, classificado como Aw pelo Köppen-Geiger (PIEEL et al., 2007), com chuvas abundantes no verão e invernos secos. A temperatura média anual varia de 22°C a 24°C e o índice pluviométrico é de 1.000 a 1.500 milímetros anuais. Já Petrópolis, localizada em região de alta altitude no referido estado, possui um clima tropical de altitude, classificado como Cwa pelo Köppen-Geiger (PIEEL et al., 2007), com verões pouco quentes e chuvosos e invernos frios e secos. A temperatura média anual é de 19°C (SANTOS, 2009), podendo chegar a 0°C em invernos rigorosos.

3.2 Princípios Éticos

Todas as etapas deste estudo que tiveram a utilização de animais foram realizadas por equipe formada por Médicos Veterinários capacitados, além de prévia aprovação do projeto pela Comissão de Ética na Pesquisa da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (COMEP/UFRRJ), processo número 23083.001257/2012-53 (protocolo N°201/2012). Portanto, o trabalho atende aos princípios básicos e éticos para a pesquisa desenvolvida com o uso de animais (ANEXO II).

3.3 Tamanho da Amostra e Amostragem

O tamanho da amostra foi definido conforme equação descrita por Sampaio (2002), sendo a amostragem realizada por conveniência na região de estudo, admitindo-se uma

prevalência esperada de 59% (HEIM et al., 2007), margem de erro de 5% e precisão absoluta desejada de 9%.

$$n = \frac{1,96^2 \times P_{\text{esp}}(1 - P_{\text{esp}})}{d^2}$$

Onde: n = tamanho da amostra; P_{esp} = prevalência esperada; d = precisão absoluta desejada.

Após aplicação da referida fórmula, obteve-se um número amostral mínimo de 115 equinos para cada município. Foram coletadas 314 amostras de sangue de equinos, sendo 173 de Petrópolis e 141 de Seropédica, satisfazendo o número amostral mínimo.

Amostras foram coletadas em 31 propriedades com criação de equinos, sendo 16 no município de Seropédica e 15 em Petrópolis, sendo 16 e 15 respectivamente. Além das propriedades selecionadas em Petrópolis, equinos pertencentes a uma Organização Não Governamental (ONG) também foram selecionados para o estudo. Foram coletadas 300 amostras de carrapatos presentes nestes animais no momento da inspeção.

3.4 Coleta e Armazenamento das Amostras de Sangue e Carrapatos

Com o consentimento dos proprietários, os animais foram inspecionados quanto à presença de carrapatos e o nível de infestação, e posteriormente foi realizada a coleta das amostras de sangue e carrapatos. As amostras de sangue foram coletadas por venopunção jugular em tubos à vácuo, estéreis, contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetracético (EDTA), em um volume médio de 4mL por animal. Estas amostras foram 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.

Após a utilização das amostras de sangue para a análise hematológica do animal, elas foram alíquotadas em microtubos de polipropileno de 1,5 mL e mantidas a -80°C até o momento da extração do DNA total.

Em relação aos carrapatos, foram coletados, em média, 10 espécimes de diversos estágios evolutivos, após visualização nas diferentes áreas do corpo de cada animal infestado. A identificação taxonômica foi realizada com base na chave dicotômica de Barros-Battesti (2006) e Aragão e Fonseca (1961). Após a identificação, estes espécimes foram armazenados em “pools” de acordo com a espécie, o estágio de desenvolvimento e o dimorfismo sexual em tubos de polipropileno contendo álcool isopropílico. O nível de infestação por carrapatos foi mensurado nos equinos de forma subjetiva a partir de espécimes adultos observados nos animais, sendo categorizado e classificado em dois níveis de infestação (ausente/baixo ou moderado/alto) segundo Labruna et al. (2001).

3.5 Análise Hematológica

As amostras de sangue dos equinos coletadas em tubos contendo EDTA, foram homogeneizadas e submetidas à análise pelo contador automático de células (ABC VET, Horiba ABX). Em seguida, após nova homogeneização, foram confeccionados esfregaços sanguíneos. As lâminas contendo os esfregaços foram fixadas em metanol e coradas pelo Giemsa (MERCK®, Germany). A proteína plasmática total foi quantificada por refratometria segundo Coles (1984). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada por microscopia óptica, através da análise dos esfregaços sanguíneos.

Os parâmetros hematológicos avaliados foram: volume globular (VG), hemoglobina (HB), número de hemácias (HEM), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina

corpúscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpúscular média (CHCM), amplitude de distribuição das hemácias (ADH), número de plaquetas (PLA), volume plaquetário médio (VPM), número de leucócitos (LEUC), número de linfócitos (LIN), número de monócitos (MON), número de neutrófilos (NEUT), número de eosinófilos (EOS) e número de basófilos (BAS).

3.6 Questionário Epidemiológico

Com o objetivo de avaliar os possíveis fatores associados à infecção dos equinos por *T. equi*, foi aplicado um questionário semiestruturado (ANEXO I) sobre questões referentes ao equino, à criação e ao manejo realizado na propriedade.

Uma ficha individual foi preenchida por animal, contendo informações básicas como sexo, idade, raça. As variáveis idade e raça foram posteriormente categorizadas como dicotômicas, sendo a idade dividida em animais maiores de dois anos e menores ou igual a dois anos, e a raça dividida em animais mestiços (sem raça definida) e com raça definida (animais considerados de raça única).

Outros fatores foram abordados no questionário, dentre os quais: a localidade (Municípios de Seropédica ou Petrópolis); Manejo satisfatório ou insatisfatório da propriedade (manejo satisfatório: instalações zootécnicas apropriadas à criação, animais recebem alimentação adequada, presença de controle sanitário e assistência veterinária constante; manejo insatisfatório: instalações zootécnicas inadequadas à criação, os animais não recebem alimentação balanceada rotineiramente, o controle sanitário não é sistemático e a assistência veterinária ocorre somente em casos de emergência); Presença ou ausência de carrapatos nos animais; Equinos criados com ou sem contato próximo de bovinos; Sistema de criação confinado ou Semi-confinado/extensivo (Sistema confinado: animal sem acesso às áreas externas, restrito à baia ou Sistema Semi-confinado/extensivo: acesso limitado ou total a áreas de pastagem); Atividade dos animais (Esporte/Exposição; Trabalho/Passeio ou Reprodução).

3.7 Extração do DNA das Amostras de Sangue e Carrapato

A extração do DNA das amostras de sangue foi realizada a partir de 300µL de sangue, utilizando-se o Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega®, Madison, USA) de acordo com as recomendações do fabricante.

Para a extração do DNA das amostras de carrapatos, os espécimes foram macerados em “pools” separados por espécie, estágio evolutivo e gênero. Cada “pool” continha em média, 10 exemplares de ninfas, 10 exemplares de larvas, 2 exemplares de fêmeas não ingurgitadas ou 3 exemplares de machos. As fêmeas ingurgitadas foram maceradas individualmente. Após esta etapa, o DNA de cada “pool” foi extraído com base em protocolo de extração do DNA genômico segundo Ferreira e Grattapaglia (1998) com algumas adaptações (SANTOS, 2011). A cada bateria de 11 amostras, um controle com água ultrapura (Nuclease-Free Water, Ambion®) foi incluído com a finalidade de verificar contaminação durante o processo de extração do DNA.

As amostras do DNA foram ressuspendidas em 200µL de Tris-EDTA (TE), quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop® ND-2000 (Nanodrop Technologies, DE, USA), alíquotadas na concentração de 60 ng/µL e armazenadas a -20°C até o momento da utilização.

3.8 Sensibilidade Analítica da PCR em Tempo Real para Detecção de *Theileria equi*

A sensibilidade analítica do ensaio foi determinada pela avaliação de diluições decimais seriadas do gene *18S rRNA* clonado em plasmídeo pGEM-T® Easy Vector System (Promega, Madison, WI, USA). A concentração e pureza do DNA plasmidial foram mensuradas em espectrofotômetro Nanodrop® ND-2000 (Nanodrop Technologies, DE, USA). A concentração do DNA plasmidial serviu de base para o cálculo do número de plasmídios.

A sensibilidade da qPCR foi avaliada com e sem a adição de 1µL do DNA extraído de sangue total de um equino não infectado e com e sem a adição de 1µL do DNA extraído de carrapato não infectado.

Para determinar a precisão das réplicas na qPCR, foi confeccionada uma curva padrão composta por cinco pontos, plotando-se o número de cópias do plasmídeo pelos valores do Ciclo de Quantificação (C_q) de cada réplica. A partir desta, o coeficiente de correlação foi calculado. O número de cópias variou de 3×10^4 a apenas três, e quatro diluições separadas foram realizadas para cada ponto na curva.

Para determinar a eficiência da qPCR foram confeccionadas curvas de sensibilidade analítica, plotando-se o delta Rn pelos valores de C_q .

3.9 Ensaio da PCR em Tempo Real

A detecção de *T. equi* foi realizada através do sistema TaqMan da qPCR no aparelho StepOne Plus® (Applied Biosystems) para amplificação de um fragmento de 85pb do gene *18S rRNA* (KIM et al., 2008). Foi utilizado um par de *primers* Be18SF (5'-GCGGTGTTTCGGTGATTCATA-3') e Be18SR (5'-TGATAGGTCAGAACTTGAATG ATACATC-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 (KIM et al., 2008). As reações foram realizadas em duplicata com volume final de 12µL, contendo: 1X de TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems®), 450nM de cada primer, 250nM da sonda e 180ng de DNA total.

As condições de termociclagem foram: 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). A linha que determina o limite de detecção foi padronizada entre as placas e manualmente alocada três ciclos após a fluorescência de base. As amostras com o C_q inferior ou igual a 40 ciclos foram consideradas positivas.

3.9.1 Cuidados na técnica da PCR em tempo real

As amostras do DNA foram padronizadas na concentração de 60ng/µL em alíquotas de 10µL, de forma que cada uma fosse descongelada no máximo três vezes, garantindo a integridade do DNA e a confiabilidade da técnica.

Com o objetivo de evitar contaminação, a extração do DNA, o preparo da reação e a pipetagem das amostras foram realizadas em ambientes separados. 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 de cada reação. Ponteiras com filtro foram utilizadas em todas as etapas do estudo. Todas as reações da PCR foram realizadas em sistema fechado.

Dois controles positivos (amostra de sangue de equino positivo – cepa Jaboticabal/UNESP) e dois controles negativos foram adicionados em cada placa de reação, 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 pelo menos duas vezes, em placas distintas e a amplitude média de seus C_q foi observada.

3.10 Análise Estatística

3.10.1 Epidemiologia

A positividade dos equinos para *T. equi*, determinada a partir da qPCR, foi associada através do teste Qui-quadrado ou exato de Fisher em nível de 20% de significância com as variáveis do questionário epidemiológico.

Para as variáveis independentes que apresentaram diferença estatística significativa ($P < 0,20$) na análise bivariada, foi elaborada uma matriz de coeficiente de correção através do teste de correlação de Spearman, com o objetivo de verificar a colinearidade e eliminar as variáveis altamente correlacionadas do modelo de regressão logística. Variáveis cujo coeficiente de correlação (ρ) está abaixo de 0,8 não estão altamente correlacionadas e, portanto, são adequadas para utilização na análise multivariada (KATZ, 1999). No teste de Spearman, somente as variáveis independentes com $p < 0,05$ associado ao $\rho < 0,6$ foram mantidas no modelo de regressão logística. Entre duas variáveis altamente correlacionadas ($p < 0,05$ e $\rho \geq 0,6$), a biologicamente mais importante foi mantida no modelo.

Para a avaliação dos fatores associados à presença do DNA de *T. equi* em equinos, utilizou-se um modelo multivariado através da regressão logística múltipla, utilizando a variável dependente (resultado da qPCR para *T. equi*) em nível dicotômico qualitativo (negativo=0; positivo=1) em função das variáveis independentes presentes no questionário epidemiológico, em nível de 5% de significância.

Com o objetivo de verificar o efeito isolado que a variável “presença de carrapato” possui sobre a presença do DNA de *T. equi* nos equinos avaliados, um modelo de regressão logística foi elaborado com variáveis dicotômicas qualitativas (ausência=0 ou presença=1) de cada espécie de carrapato em relação à presença do DNA de *T. equi* nos equinos. A partir do resultado desta análise, foi elaborado um modelo de regressão logística simples para avaliar o grau de infestação da espécie de Ixodídeo, em relação à presença do DNA de *T. equi* nos animais, sendo o grau de infestação uma variável qualitativa e dicotômica (ausente/baixo=0 ou moderado/alto=1) (LABRUNA et al., 2001).

Em relação às amostras de carrapatos, a presença do DNA de *T. equi* foi avaliada em função das diferentes espécies coletadas, dos gêneros, dos estágios evolutivos, e dos municípios estudados, através do teste Qui-quadrado ou exato de Fisher, em nível de 5% de significância.

Todos os modelos de regressão logística finais foram analisados pela razão de verossimilhança. As análises estatísticas foram realizadas no programa R, utilizando a interface gráfica R-Studio (DEVELOPMENT CORE TEAM, 2010).

3.10.2 Hematologia

Os parâmetros hematológicos dos equinos de cada município foram submetidos à análise descritiva dos dados. Em seguida, a distribuição normal de cada parâmetro foi verificada pelo teste de normalidade “Shapiro-Wilk”. Para dados que seguiram distribuição normal, os valores médios obtidos dos parâmetros hematológicos de animais infectados e não infectados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando significativos, foram analisados pelo teste “*t*-student” em nível de 5% de significância. Para dados hematológicos não paramétricos, os valores médios obtidos dos parâmetros hematológicos de animais infectados e não infectados foram submetidos ao teste “Mann-Whitney”, a 5% de significância.

A frequência de equinos que apresentaram alterações hematológicas no VG, HEM, HB, LEUC, PLAQ e VPM em função do resultado positivo na qPCR para *T. equi* foram comparadas através do teste Qui-quadrado ou exato de Fisher em nível de 5% de significância.

Além destas análises, foram selecionados três grupos de equinos a partir do C_q determinado pela qPCR, ou seja, de acordo com a quantidade de alvo do parasito detectada. Desta forma instituíram-se os grupos: negativo ($n=12$, $C_q=0$), positivo I ($n=12$; $C_q \leq 29$) e positivo II ($n=12$; $C_q > 29$), para cada município. Após a formação dos grupos, a análise dos índices VG, HEM, HB, LEUC, PLAQ, VPM foi realizada utilizando-se o teste de normalidade “Shapiro-Wilk”, seguido da ANOVA e teste “*t*-student” em nível de 5% de significância para dados normais, ou teste “Mann-Whitney”, a 5% de significância, para dados não normais. Os índices escolhidos, tanto para esta análise quanto para a análise de frequência, foram baseados nos índices que se mostraram alterados em outros estudos (CAMACHO et al., 2005; RUBINO et al., 2006; ZOBBA et al., 2008; AL-SAAD, 2009).

As análises estatísticas foram realizadas no programa R, utilizando a interface gráfica R-Studio (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2010).

4 RESULTADOS

4.1 Detecção Molecular Através da PCR em Tempo Real de *Theileria equi* em Equinos dos Municípios de Seropédica e Petrópolis

Do total de amostras sanguíneas de equinos, 81% (n=253/314) apresentaram amplificação de um fragmento de 85pb do gene *18S rRNA*, através da qPCR (Figura 3), específico para *T. equi*. Em relação aos municípios analisados, 91% (n=128/141) dos equinos de Seropédica apresentaram DNA de *T. equi*, diferindo estatisticamente ($p < 0,001$) da positividade dos equinos criados em Petrópolis (72%, n=125/173) (Tabela 1).

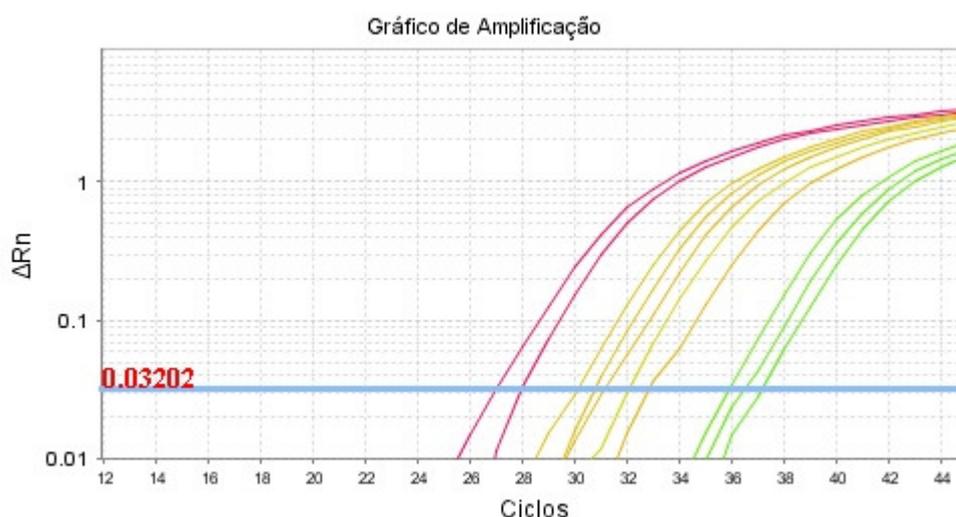


Figura 3. Curvas com padrões de amplificação do fragmento de 85pb do gene *18S rRNA* de *Theileria equi* em amostras de sangue de equinos dos Municípios de Petrópolis e Seropédica, obtidas pela PCR em tempo real utilizando o sistema TaqMan. Duas curvas deslocadas à esquerda: controle positivo; oito curvas deslocadas à direita: amostras positivas.

As variáveis inerentes aos equinos, como sexo, raça e a faixa etária dos animais não apresentaram associação com a positividade ($p > 0,20$) para *T. equi*. Contudo, em relação às variáveis relacionadas à propriedade e à criação dos animais, observou-se que o Município ($p < 0,0001$), o manejo da propriedade ($p < 0,00001$), a infestação por carrapatos nos animais ($p < 0,0001$), a criação de equinos em contato com bovinos ($p = 0,027$), e o tipo de atividade dos animais na criação ($p < 0,0001$), apresentaram associação ($p < 0,20$) com a presença do DNA de *T. equi* nos equinos (Tabela 1).

No modelo de regressão logística apenas a atividade do equino na propriedade ($p < 0,00001$) e a infestação por carrapatos ($p = 0,02$) apresentaram associação com a positividade de equinos para *T. equi*. A variável “manejo da propriedade” ($p < 0,00001$) foi retirada da análise multivariada por apresentar colinearidade com a variável “infestação por carrapatos” ($p < 0,00001$ e $\rho = 0,6$).

Os equinos com atividades de trabalho (animais de tração em atividades agrícolas, animais de montaria para manejo de bovinos) ou passeio (transporte e lazer de pessoas) apresentavam 5,35 vezes (IC: 2,3 – 14,4) mais chances de apresentarem o DNA de *T. equi*, quando comparados com os equinos que possuem atividade relacionada a esporte ou exposição. Os equinos utilizados para reprodução apresentaram 3,85 vezes (IC: 1,3 – 11,5) mais chances de apresentarem o DNA do agente. No presente estudo, a infestação por

carrapatos nos animais aumentou em 2,63 vezes (IC: 1,1- 6,2) a chance dos equinos apresentarem o DNA de *T. equi*.

Tabela 1. Análise bivariada e multivariada dos fatores associados à positividade por *Theileria equi* nos equinos, através da técnica da PCR em tempo real, em função das características dos animais, local de coleta, manejo de criação, atividade dos animais, sistema de criação, infestação por carrapatos e origem do animal, no estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Características dos animais e do manejo na criação	PCR em tempo real		Bivariada		Multivariada				
	N	Positivos (%)	χ^2	P	P	OR	IC 95%		
Sexo									
Macho	194	80,00	0,003	0,956	-	-	-		
Fêmea	120	80,93							
Idade									
≤ 2 anos	42	78,57	0,020	0,887	-	-	-		
> 2 anos	272	80,88							
Raça									
Sem raça definida	140	83,57	0,444	0,505	-	-	-		
Com raça definida	174	78,16							
Localidade									
Petrópolis (>400m)	173	72,25	15,870	0,000	a	-	0,6-3,2		
Seropédica (<400m)	141	90,78			0,39				
Manejo sanitário e zootécnico									
Satisfatório	150	66,67	33,803	0,000 _{bc}	-	-	-		
Insatisfatório	164	93,29							
Criação com bovinos									
Não	218	77,06	4,900	0,027	a	-	0,2-1,8		
Sim	96	88,54			0,48				
Atividade									
Esporte/Exposição	118	61,02	46,200	0,000	a	0,00	5,75		
Trabalho/Passeio	127	92,13			0,02			3,85	1,2-11,5
Reprodução	69	92,75							
Sistema de criação									
Confinado	19	78,95	-	0,970 _b	-	-	-		
Extensivo/Semi-extensivo	295	78,64							
Infestação por carrapatos									
Ausente	153	67,97	28,713	0,000	a	0,03	2,63		
Presente	161	92,55			1,1-6,2				
Origem do animal									
Interna	98	84,69	1,186	0,276	-	-	-		
Externa	216	78,70							

N: número de equinos; χ^2 : Teste Qui-quadrado; P: P valor; OR: Odds Rate; IC: intervalo de confiança; ^a: Valor de referência para análise multivariada; ^bTeste Exato de Fisher; ^cRetirada da análise multivariada pela colinearidade verificada pelo teste de Spearman.

Infestações por carrapatos foram observadas em 51,27% (n=161/314) dos equinos avaliados. As espécies de carrapatos observadas infestando os equinos foram *A. cajennense* e *D. nitens*, com frequência de 47,77% (n=150/314) e 31,85% (n=100/314), respectivamente. Infestações simultâneas pelas duas espécies de carrapatos foram observadas em 28,34% (n=89/314) dos equinos avaliados (Figura 4).

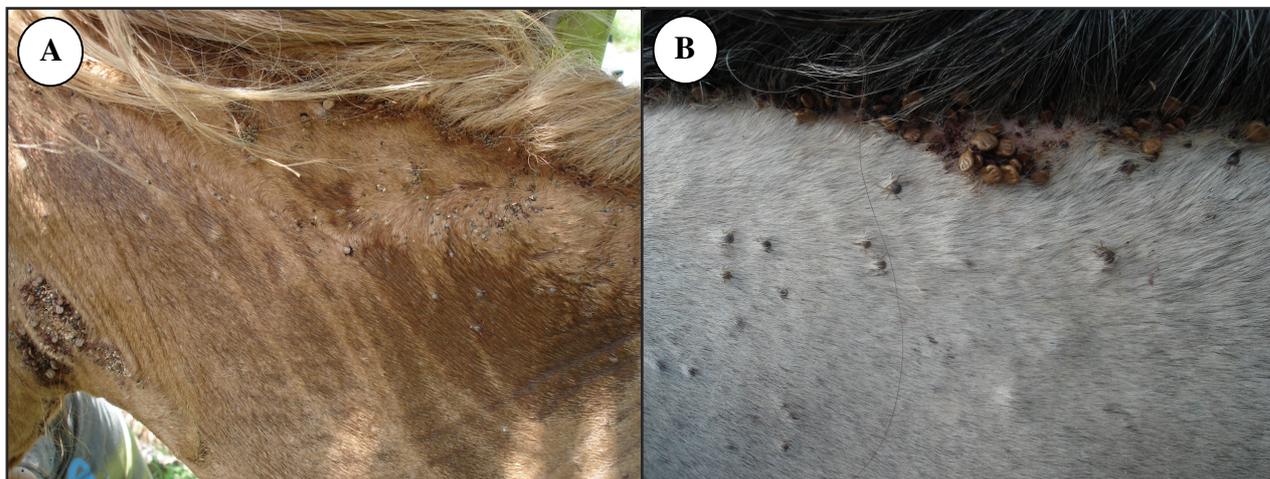


Figura 4. Infestação simultânea por *Amblyomma cajennense* e *Dermacentor nitens* na região da tábua do pescoço de dois equinos (A e B) do município de Seropédica, Rio de Janeiro.

Do total de 300 amostras de carrapatos coletados, *A. cajennense* foi identificado em 63,67% (n=191/300) e *D. nitens* em 34,67% (n=104/300). Amostras de espécimes adultos representaram a maioria da amostragem de carrapatos (n=274/300, 91,33%), seguidos por ninfas (n=21/300, 7%) e larvas (n=5/300, 1,67%). Os espécimes coletados em estágio inicial de desenvolvimento foram identificados em nível taxonômico como larvas de Ixodidae. Quanto ao sexo dos carrapatos, 61% (n=183/300) das amostras coletadas foram identificadas como fêmeas e 30,33% (n=91/300) como machos.

O resultado do modelo de regressão logística simples aplicado às espécies de carrapatos em relação à presença do DNA de *T. equi* nos equinos mostrou que os animais infestados com *A. cajennense* possuem quatro vezes mais chances de apresentar o DNA de *T. equi* (Tabela 2).

Tabela 2. Análise multivariada da positividade de *Theileria equi* em equinos, através da técnica da PCR em tempo real, em relação à espécie de carrapato observada nos animais no estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Presença de carrapato	PCR em tempo real		Multivariada		
	N	Positivos (%)	P	OR	IC
<i>Amblyomma cajennense</i>					
Sim	150	92,7	0,00	4,10	(1,8-9,1)
Não	164	69,5	^a	-	-
<i>Dermacentor nitens</i>					
Sim	100	93,0	0,18	-	-
Não	214	74,8	^a	-	-

N: número de equinos; P: P valor; OR: Odds Rate; IC: intervalo de confiança; ^a: Valor de referência para análise multivariada

Na avaliação do grau de infestação por *A. cajennense* em relação à positividade dos equinos, pelo modelo de regressão logística simples, observou-se que equinos com infestação considerada de moderada a alta possuem 2,7 vezes mais chance de apresentarem DNA de *T. equi* do que os animais com baixa ou nenhuma infestação (Tabela 3).

Tabela 3. Regressão logística simples na avaliação do grau de infestação por *Amblyomma cajennense* em comparação com a positividade dos equinos para *Theileria equi*, no estado do Rio de Janeiro, Brasil.

<i>Amblyomma cajennense</i>	Real Time PCR		Multivariada		
	N	Positivos (%)	P	OR	IC
Grau de infestação					
Moderada/alta infestação	74	90,5	0,01	2,77	(1,2-6,4)
Ausente/leve	240	77,5	^a	-	-

N: número de equinos; P: P valor; OR: Odds Rate; IC: intervalo de confiança; ^a: Valor de referência para análise multivariada.

4.2 Detecção Molecular Através da PCR em Tempo Real de *Theileria equi* em Carrapatos Coletados de Equinos nos Municípios de Petrópolis e Seropédica

Em relação à detecção do DNA de *T. equi* no total das amostras de carrapatos avaliadas, a presença do DNA alvo para *T. equi* foi observada em 7,67% (n=23/300) (Figura 5). Observou-se que 9,95% das amostras de *A. cajennense* (n=19/191) e 3,85% das amostras de *D. nitens* (n=4/104) amplificaram o fragmento de 85pb do gene *18S rRNA* de *T. equi*, não havendo diferença estatística (p=0,07) entre as espécies (Tabela 4). Ainda assim, vale destacar que embora não haja diferença estatística, a frequência de amostras de carrapatos *A. cajennense* consideradas positivas para *T. equi* foi 2,6 vezes maior do que a frequência do DNA de *T. equi* observada em *D. nitens*. Nas amostras de “pools” de ninfas (n=0/21) e larvas (n=0/5), não foi detectado o fragmento do DNA de *T. equi*.

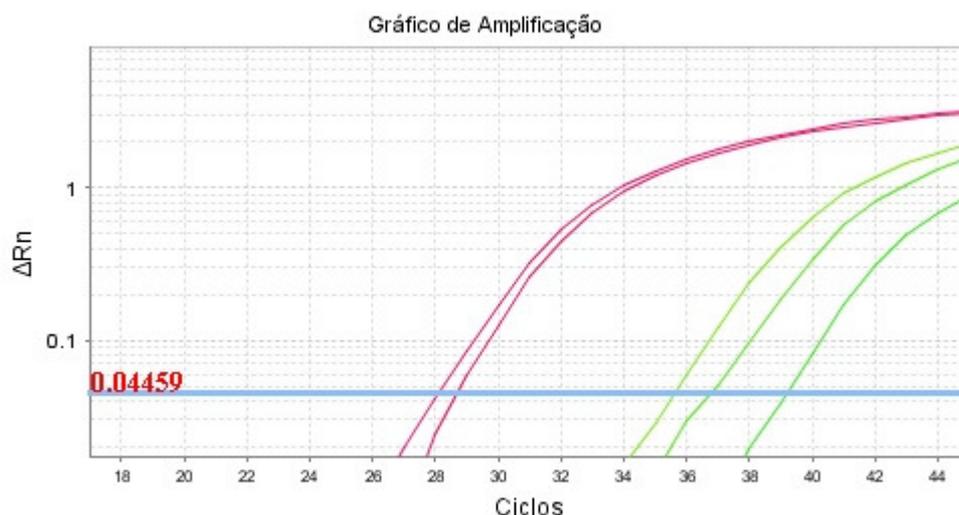


Figura 5. Curvas com padrões de amplificação do fragmento de 85 pares de bases do gene *18S rRNA* de *Theileria equi* em amostras de carrapatos *Amblyomma cajennense* e *Dermacentor nitens*, obtidas pela PCR em tempo real utilizando o sistema TaqMan. Duas curvas desloçadas à esquerda: controle positivo; três curvas desloçadas à direita: amostras positivas.

A frequência de carrapatos machos positivos para *T. equi* (15,38%, n=14/91) foi significativamente maior ($p < 0,05$) quando comparada à frequência das fêmeas (4,92%, n=9/183). Analisando a frequência de *T. equi* em relação ao sexo de cada espécie de carrapato coletado, observou-se uma frequência de 18,18% (n=12/66) de *T. equi* nos machos, percentual superior ($p < 0,05$) aos 5,78% (n=7/121) observados em fêmeas de *A. cajennense*. Entretanto, para a espécie *D. nitens* a frequência de amostras de carrapatos machos positivos (8%, n=2/25) não diferiu significativamente ($p > 0,05$) das fêmeas (3,22%, n=2/62) (Tabela 4).

Tabela 4. Análise bivariada dos fatores associados à positividade de *Theileria equi* nas amostras de carrapatos, através da técnica da PCR em tempo real, em função das características das amostras de carrapatos, como local de coleta, espécie identificada, estágio evolutivo e o sexo do carrapato, no estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Características das amostras de carrapato	PCR em tempo real		Bivariada	
	N	Positivos (%)	χ^2	P
Altitude				
<400m (Seropédica)	238	6,69	-	0,28*
>400m (Petrópolis)	62	11,29		
Espécie				
<i>Amblyomma cajennense</i>	191	9,95	-	0,07*
<i>Dermacentor nitens</i>	104	3,85		
Estágio evolutivo				
Adultos	274	8,39	2,36	0,31
Ninfas	21	0,00		
Larvas	5	0,00		
Sexo				
Macho	91	15,38	11,77	0,00
Fêmea	183	4,92		
<i>Amblyomma cajennense</i>				
Machos	66	18,18	7,78	0,02
Fêmeas	121	5,79		
Ninfas	4	0,00		
<i>Dermacentor nitens</i>				
Machos	25	8,00	1,91	0,38
Fêmeas	62	3,23		
Ninfas	17	0,00		

N: número de equinos; χ^2 : Teste Qui-quadrado; P: P valor; *Teste Exato de Fisher.

4.3 Sensibilidade Analítica da PCR em Tempo Real para Detecção de *Theileria equi*

A sensibilidade analítica da técnica da qPCR pelo sistema Taqman, foi avaliada utilizando-se um número conhecido de cópias do vetor-inserto. O limite de detecção da técnica foi de três cópias do plasmídeo contendo o gene *18S rRNA*. O coeficiente de correlação de quatro repetições das cinco diluições testadas na curva padrão foi de 97,65%, com C_q variando de $22 \pm 0,17$ ciclos na primeira diluição (3×10^4 cópias do plasmídeo) até $33,91 \pm 1,07$ ciclos na última diluição (três cópias do plasmídeo) (Figura 6).

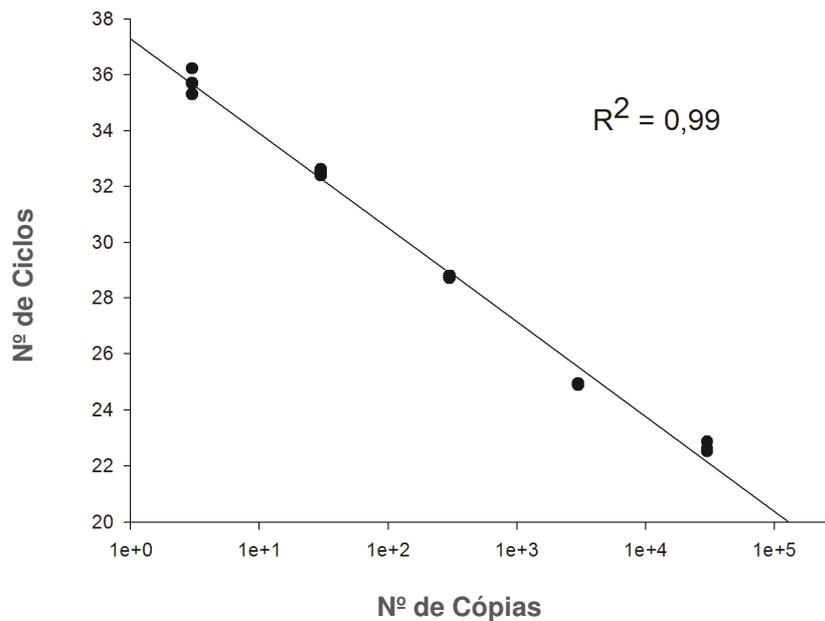


Figura 6. Curva padrão construída a partir de diluições decimais seriadas do DNA plasmidial, contendo o gene *18S rRNA* de *Theileria equi* ($\cong 1.600$ pb). O valor do Ciclo de Quantificação obtido pela PCR em tempo real utilizando o sistema Taqman foi plotado em função do número inicial de cópias do plasmídeo.

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na sensibilidade analítica quando $1\mu\text{L}$ do DNA da amostra de sangue de um equino não infectado ou $1\mu\text{L}$ do DNA de um carrapato não infectado foi adicionado à PCR. As curvas apresentaram a mesma inclinação durante a fase exponencial da amplificação demonstrando a eficiência da reação mesmo nos pontos com pouco alvo (Figura 7).

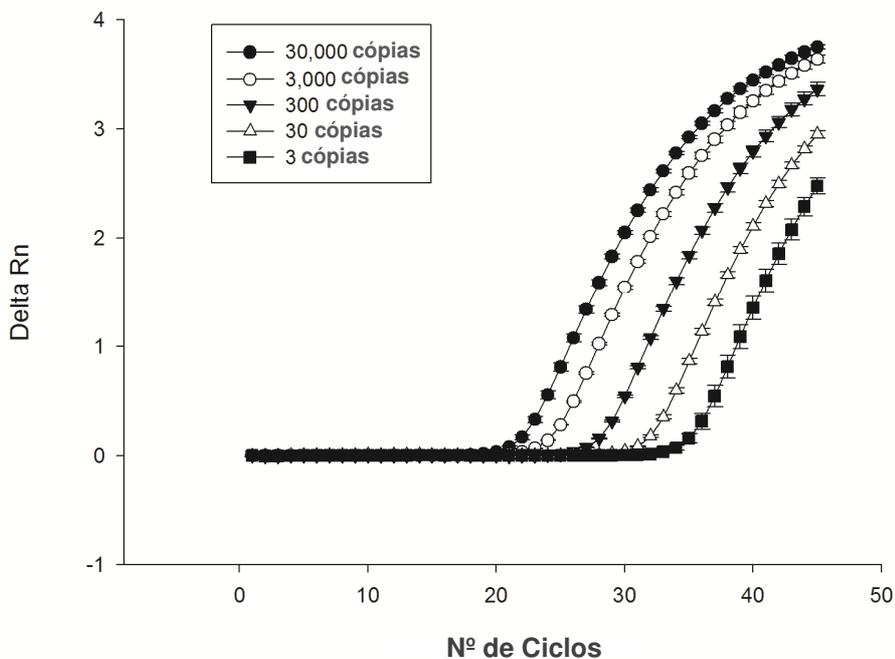


Figura 7. Sensibilidade analítica da PCR em tempo real utilizando sistema Taqman, mostrando as curvas de amplificação do DNA plasmidial contendo o gene *18S rRNA* de *Theileria equi* ($\cong 1.600$ pb), em diluições seriadas (3 – 30.000 cópias).

4.4 Avaliação dos Controles Negativos e Reprodutibilidade das Reações da PCR em Tempo Real

Todos os controles negativos utilizados nas reações não amplificaram o fragmento de 85pb do gene *18S rRNA* específico de *T. equi*. Além disso, observou-se que as amostras de Petrópolis repetidas em placas distintas tiveram uma amplitude média do C_q de 0,95, enquanto as amostras de Seropédica tiveram uma amplitude média de 1,18 em suas repetições.

4.5 Análise Hematológica

4.5.1 Município de Seropédica

Em relação ao município de Seropédica e aos valores hematológicos médios entre os animais positivos e negativos para *T. equi*, não houve diferença significativa ($p>0,05$) nos testes de hipótese para os seguintes parâmetros: HEM, HB, VG, VCM, HCM, ADH, LEUC, LINF, NEUT, EOS, PLAQ, VPM, PPT, FIB. Houve diferença estatística ($p=0,007$) entre os valores médios de animais positivos e negativos em Seropédica em relação à concentração de CHCM. No entanto, as médias deste parâmetro para o grupo de equinos positivos e negativos permaneceram dentro dos valores de referência para a espécie (Tabela 5).

Tabela 5. Eritrograma, plaquetas, proteína plasmática total e fibrinogênio de equinos positivos e negativos na PCR em tempo real para *Theileria equi* no município de Seropédica, Rio de Janeiro (continua).

Parâmetros	Resultado	N	Média	DP	EP	Valores limites		Valores de Referência**
						Mínimo	Máximo	
Série Vermelha								
HEM ($\times 10^6/\text{mm}^3$)*	Positivo	128	6,75 ^a	1,32	0,11	2,35	9,69	6,0 - 11,3
	Negativo	13	7,04 ^a	0,61	0,17	6,26	8,14	
HB (g/dL)	Positivo	128	10,64 ^a	1,91	0,17	3,30	15,40	10,6 - 18,9
	Negativo	13	11,17 ^a	1,13	0,31	8,30	12,90	
VG (%)	Positivo	128	30,02 ^a	5,62	0,49	14,00	45,80	34 - 49
	Negativo	13	32,24 ^a	4,15	1,15	21,50	38,30	
VCM (fm^3)	Positivo	128	44,61 ^a	4,79	0,42	34,00	62,00	38 - 49
	Negativo	13	45,84 ^a	5,73	1,59	34,00	52,00	
HCM (pg)	Positivo	128	15,88 ^a	1,63	0,14	12,20	20,90	15 - 19
	Negativo	13	15,88 ^a	1,38	0,38	13,20	17,70	
CHCM (g/dL)	Positivo	128	35,66 ^a	1,11	0,10	32,70	40,90	37 - 40
	Negativo	13	34,81 ^b	1,53	0,42	33,10	38,50	
ADH (%)	Positivo	128	16,70 ^a	1,02	0,09	12,70	18,20	15,2 - 19,8
	Negativo	13	16,15 ^a	1,34	0,37	13,20	18,00	
Outros Valores								
PLAQ ($\times 10^3/\text{mm}^3$)*	Positivo	128	153,36 ^a	52,04	4,60	35,00	313,00	100 - 350
	Negativo	13	148,07 ^a	44,55	12,35	94,00	239,00	
VPM (fm^3)*	Positivo	128	6,36 ^a	0,38	0,03	5,30	7,20	5,6 - 8,3
	Negativo	13	6,47 ^a	0,32	0,09	6,10	7,00	

Tabela 5. Continuação.

PPT (g/dL)	Positivo	128	7,54 ^a	0,57	0,05	6,20	8,80	5,2 - 7,9
	Negativo	13	7,38 ^a	0,56	0,15	6,20	8,20	
FIB (mg/dL)	Positivo	128	351 ^a	158,23	13,98	100	800	100 - 400
	Negativo	13	284 ^a	140,51	38,97	100	600	

^aValores seguidos de mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente através dos testes, a 5% de significância ($p < 0,05$). *Dados paramétricos, avaliados pelo teste de hipótese *t* student. Demais, se tratam de dados não paramétricos, avaliados pelo teste Mann-Whitney. HEM: número médio de hemácias; HB: concentração de hemoglobina plasmática; VG: volume globular; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; ADH amplitude de distribuição das hemácias; PLAQ: número médio de plaquetas; VPM: volume plaquetário médio; PPT: proteína plasmática total; FIB: fibrinogênio; N: número de equinos; DP: desvio padrão; EP: erro padrão. **Valores de referência segundo Schalm (2010); valores de ADH segundo Easley et al. (1985).

Quanto ao leucograma dos equinos do referido município, foi observada diferença estatística significativa ($p=0,03$) no número médio de monócitos (MON) entre os grupos positivo e negativo para *T. equi*. Ambas médias apresentaram valores dentro dos limites de referência para equinos (Tabela 6).

Tabela 6. Leucograma de equinos positivos e negativos na PCR em tempo real para *Theileria equi* no município de Seropédica, Rio de Janeiro.

Parâmetros	Resultado	N	Média	DP	EP	Valores limites		Valores de Referência**
						Mínimo	Máximo	
Série Branca								
LEUC ($\times 10^3/$ mm^3)	Positivo	128	11,41 ^a	3,12	0,27	6,2	25	5,3 - 13,8
	Negativo	13	12,41 ^a	3,23	0,89	8,8	20	
LINF ($\times 10^3/$ mm^3)	Positivo	128	5,15 ^a	2,48	0,22	1,56	14,60	1,1 - 5,7
	Negativo	13	4,53 ^a	1,53	0,42	2,16	7,38	
NEUT ($\times 10^3/$ mm^3)	Positivo	128	5,38 ^a	1,81	0,16	1,04	10,4	2,7 - 9,7
	Negativo	13	6,76 ^a	3,02	0,84	4,06	13,34	
MON ($\times 10^3/$ mm^3)	Positivo	128	0,26 ^b	0,20	0,02	0	0,8	0,1 - 0,6
	Negativo	13	0,40 ^a	0,22	0,06	0,1	0,8	
EOS ($\times 10^3/$ mm^3)	Positivo	128	0,62 ^a	0,45	0,04	0	3,73	0,06 - 0,6
	Negativo	13	0,72 ^a	0,66	0,18	0	2,4	
BAS ($\times 10^3/$ mm^3)	Positivo	128	0,00 ^a	0	0	0	0	0 - 0,29
	Negativo	13	0,00 ^a	0	0	0	0	

^aValores seguidos de mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente através dos testes, a 5% de significância ($p < 0,05$). *Dados paramétricos, avaliados pelo teste de hipótese *t* student. Demais, se tratam de dados não paramétricos, avaliados pelo teste Mann-Whitney. LEUC: leucócitos; LINF: linfócitos; NEUT: Neutrófilos; MON: Monócitos; EOS: Eosinófilos; BAS: Basófilos; N: número de equinos; DP: desvio padrão; EP: erro padrão. **Valores de referência segundo Schalm (2010). Neutrófilos distintos foram agrupados. Basófilos não foram observados.

A frequência de equinos com alterações dos índices hematimétricos VG, LEUC, PLAQ e VPM não diferiu entre os grupos de animais positivos e negativos ($p > 0,05$) (Figura 8).

Leucocitose foi a alteração observada em 23,1% ($n=3/13$) dos equinos negativos e 18,8% ($n=24/128$) dos animais positivos. A normalidade no LEUC foi observada em 81,3%

(n=104/128) dos animais positivos e em 76,9% (n=10/13) dos animais negativos. Não foram observados animais leucopênicos no município de Seropédica.

O VG manteve-se dentro dos valores de referência em 22,7% (n=29/128) dos animais positivos e em 23,1% (n=3/13) dos animais negativos. Este índice foi observado abaixo dos valores de referência para a espécie em 77,3% (n=99/128) dos animais positivos e em 76,9% (n=10/13) dos animais negativos. Não foi observado VG acima dos padrões normais para a espécie no referido município.

Em 82,8% (n=106/128) dos animais positivos e em 84,6% (n=11/13) dos animais negativos para *T. equi*, observou-se o PLAQ dentro dos índices de normalidade para a espécie. O número de plaquetas foi encontrado abaixo dos valores de referência em 17,2% (n=22/128) dos animais positivos e em 15,4% (n=2/13) dos animais negativos. Quanto ao VPM, observou-se que 97,7% (n=125/128) dos animais positivos e 100% (n=13/13) dos animais negativos apresentaram o índice dentro dos valores de referência. Apenas três animais (2,3%) do grupo de positivos tiveram este índice abaixo dos valores de referência. Não foram observados PLAQ e VPM acima dos valores esperados para a espécie na localidade de estudo.

Todos os animais do grupo dos negativos para *T. equi* (100%, n=13/13) apresentaram o HEM dentro dos padrões de normalidade, o que diferiu estatisticamente do grupo de positivos (71,1%, n=91/128) ($p=0,02$). Porém, quando o HEM apresentou-se abaixo dos índices de referência para a espécie, a frequência observada foi maior nos animais positivos (28,9%, n=37/128) ($p=0,02$), diferindo significativamente dos negativos. Nenhum animal foi observado com HEM acima dos valores de referência para a espécie (Figura 8).

A frequência dos equinos com HB dentro da normalidade foi significativamente maior no grupo de animais negativos (84,6%, n=11/13) com relação aos animais positivos para *T. equi* (49,2%, n=63/128) ($p=0,01$). A frequência de animais com HB abaixo dos índices de referência foi significativamente maior no grupo dos animais positivos (50,8%, n=65/128), em detrimento aos animais negativos (15,4%, n=2/13) ($p=0,01$). Nenhum animal foi observado com HB acima dos valores de referência para a espécie (Figura 8).

Em relação aos testes de hipótese de animais negativos e positivos separados em grupos por C_q , pôde-se observar que o grupo positivo I ($C_q \leq 29$) e positivo II ($C_q > 29$) apresentaram diferença estatística significativa ($p=0,01$) com relação à média do número de hemácias (HEM). Não houve diferença estatística entre as demais comparações de grupos para este índice ($p > 0,05$). A média deste índice esteve dentro da normalidade para equinos, em todos os grupos formados (Tabela 7).

O parâmetro PLAQ e o VPM não diferiram estatisticamente entre os grupos negativo, positivo I e positivo II ($p > 0,05$). A média destes índices manteve-se dentro da faixa de normalidade para a espécie nos três grupos (Tabela 7).

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos formados, com relação à HB ($p > 0,05$). No entanto, o grupo positivo I apresentou a média de HB abaixo do valor mínimo de referência para a espécie (Tabela 7). O índice médio apresentou-se reduzido também em todos os grupos com relação ao VG, não havendo, entretanto diferença estatística entre eles ($p > 0,05$).

A média do parâmetro LEUC do grupo positivo I mostrou-se acima do valor de referência padrão para equinos. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos formados com relação ao LEUC ($p > 0,05$).

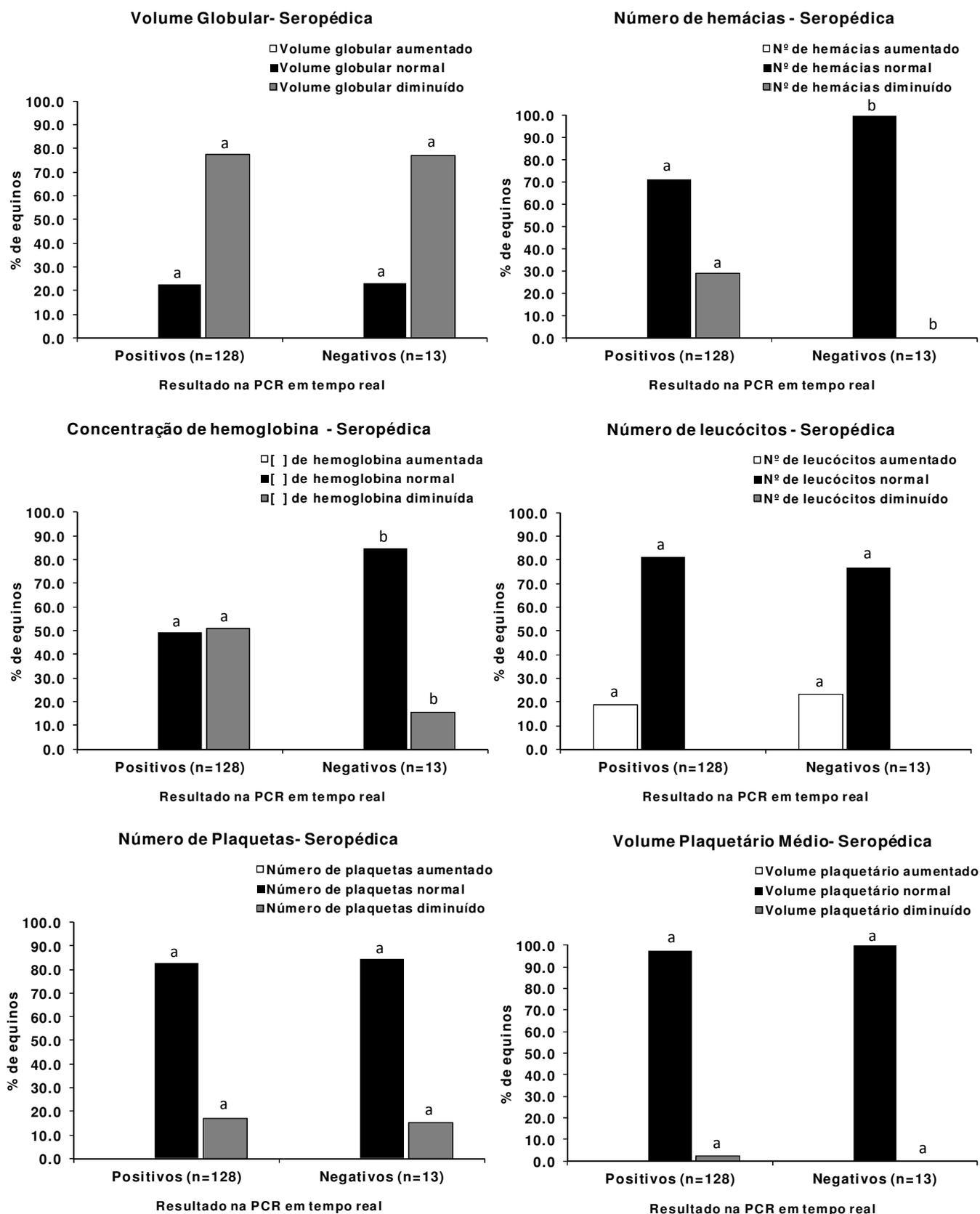


Figura 8. Frequência de equinos de Seropédica com alterações no volume globular, número de hemácias, concentração de hemoglobina plasmática, número de leucócitos, número de plaquetas e volume plaquetário em função do resultado positivo na PCR em tempo real para *Theileria equi*. ^aLetras iguais entre as colunas de mesma legenda não diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de 5% de confiança.

Tabela 7. Número de hemácias, concentração de hemoglobina plasmática, volume globular, número de leucócitos, número de plaquetas e volume plaquetário médio, analisados em três grupos distintos de equinos, de acordo com o C_q da amostra dos positivos no município de Seropédica, Rio de Janeiro. Grupos: negativo, positivos I (C_q≤29) e positivo II (C_q>29).

Parâmetros	Resultado	N	Média	DP	EP	Valores limites		Valores de Referência**
						Mínimo	Máximo	
Série Vermelha								
HEM (x10 ⁶ /mm ³)	Negativo	12	7,05 ^a	0,64	0,18	6,26	8,14	6,0 - 11,30
	Positivo I	12	7,36 ^{ab}	1,83	0,34	5,03	9,05	
	Positivo II	12	6,37 ^{ac}	0,65	0,19	5,59	7,94	
HB (g/dL)*	Negativo	12	11,16 ^a	1,18	0,34	8,30	12,90	10,6 - 18,9
	Positivo I	12	10,36 ^a	1,42	0,41	7,50	12,60	
	Positivo II	12	10,66 ^a	1,02	0,29	9,40	12,10	
VG (%)	Negativo	12	32,15 ^a	4,32	1,24	21,5	38,30	34 - 49
	Positivo I	12	30,06 ^a	5,13	1,48	20,7	39,10	
	Positivo II	12	30,13 ^a	3,38	0,97	26,10	35,70	
Série Branca								
LEUC (x10 ³ /mm ³)	Negativo	12	12,76 ^a	2,71	0,78	8,80	17,10	5,3 - 13,8
	Positivo I	12	14,00 ^a	4,29	1,24	9,60	17,20	
	Positivo II	12	10,95 ^a	1,99	0,57	8,10	13,70	
Outros Valores								
PLAQ (x10 ³ /mm ³)	Negativo	12	152,58 ^a	43,33	12,51	97,00	239,00	100 - 350
	Positivo I	12	158,66 ^a	40,94	0,56	98,00	237,00	
	Positivo II	12	143,91 ^a	48,75	14,07	44,00	241,00	
VPM (fm ³)	Negativo	12	6,45 ^a	0,32	0,09	6,10	7,00	5,6 - 8,3
	Positivo I	12	6,44 ^a	0,56	0,16	5,60	7,20	
	Positivo II	12	6,44 ^a	0,28	0,08	6,00	6,90	

^aValores seguidos de mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente através dos testes, a 5% de significância (p<0,05). *Dados não-paramétricos, avaliados pelo teste Mann-Whitney. Demais, se tratam de dados paramétricos, avaliados pelo teste de hipótese *t* student. HEM: número médio de hemácias; HB: concentração de hemoglobina plasmática; VG: volume globular; LEUC: número de leucócitos; PLAQ: número médio de plaquetas; VPM: volume plaquetário médio; N: número de equinos; DP: desvio padrão; EP: erro padrão. **Valores de referência segundo Schalm (2010).

4.5.2 Município de Petrópolis

Em relação ao município de Petrópolis e aos valores hematológicos médios entre os animais positivos e negativos para *T. equi*, não houve diferença significativa (p>0,05) pelos testes de hipótese no VCM, HCM, CHCM, PLAQ, VPM e FIB (Tabela 8).

Houve diferença estatística (p<0,05) entre os valores médios de animais positivos e negativos em Petrópolis em relação ao HEM (p=0,002), HB (p=0,007), VG (p=0,01), ADH (p=0,02), LEUC (p<0,0001), LINF (p=0,004), NEUT (p=0,001), MON (p=0,003), EOS (p=0,006) e PPT (p=0,004) (Tabelas 8 e 9).

Tabela 8. Eritrograma, plaquetas, proteína plasmática total e fibrinogênio de equinos positivos e negativos na PCR em tempo real para *Theileria equi* no município de Petrópolis, Rio de Janeiro.

Parâmetros	Resultado	N	Média	DP	EP	Valores limites		Valores de Referência**
						Mínimo	Máximo	
Série Vermelha								
HEM (x10 ⁶ /mm ³)*	Positivo	125	7,48 ^b	1,13	0,1	5,01	11,37	6,0 - 11,30
	Negativo	48	8,07 ^a	1,1	0,16	5,3	10,19	
HB (g/dL)*	Positivo	125	11,97 ^b	1,58	0,14	8,2	16,9	10,6 - 18,9
	Negativo	48	12,69 ^a	1,57	0,23	8,4	15,7	
VG (%)*	Positivo	125	33,87 ^b	4,89	0,44	22,7	50	34 - 49
	Negativo	48	35,92 ^a	4,71	0,68	23,5	44,8	
VCM (fm ³)	Positivo	125	44,54 ^a	6,13	0,55	4	54	38 - 49
	Negativo	48	44,75 ^a	3,87	0,56	33	51	
HCM (pg)	Positivo	125	16,06 ^a	1,23	0,11	12,3	19	15 - 19
	Negativo	48	15,80 ^a	1,36	0,2	12,2	18	
CHCM (g/dL)	Positivo	125	35,32 ^a	1,94	0,17	15,4	37,8	37 - 40
	Negativo	48	35,37 ^a	0,59	0,09	34	36,9	
ADH (%)	Positivo	125	16,79 ^b	0,71	0,06	13	18,2	15,2 - 19,8
	Negativo	48	16,95 ^a	0,92	0,13	12,9	18,2	
Outros Valores								
PLAQ (x10 ³ /mm ³)*	Positivo	125	113,62 ^a	38,84	3,47	29	240	100 - 350
	Negativo	48	120,35 ^a	37,63	5,43	37	218	
VPM (fm ³)	Positivo	125	6,32 ^a	0,36	0,03	5,5	7,4	5,6 - 8,3
	Negativo	48	6,39 ^a	0,38	0,05	5,4	7,4	
PPT (g/dL)	Positivo	125	7,11 ^a	0,49	0,04	5,8	8,6	5,2 - 7,9
	Negativo	48	6,88 ^b	0,45	0,06	6,2	8,2	
FIB (mg/dL)	Positivo	125	309,6 ^a	152,62	13,65	100	800	100 - 400
	Negativo	48	302,1 ^a	164,37	23,72	100	800	

^aValores seguidos de mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente através dos testes, a 5% de significância (p<0,05). *Dados paramétricos, avaliados pelo teste de hipótese *t* student. Demais, se tratam de dados não paramétricos, avaliados pelo teste Mann-Whitney. HEM: número médio de hemácias; HB: concentração de hemoglobina plasmática; VG: volume globular; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; ADH amplitude de distribuição das hemácias; PLAQ: número médio de plaquetas; VPM: volume plaquetário médio; PPT: proteína plasmática total; FIB: fibrinogênio; N: número de equinos; DP: desvio padrão; EP: erro padrão. **Valores de referência segundo Schalm (2010); valores de ADH segundo Easley et al. (1985).

Pôde-se observar que a frequência de animais com monocitose e eosinofilia foi maior no grupo de animais positivos para *T. equi* no município de Petrópolis, enquanto o grupo de animais negativos mantiveram estes parâmetros dentro da normalidade para a espécie (Tabela 9). Todas as outras médias que diferiram significativamente entre o grupo de positivos e negativos no município de Petrópolis, tiveram seus valores médios mantidos dentro dos valores de referência para a espécie.

Tabela 9. Leucograma de equinos positivos e negativos na PCR em tempo real para *Theileria equi* no município de Petrópolis, Rio de Janeiro.

Parâmetros	Resultado	N	Média	DP	EP	Valores limites		Valores de Referência**
						Mínimo	Máximo	
Série Branca								
LEUC (x10 ³ / mm ³)	Positivo	125	9,52 ^a	2,34	0,21	4,7	19,1	5,3 - 13,8
	Negativo	48	7,8 ^b	2,07	0,3	4,8	15,1	
LINF (x10 ³ / mm ³)	Positivo	125	1,69 ^a	0,89	0,08	0,50	5,37	1,1 - 5,7
	Negativo	48	1,29 ^b	0,74	0,11	0,32	4,25	
NEUT (x10 ³ / mm ³)	Positivo	125	6,35 ^a	2,18	0,19	2,25	16,8	2,7 - 9,7
	Negativo	48	5,4 ^b	1,83	0,64	2,26	12,38	
MON (x10 ³ / mm ³)	Positivo	125	0,74 ^a	0,33	0,03	0,21	1,66	0,1 - 0,6
	Negativo	48	0,59 ^b	0,29	0,04	0,15	1,53	
EOS (x10 ³ / mm ³)	Positivo	125	0,73 ^a	0,58	0,05	0	2,8	0,06 - 0,6
	Negativo	48	0,5 ^b	0,54	0,08	0	2,41	
BAS (x10 ³ / mm ³)	Positivo	125	0,00 ^a	0	0	0	0	0 - 0,29
	Negativo	48	0,00 ^a	0	0	0	0	

^aValores seguidos de mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente através dos testes, a 5% de significância (p<0,05). *Dados paramétricos, avaliados pelo teste de hipótese *t* student. Demais, se tratam de dados não paramétricos, avaliados pelo teste Mann-Whitney. LEUC: leucócitos; LINF: linfócitos; NEUT: Neutrófilos; MON: Monócitos; EOS: Eosinófilos; BAS: Basófilos; N: número de equinos; DP: desvio padrão; EP: erro padrão. **Valores de referência segundo Schalm (2010). Neutrófilos distintos foram agrupados.

A frequência de equinos com alterações nos valores de HEM, LEUC, PLAQ e VPM não diferiu entre os grupos de animais positivos e negativos para *T. equi* (p>0,05).

Os valores de LEUC foi observado dentro da normalidade em 93,6% dos animais positivos (n=117/125) e em 93,8% (n=45/48) dos animais negativos. Leucocitose foi a alteração observada em 5,6% (n=7/125) dos animais positivos e em 2,1% (n=1/48) dos animais negativos. Leucopenia foi a alteração observada em 0,8% (n=1/125) dos animais positivos e em 4,2% (n=2/48) dos animais negativos (Figura 9).

Quanto ao HEM, observou-se o índice dentro dos valores de referência em 90,4% (n=113/125) dos animais positivos e em 95,8% (n=46/48) dos animais negativos. Foi observada anemia em 8,8% (n=11/125) dos animais positivos e em 4,2% (n=2/48) dos animais negativos e policitemia em 0,8% (n=1/125) dos animais positivos e em nenhum dos animais negativos (Figura 9).

Em 67,2% (n=84/125) dos animais positivos e em 72,9% (n=35/48) dos animais negativos, observou-se o PLAQ dentro dos índices de normalidade para a espécie. Trombocitopenia foi observada em 32,8% (n=41/125) dos animais positivos e em 27,1% (n=13/48) dos negativos. Quanto ao VPM, observou-se que 99,2% (n=124/125) dos animais positivos e 97,9% (n=47/48) dos animais negativos apresentaram o índice dentro dos valores de referência. Apenas um animal positivo (0,8%) e um animal negativo (2,1%) tiveram este índice abaixo dos valores de referência. Não foram observados PLAQ e VPM acima dos índices esperados para a espécie no município de Petrópolis (Figura 9).

Observou-se frequência significativamente maior de equinos do grupo negativo (68,8%, n=33/48) em relação ao positivo (49,6%, n=62/125) quando o VG estava dentro dos padrões de normalidade (p=0,002). Já quando o VG apresentou-se abaixo dos índices de referência para a espécie, a frequência observada foi maior nos animais positivos (49,6%,

n=62/125), diferindo significativamente dos negativos (31,3%, n=15/48) ($p=0,002$). A frequência de animais que apresentaram VG acima dos padrões de normalidade foi baixa e não diferiu estatisticamente entre o grupo de animais positivos (0,8%, n=1/125) e negativos (0%) ($p>0,05$) (Figura 9).

A frequência de equinos com a HB dentro da normalidade foi significativamente maior no grupo de animais negativos (93,8%, n=45/48) em relação aos animais positivos (78,4%, n=98/125) ($p=0,01$). A maior frequência de animais com HB abaixo dos índices de referência foi observada no grupo dos animais positivos (21,6%, n=27/125) em detrimento aos negativos (6,3%, n=3/48) ($p=0,01$). Não foi observada HB acima dos índices esperados para a espécie no município de Petrópolis (Figura 9).

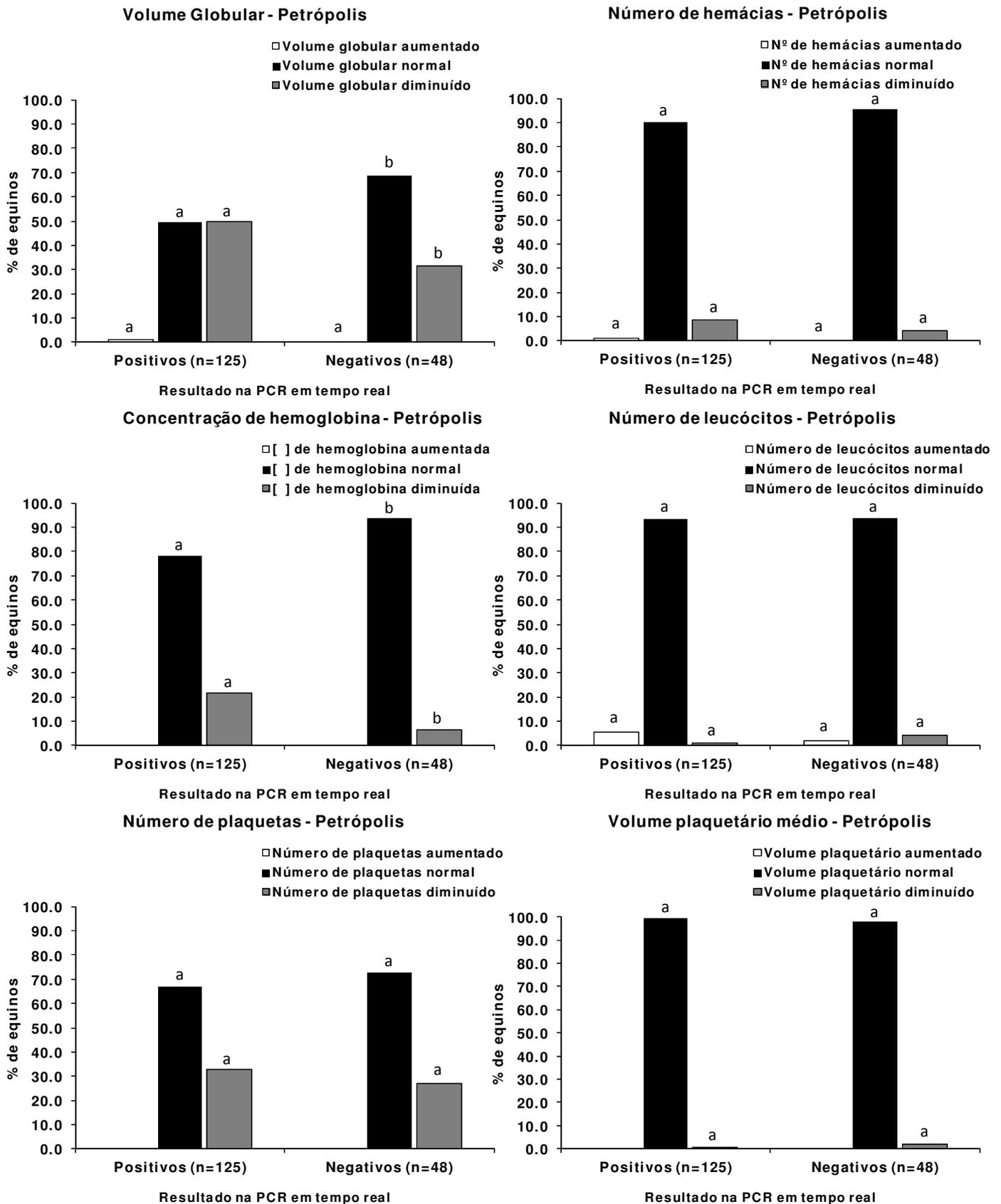


Figura 9. Frequência de equinos de Petrópolis com alterações no volume globular, número de hemácias, concentração de hemoglobina plasmática, número de leucócitos, número de plaquetas e volume plaquetário em função do resultado positivo na PCR em tempo real para *Theileria equi*. ^aLetras iguais entre as colunas de mesma legenda não diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de 5% de confiança.

Em relação aos testes de hipótese nos grupos de animais negativos e positivos para *T. equi* separados por C_q , pôde-se observar que o grupo negativo e positivo I ($C_q \leq 29$) apresentaram diferença estatística significativa ($p=0,01$) com relação a média do LEUC. Não houve diferença estatística entre as demais comparações de grupos para este índice ($p>0,05$). A média deste índice esteve dentro do intervalo de normalidade para equinos em todos os grupos formados (Tabela 10). Os valores de HEM, HB, PLAQ e VPM não diferiram estatisticamente entre os grupos negativo, positivo I e positivo II ($p>0,05$). A média destes índices manteve-se dentro da faixa de normalidade para a espécie nos três grupos (Tabela 10).

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos formados com relação ao VG ($p>0,05$). No entanto, somente no grupo de equinos positivo I observou-se a média deste índice abaixo dos valores de referência determinados para a espécie.

Tabela 10. Número de hemácias, concentração de hemoglobina plasmática, volume globular, número de leucócitos, número de plaquetas e volume plaquetário médio analisados em três grupos distintos de equinos de acordo com o C_q da amostra dos positivos no município de Petrópolis, Rio de Janeiro. Grupos: negativo, positivos I ($C_q \leq 29$) e positivo II ($C_q > 29$).

Parâmetros	Resultado	N	Média	DP	EP	Valores limites		Valores de Referência*
						Mínimo	Máximo	
Série Vermelha								
HEM ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	Negativo	12	8,22 ^a	0,96	0,28	6,50	9,83	
	Positivo I	12	8,36 ^a	0,54	0,16	7,47	9,12	6,0 - 11,30
	Positivo II	12	7,83 ^a	0,87	0,25	6,99	9,66	
HB (g/dL)	Negativo	12	12,76 ^a	1,07	0,31	10,8	14,50	
	Positivo I	12	11,74 ^a	1,37	0,39	9,70	14,10	10,6 - 18,9
	Positivo II	12	12,77 ^a	1,19	0,34	11,10	15,40	
VG (%)	Negativo	12	36,26 ^a	3,42	0,99	30,2	42,00	
	Positivo I	12	33,27 ^a	4,31	1,24	27,00	40,60	34 - 49
	Positivo II	12	36,10 ^a	3,50	1,01	31,40	43,90	
Série Branca								
LEUC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Negativo	12	7,65 ^{ac}	2,69	0,77	4,80	15,10	
	Positivo I	12	9,75 ^{ab}	1,35	0,39	7,30	11,40	5,3 - 13,8
	Positivo II	12	8,27 ^a	1,40	0,40	6,60	10,50	
Outros Valores								
PLAQ ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Negativo	12	114,00 ^a	31,36	9,05	37,00	144,00	
	Positivo I	12	136,25 ^a	35,81	10,34	71,00	190,00	100 - 350
	Positivo II	12	117,58 ^a	56,50	16,31	38,00	240,00	
VPM (fm^3)	Negativo	12	6,58 ^a	0,35	0,10	6,10	7,20	
	Positivo I	12	6,43 ^a	0,45	0,13	5,80	7,10	5,6 - 8,3
	Positivo II	12	6,46 ^a	0,28	0,08	5,80	6,80	

^aValores seguidos de mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente através do teste de hipótese *t* student, a 5% de significância ($p<0,05$). HEM: número médio de hemácias; HB: concentração de hemoglobina plasmática; VG: volume globular; LEUC: número de leucócitos; PLAQ: número médio de plaquetas; VPM: volume plaquetário médio; N: número de equinos; DP: desvio padrão; EP: erro padrão. *Valores de referência segundo Schalm (2010).

5 DISCUSSÃO

5.1 Detecção Molecular Através da PCR em Tempo Real de *Theileria equi* em Equinos dos Municípios de Seropédica e Petrópolis

A avaliação epidemiológica do presente estudo reforça o caráter endêmico que a theileriose equina assume no Brasil (PFEIFER BARBOSA et al., 1995; HEUCHERT et al., 1999; GOLYNSKI et al., 2008; KERBER et al., 2009; SANTOS et al., 2011). Além disso, o estudo destaca alguns fatores associados à presença do agente etiológico nos equinos criados em Seropédica e Petrópolis, em função de aspectos referentes à propriedade, ao manejo adotado na criação e características inerentes ao próprio animal. Demonstra também a importância da epidemiologia como uma ferramenta de investigação vetorial, destacando o possível papel de outras espécies de carrapatos, além de *R. microplus*, na transmissão e disseminação de *T. equi* no território nacional.

A alta frequência de equinos positivos para *T. equi* nos municípios estudados, está de acordo com a frequência observada em diversos estudos sorológicos realizados em áreas próximas (PFEIFER BARBOSA et al., 1995; SANTOS et al., 2011). No entanto, o presente estudo utilizou a qPCR para o diagnóstico de *T. equi*, pois se trata de uma técnica que possui elevada sensibilidade e especificidade, sendo, portanto uma ferramenta que forma bases nas investigações de epidemiologia molecular (MONIS et al., 2005).

Nenhuma associação significativa com a positividade foi encontrada em relação à idade dos animais, fato também observado por Farkas et al. (2013) na Hungria, Shkap et al. (1998) em Israel, Moretti et al. (2010) na Itália, Mujica et al. (2011) na Venezuela e por Santos et al. (2011) no Brasil. No entanto, outros estudos demonstraram associação significativa entre a positividade e o avançar da idade do animal (RÜEGG et al., 2007; SEVINC et al., 2008; ASGARALI et al., 2007), o que é sustentado pelo fato de que o agente de theileriose equina permanece no organismo do animal por muitos anos, ou até mesmo por toda sua vida.

Entre machos e fêmeas também não foi possível observar diferença estatística com relação à presença do DNA de *T. equi*. Este achado é reforçado por diversos estudos, onde também não foi possível observar esta diferença (ASGARALI et al., 2007; MUJICA et al., 2011; SANTOS et al., 2011; FARKAS et al., 2013). Portanto, o sexo dos animais não parece atuar como fator de risco à infecção pelo agente de theileriose equina.

O município de Seropédica, localizado em região de baixa altitude no Rio de Janeiro, possui clima tropical semi-úmido com temperatura média anual de 24°C. Já Petrópolis, localizado em região de alta altitude no referido estado, possui um clima tropical de altitude e temperatura média anual de 19°C, podendo chegar a 0°C em invernos rigorosos. As condições encontradas pelos carrapatos vetores em municípios de elevada altitude, como é o caso de Petrópolis, são menos favoráveis ao desenvolvimento de seu ciclo biológico, o que contribuiu para uma menor frequência de equinos positivos para *T. equi* nessa microrregião (DAVEY; COOKSEY, 1989; CHÁCON et al., 2003). Aliado a essa questão, as condições de manejo e qualidade tecnológica encontradas nas propriedades localizadas no município de Petrópolis são superiores às observadas no município de Seropédica.

A positividade dos equinos criados em contato próximo a bovinos, em relação ao grupo criado na ausência de bovinos, diferiu estatisticamente pela análise bivariada. Essa observação sugere o possível envolvimento de *R. microplus* na cadeia epidemiológica de theileriose equina na região estudada. Estudos experimentais demonstram que o carrapato *R. microplus* é capaz de se infectar e transmitir *T. equi*, quando alimentados em equinos agudos ou cronicamente infectados (GUIMARÃES et al., 1998; STILLER et al., 2002; UETI et al., 2008). Além disso, a infestação de equinos por *R. microplus* é observada com maior

frequência em áreas onde bovinos pastejam (BITTENCOURT et al., 1990; LABRUNA et al., 2001). No entanto, não é possível determinar o papel de *R. microplus* na epidemiologia de theileriose equina nas regiões estudadas, já que no presente estudo não se observou equinos infestados por esta espécie de carrapato. Provavelmente, outras formas de transmissão ou outros artrópodes podem estar envolvidos na manutenção de um elevado nível enzoótico da doença, como verificado neste estudo.

A criação de equinos destinados ao trabalho, passeio e reprodução na criação de equinos, foi um fator determinante na infecção do animal por *T. equi*. Este fato foi observado por Abutarbush et al. (2012), onde o grupo de equinos utilizados para trabalho apresentou maior frequência de positividade para *T. equi*, diferindo significativamente das demais variáveis, como animais criados para a prática de polo, corrida, salto, exposição e reprodução. Este achado também pode estar relacionado às atividades que o equino exerce na propriedade, onde em muitos casos, os animais destinados ao trabalho ou passeio acabam se deslocando em grandes perímetros de pastagem, aumentando a probabilidade de se infestarem com possíveis carrapatos vetores. Além disso, animais destinados ao trabalho, passeio e reprodução, muitas vezes estão domiciliados em propriedades com manejo insatisfatório (HEUCHERT et al., 1999; SANTOS et al., 2011), criados com bovinos em pastos infestados por carrapatos (HEUCHERT et al., 1999), que possuem hábito de pastejo (ABUTARBUSH et al., 2012; NIZOLI et al., 2008; MORETTI et al., 2010), aumentando as chances de contato com carrapatos vetores.

No presente estudo foi possível observar que os equinos destinados à atividade de esporte e exposição, recebem um manejo considerado ideal dentro deste tipo de criação, com instalações zootécnicas apropriadas, onde os animais recebem alimentação adequada e há a presença de controle sanitário e assistência veterinária constante, o que limitaria as chances destes serem infestados por carrapatos vetores. O mesmo foi observado por Moretti et al. (2010), que relacionaram a baixa positividade encontrada em animais com práticas esportivas, ao excelente manejo que recebem nas propriedades, o que reduz a exposição destes animais a infestação por carrapatos.

5.2 Detecção Molecular Através da PCR em Tempo Real de *Theileria equi* em Carrapatos Coletados de Equinos nos Municípios de Petrópolis e Seropédica

A transmissão experimental do piroplasma *T. equi* está associada a carrapatos do gênero *Rhipicephalus* (GUIMARÃES et al., 1998a; GUIMARÃES et al., 1998b; STILLER & COAN, 1995; DE WAAL, 1992, UETI et al., 2005). Porém, até o presente momento, não há relatos que realmente demonstrem qual o vetor natural deste agente etiológico de importância na criação equina mundial. Estudos sugerem que a espécie *A. cajennense* (SCOLES et al., 2011; KERBER et al., 2009) pode atuar como possível vetor natural deste agente, pela sua alta dispersão e predileção por equinos. No entanto, em um estudo experimental realizado por Ribeiro et al. (2011), não foi possível observar a infecção por *T. equi* em exemplares de *A. cajennense* alimentados em equinos com infecção aguda ou crônica. O presente estudo demonstrou que, *A. cajennense* está associado com a presença do DNA de *T. equi* em equinos, no entanto, a sua participação como vetor natural deste hemoparasito permanece indefinida. Assim, a elevada frequência de equinos infestados por *A. cajennense* pode ser considerada um fator de confundimento na análise epidemiológica. Aliado a este aspecto, existem estudos que demonstram a capacidade de *T. equi* ser transmitida de forma congênita no Brasil (SANTOS et al., 2008), o que dificulta a investigação vetorial através de análise epidemiológica. Por outro lado, Scoles et al. (2011) verificaram que *A. cajennense* foi capaz de infectar-se de forma natural com *T. equi* e transmitir o agente, ao realizar o repasto sanguíneo em equinos livres, demonstrando que *T. equi* pode ser transmitida de forma transestadial por essa espécie de carrapato no estado do Texas, Estados Unidos.

No presente estudo foi observado um percentual significativamente maior de machos de *A. cajennense* com a presença do DNA de *T. equi*. Os espécimes machos de *A. cajennense* são capazes de se alimentarem em um maior número de hospedeiros durante o seu ciclo de vida comparado às fêmeas, aumentando a probabilidade de se infectarem com *T. equi*, além de sobreviverem por longos períodos em jejum (OLIVEIRA et al., 2003; SERRA-FREIRE, 1982). Essas características os tornam importantes dispersores de agentes etiológicos de doenças para os animais e seres humanos.

A elevada frequência de *T. equi* em equinos no Brasil e no mundo sugere que o vetor natural é abundante nos animais e comum em todos os locais onde existe criação de equinos. Portanto, epidemiologicamente, *A. cajennense* seria um vetor adequado, pois é um carrapato heteroxeno, está amplamente distribuído em todo o mundo e os equinos parecem ser os hospedeiros primários para todos os estágios evolutivos deste carrapato (ARAGÃO, 1936; OLIVEIRA, 1998). No presente estudo foi possível observar que os equinos com níveis de infestação moderada e alta por *A. cajennense* apresentaram mais chances de estarem infectados por *T. equi*, corroborando os achados anteriores.

5.3 Análise Hematológica

A hematologia tem sido amplamente utilizada para fornecer informações acerca de doenças, problemas de *performance* e exercício em equinos. Diversos fatores podem alterar os dados hematológicos de equinos, como o sexo, a fase reprodutiva, a idade, a raça, a prática de exercícios e o estresse no momento da coleta (SCHALM'S, 2010). Este estudo agrupou todos os animais, sem distinção quanto à idade, sexo e raça, porém, separou os animais quanto à localidade, devido à altitude, pois se sabe que há um aumento no número e tamanho de hemácias em resposta à exposição à elevadas altitudes (JAIN, 1993; WICKLER; ANDERSON, 2000).

Anemia e trombocitopenia são os achados mais comuns em casos de theileriose equina (DE WAAL, 1987; HAILAT et al., 1997; CAMACHO et al., 2005). Leucopenia (DE WAAL, 1992; ZOBBA et al., 2008), neutrofilia e linfopenia também são alterações observadas em quadros agudos da doença (RUBINO et al., 2006).

No município de Seropédica, os valores médios de VG e CHCM apresentaram-se abaixo dos valores de referência em ambos os grupos, o que caracteriza o quadro de anemia nos animais. O grupo positivo e negativo em relação ao CHCM, diferiram significativamente entre si, ao contrário do observado para o VG. A alta infestação por carrapatos parece ser um fator de alta correlação para o VG abaixo dos valores de referência. Em estudo realizado por Labruna et al. (2002), os maiores níveis de infestação por *D. nitens* nos animais esteve altamente correlacionado ao VG abaixo dos valores de referência. Cunha et al. (2008) verificou o VG dos animais abaixo dos valores de referência para a espécie antes do tratamento carrapaticida contra *A. cajennense*, índice que aumentou gradativamente chegando à normalidade após o tratamento. Além disso, no município de Seropédica observou-se que 80,85% (n=114/140) das propriedades encontravam-se em condições técnicas insatisfatórias para criação de equinos. Desta forma, os índices hematológicos abaixo da normalidade podem ser atribuídos às más condições na criação, onde as instalações zootécnicas são inadequadas à criação, os animais não recebem alimentação balanceada rotineiramente, o controle sanitário não é sistemático e a assistência veterinária, quando ocorre, é somente em casos de emergência clínica.

Ainda em Seropédica, observou-se que o grupo de animais positivos para o agente de theileriose equina, apresentou seus índices médios de HEM e HB limítrofes, ou seja, próximos ao limite inferior instituído como normal para a espécie. Este achado indica que estes valores podem ter sido influenciados por *T. equi*, embora não tenha sido observada diferença estatística. Entretanto, na análise de frequência, foi possível observar diferença

estatística entre os grupos positivos e negativos nas alterações de ambos os índices. A maior frequência de animais positivos foi observada quando os grupos foram comparados abaixo do valor de referência. Da mesma forma, a maior frequência de animais negativos foi observada quando os grupos foram comparados dentro da faixa de normalidade. Este resultado demonstra que o agente de theileriose equina pode participar de forma efetiva na alteração destes índices, como já citado por diversos autores (DE WAAL, 1987; HAILAT et al., 1997; CAMACHO et al., 2005). Além disso, supõe-se que os animais mais parasitados, instituído como grupo positivo I pelo C_q da técnica de diagnóstico, tiveram os valores de HEM reduzidos significativamente em relação ao positivo II e sua HB abaixo dos valores de referência, indicando a participação do agente.

A anemia durante a infecção por *T. equi*, relatada por diversos autores, pode ser multifatorial: devido ao efeito direto do parasito nos eritrócitos infectados levando à hemólise; pela redução da vida útil das hemácias; pela supressão no sistema hematopoiético e/ou pelo papel dos anticorpos na destruição de eritrócitos infectados e não infectados (DE WAAL, 1992; HAILAT et al., 1997; ZOBBA et al., 2008).

Em relação ao leucograma dos equinos criados no município de Seropédica, a diferença significativa observada no número de monócitos absolutos mostrou que os animais positivos tiveram este índice inferior ao dos animais do grupo de negativos, mesmo dentro da faixa de normalidade para a espécie. Monócitos ativados aumentam sua atividade na piroplasmose aguda (RUBINO et al., 2006), o que não foi observado neste estudo, onde a maioria dos animais avaliados são no geral, portadores crônicos de *T. equi*.

A eosinofilia observada em ambos os grupos também parece estar relacionada ao manejo animal insatisfatório, já que os eosinófilos aumentam no sangue em casos de helmintose, parasitose comum em equídeos. Este índice sofre alteração devido à resposta imune do tipo Th2, que associada à produção de interleucinas, leva a mobilização de eosinófilos e degranulação dos mesmos (TIZARD, 2009). Da mesma forma, pode-se observar resposta do tipo Th2, ou seja, de hipersensibilidade tipo I, na imunidade contra a saliva dos artrópodes (TIZARD, 2009). Em estudo realizado por Garba et al. (2011), foi observada eosinopenia em equinos com piroplasmose e eosinofilia em equinos portadores de piroplasmose crônica associada à helmintose. Desta forma, a helmintose em principal, parece ter interferência na elevação deste índice.

Os animais do grupo positivo I do município de Seropédica apresentaram leucocitose, alteração não evidenciada nos outros grupos e sem diferença estatística dentre estes. Em Petrópolis, este índice diferiu estatisticamente entre o grupo positivo I e negativo (grupos instituídos pelo C_q) e entre os grupos positivo e negativo, porém sem alterações quanto à normalidade das médias. Hailat et al. (1997) observaram uma leve redução neste índice, enquanto All-Saad (2009) observou leve aumento. All-Saad (2009) atribuiu este fato à estimulação do sistema linfóide e medula óssea na resposta imune tardia contra os parasitos e suas toxinas e associou este aumento à linfocitose. Rubino et al. (2006) observaram linfocitose e neutropenia em animais portadores crônicos da piroplasmose equina, alterações não observadas neste estudo. Portanto, existem controvérsias quanto ao número de leucócitos entre os autores. Além disso, este índice pode gerar confundimento, pois é muito influenciado por fatores inerentes ao animal, ao estado reprodutivo e à sanidade.

Em relação ao município de Petrópolis, o VG médio dos animais positivos para *T. equi* indicou anemia, diferindo significativamente do grupo negativo ($p=0,01$), o qual obteve VG médio dentro do valor de referência normal para a espécie. A mesma alteração ocorreu quando os grupos separados por C_q foram comparados, onde os animais do grupo positivo I tiveram seu valor de VG abaixo dos valores de referência para equinos, porém não diferiu dos demais. A anemia trata-se da alteração mais comum entre equinos infectados pelo agente de theileriose equina (CUNHA et al., 1998; RUBINO et al., 2006; ZOBBA et al., 2008; AL-SAAD, 2009).

Os valores médios de HEM e HB nos grupos positivo e negativo diferiram estatisticamente, porém dentro da normalidade. Na análise de frequência, pôde-se observar maior frequência de positivos quando os índices estiveram abaixo do valor de referência, e maior frequência de negativos quando os índices estiveram dentro da normalidade. Além disso, este mesmo resultado de frequência foi observado no município de Seropédica. Estes achados reforçam a participação dos agentes da piroplasmose equina, pois a anemia é um dos achados mais comuns desta afecção nos animais (DE WAAL, 1987; HAILAT et al., 1997).

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos positivo e negativo quanto ao índice CHCM, porém ambos os grupos estiveram com a média abaixo dos valores de referência. O baixo índice indica hipocromia nas hemácias, o que é bem documentado na piroplasmose equina, associado à macrocitose (RUBINO et al., 2006; AL-SAAD, 2009; ZOBBA et al., 2008).

Na série branca analisada nos animais do município de Petrópolis, todos os parâmetros apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos positivo e negativo. Isto se deve, provavelmente, ao aumento no número de LEUC dos animais positivos, o que levou às diferenças nos índices da contagem diferencial de leucócitos absoluta, já que esta segue proporcional à leucometria global. Porém, o grupo de animais positivos apresentou uma monocitose, o que não ocorreu nos animais negativos. Este resultado pode indicar a participação de *T. equi*, elevando a média deste índice, fato observado nos animais domiciliados em Seropédica. A monocitose é característica das piroplasmoses, pois os monócitos controlam o aumento da taxa de parasitos, juntamente com células Natural Killer (NK) durante a resposta imune inata (HOMER, 2000).

O número de eosinófilos (EOS) acima dos valores de referência para a espécie em animais infectados pelo agente de theileriose, assim como relatado em Seropédica, pode estar associado à helmintose, como bem demonstrado por Garba et al. (2011), ou ainda à alta infestação por ectoparasitas (TIZARD, 2009).

Inúmeras alterações brandas foram observadas nas análises estatísticas dos dados hematológicos dos equinos de Seropédica e Petrópolis. No entanto, além da theileriose, diversos fatores podem influenciar diretamente os parâmetros hematológicos. Além disso, houve dificuldade quanto à escolha dos valores de referência que melhor se adéquam à realidade dos índices dos animais no Brasil, já que não existem estudos acerca destes em nosso país.

6 CONCLUSÕES

O diagnóstico através da qPCR mostrou-se uma excelente ferramenta na investigação epidemiológica deste hemoparasito, já que a infecção por *T. equi* tem caráter crônico em equinos.

Theileriose equina é uma doença com elevada frequência nos equinos do estudo nos Municípios de Seropédica e Petrópolis, no estado do Rio de Janeiro.

A infestação por carrapatos e a atividade do animal na criação são fatores associados à infecção por *T. equi* em equinos nas regiões estudadas.

Animais utilizados para trabalho e/ou passeio e os equinos utilizados para fins reprodutivos são as categorias de atividade de maior influência na positividade para *T. equi* no presente estudo.

Dentre os carrapatos investigados, *A. cajennense* é a espécie indicada epidemiologicamente como possível vetor biológico de *T. equi* sob condições naturais nas regiões estudadas, principalmente o macho.

As alterações hematológicas encontradas entre os equinos estudados em ambos municípios não estão relacionadas somente à positividade dos animais para *T. equi*, pois existem outros fatores que interferem de forma direta e indireta nestes parâmetros.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUTARBUSH, S.M.; ALQAWASMEH, D.M.; MUKBEL, R.M.; AL-MAJALI, A.M. Equine Babesiosis: seroprevalence, risk factors and comparison of different diagnostic methods in Jordan. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.59, p.72–78, 2012.

ALHASSAN, A.; GOVIND, Y.; TAM, N.T.; THEKISOE, O.M.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.

ALLSOP, 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.

AL-SAAD, K. M. Acute *Babesiosis* in Foals. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.8, n.19, p.2585-2587, 2009.

ARAGÃO, H. Ixodidas brasileiros e de alguns paizes limitrophes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.31, p.759-843, 1936.

ARAGÃO, H.; FONSECA, F. Notas de Ixodologia. VIII lista e chave para os representantes para a fauna ixodológica brasileira. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.59, n.2, p.115-129, 1961.

ASGARALI, Z.; COOMBS, D.K.; MOHAMMED, F.; CAMPBELL, M.D.; CAESAR, E. A serological study of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in Thoroughbreds in Trinidad. **Veterinary Parasitology**, v.144, p.167–171, 2007.

BALDANI, C. D.; MACHADO, Z.; RASO, T.; PINTO, A. A. Serodiagnosis of *Babesia equi* in horses submitted exercise stress. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n.4, p.179-183, 2007.

BALDANI, C.D.; MACHADO, R.Z.; BOTTEON, P.T.L.; TAKAKURA, F.S.; MASSARD, C.L. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of IgG antibodies against *Babesia equi* in horses. **Ciência Rural**, v.34, n.5, p.1525-1529, 2004.

BALDANI, P. A.; CANOLA, J. C. L.; NETO, 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.

BARREIRA, J.; ROSSI, M. I.; ARAUJO, F. P.; SILVA, G. V.; MASSARD, C. L. Dinâmica da infecção de *Babesia bovis* (Babés, 1888, Starcovici, 1893) em fêmeas ingurgitadas e ovos de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Ciência Rural**, v.35, n.5, p.1131-1135, 2005.

BARROS-BATTESTI, D.M.; ARZUA, M.; BECHARA, G.H. 2006. **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies**. VOX/ICTTD-3/BUTANTAN, 1ª ed., pp. 223. São Paulo, SP.

- BASHIRUDDIN, J.B.; CAMMA, C.; REBELO, 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, p.75–83, 1999.
- BATTSETSEG, B.; LUCERO, S.; XUAN, X.; CLAVERIA, F.; BYAMBAA, B.; BATTUR, B.; BOLDBAATAR, D.; BATSUKH, Z.; KHALIUNAA, T.; BATTSETSEG, G.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; FUJISAKI, K. Detection of Equine *Babesia* spp. Gene Fragments in *Dermacentor nuttalli* Olenev 1929 Infesting Mongolian Horses, and Their Amplification in Egg and Larval Progenies. **Journal Veterinary Medicine Science**, v.64, n.8, p.727-730, 2002.
- 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 for Parasitology**, v.31, p.384–386, 2001.
- BHOORA, R.; FRANSSEN, 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.; FRANSSEN, L.; BUTLER, C.M.; VAN DER KOLK, J.H.; GUTHRIE, A.J.; ZWEYGARTH, E.; JONGEJAN, F.; COLLINS, N.E. Development and evaluation of real-time PCR assays for the quantitative detection of *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses from South Africa. **Veterinary Parasitology**, v.168, p.201–211, 2010.
- BITTENCOURT, A. J. *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887): (Infestações artificiais, biologia da fase não parasitária e prevalências em caprinos e equinos). 1990. 87p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias- Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 1990.
- BOOZER, A.L.; MACINTIRE, D.K. Canine babesiosis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.33, p.885–904, 2003.
- BOTTEON, P. T.; MASSARD, C. L.; BOTTEON, R. C.; LOSS, Z. G.; LINHARES, G. F. Seroprevalencia de *Babesia equi* en tres diferentes sistemas de crianza de equinos. **Parasitología Latinoamericana**, v.57, n.3-4, p.141-145, 2002.
- BRÜNING, A. Equine piroplasmiasis: an update on diagnosis, treatment and prevention. **The British Veterinary Journal**, v.152, n.2, p.139-151, 1996.
- BRÜNING, A.; PHIPPS, P.; POSNETT, E.; CANNING, E. U. Monoclonal antibodies against *Babesia caballi* and *Babesia equi* and their application in serodiagnosis. **Veterinary Parasitology**, v.68, p.11-26, 1997.
- CAMACHO, A.T.; GUITIAN, F.J.; PALLAS, E.; GESTAL, J.J.; OLMEDA, A.S. HABELA, M.A.; TELFORD, S.R.; SPIELMAN, A. *Theileria (Babesia) equi* and *Babesia caballi* infections in horses in Galicia, Spain. **Tropical Animal Health and Production**, v.37, n.4, p.293-302, 2005.

CASSAMAGNAGHI, A. El primer caso de Nuttalliosis comprobado en el Uruguay. **Anales de la Facultad de Veterinaria**, v.5, n.2, p.181-194, 1948.

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.

COLES, E.H. **Patologia Clínica Veterinária**. 3ª ed., Manole, São Paulo, 1984, 566p.

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, n.2, p.283-286, 1998.

DA CÁS, E.L.; BRASS, A.E.; GREIG, C.R.; DEPRÁ, N.M.; SILVA, C.A.M. Concentrações de creatino quinase, aspartato aminotransferase e desidrogenase láctica em potros do nascimento até os seis meses de idade. **Ciência Rural**, v.31, n.6, p. 1003-1006, 2001.

DAVEY, R. B., COOKSEY, L. M. Effects of prolonged exposure at low temperature on *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v.26, n.5, p.407-410, 1989.

DE WAAL, D.T.; HEERDEN, J.V.; POTGIETER, F.T. An investigation into the clinical pathological changes and serological response in horses experimentally infected with *B. equi* and *B. caballi*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 55, n.4, p.33-35, 1987.

DE WAAL, D. T. The transovarial transmission of *Babesia caballi* by *Hyalomma truncatum*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.57, n.1, p.99-100, 1990.

DE WAAL, T. Equine piroplasmiasis: a review. **British Veterinary Journal**, v.148, n.1, p.6-14, 1992.

DE WAAL, D.T.; VAN HEERDEN, J. 1994. **Infectious diseases of livestock with special reference to South Africa**. Oxford University Press, v.1, n.1, p.293-304. Cape Town, Africa do Sul.

DE WAAL, T. Advances in diagnosis of protozoan diseases. **Veterinary Parasitology**, v.189, n.1, p.65-74, 2012.

DENNIG, F. **Unsuccessful attempts at transmission of *Babesia equi* by *Anocentor nitens* and *Amblyomma cajennense***. 1988. 122p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Hannover Veterinary College, 1988.

DUPONT, O.; BARREIROS-TERRA, A.B. Nutaliose equina. **Veterinária**, Rio de Janeiro, v.6, n.2, p.3-7, 1952.

EASLEY, J.R. Erythrogram and red cell distribution width of equidae with experimentally induced anemia. **American Journal of Veterinary Research**, v.46, n.11, p.2378-2384, 1985.

EVANS, G.O. **Animal clinical chemistry: a practical handbook for toxicologists and biomedical researchers**. 2. ed., 2009. 310p.

FARKAS R.; TANCZOS, B.; GYURKOVSKY, M.; FOLDVARI, G.; SOLYMOSI, N.; EDELHOFER, R.; HORNOK, S. Serological and molecular detection of *Theileria equi* infection in horses in Hungary. **Veterinary Parasitology**, v.192, n.1-3, p.143-148, 2013.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª Edição. EMBRAPA-CENARGEN, 1998, 103p.

FRIEDHOFF, K. T. Die piroplasmen der equiden Bedeutung fur den internationalen pferdeverkehr. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift**, v.95, n.19, p.368-374, 1982.

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. Transmission of Babesia. In: RISTIC, M. **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p. 23-52.

GARBA, U.M.; SACEY, A.K.B.; AGBEDE, R.I.S.; TEKDEK, L.B.; BISALLA, M. Hemogram changes in nigerian royal horses with natural piroplasmosis. **Journal Indian Veterinary Association**, v.9, n.3, 2011.

GARCIA-BOCANEGRA, I.; ARENAS-MONTES, A.; HERNANDEZ, E.; ADASZEK, Ł.; CARBONERO, A.; ALMERIA, S.; JAEN-TELLEZ, J.A.; GUTIERREZ-PALOMINO, P.; ARENAS, A. Seroprevalence and risk factors associated with *Babesia caballi* and *Theileria equi* infection in equids. **The Veterinary Journal**, v.191, n.2, p.257-260, 2012.

GOLYNSKI, A.A.; FERNANDES, K.R.; BALDANI, C.D.; GOLYNSKI, A.L.; MADEIRO, A.S.; MACHADO, RZ.; BOTTEON, P.T.L.; MASSARD, C.L. Estudo soroepidemiológico da *Babesia equi* em equinos do estado do Rio Grande do Sul, Brasil, determinado pelos testes de imunofluorescência indireta e Elisa. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, Supl. 1, p.317-321, 2008.

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, 1998a.

GUIMARÃES, A. M.; LIMA, J. D.; RIBEIRO, M. F. B. Sporogony and experimental transmission of *Babesia equi* by *Boophilus microplus*. **Parasitology Research**, v.84, n.4, p.323-327, 1998b.

GUIMARÃES, A.M.; LIMA, J.D.; RIBEIRO M.F.B. Ultrastructure of *Babesia equi* trophozoites isolated in Minas Gerais, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.23, n.3, p.101-104, 2003.

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, L.F.; 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.

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, n.1, p.1-11, 1999.

HOLBROOK, A.A. The biology of Babesia: Development of the Babesia of horses. **Proceedings of the 2nd International Conference on Equine Infectious Diseases**, Paris, p.249-257, 1969.

HOMER, M. J.; AGUILAR-DELFIN, I.; TELFORD III, S.,; KRAUSE, P. J.; PERSING, D. H. Babesiosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, n.3, p.451-469, 2000.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/territorio/unit.asp?e=c&t=1&p=PP&v=105&codunit=3327&z=t&o=4&i=P>>. Acesso em 03.01.2013.

IKADAI, H.; NAGAI, A.; XUAN, X.; IGARASHI, I.; TSUGIHIKO, K.; TSUJI, N.; OYAMADA, T.; SUZUKI, N.; FUJISAKI, K. Seroepidemiologic studies on *Babesia caballi* and *Babesia equi* infections in Japan. **Journal of Veterinary Medicine and Science**, v.64, n.4, p.325-328, 2002.

IORI, A.; GABRIELLI, S.; CALDERINI, P.; MORETTI, A.; PIETROBELLI, M.; TAMPIERI, M. P.; GALUPPI, R.; CANCRINI, G. Tick reservoirs for piroplasms in central and northern Italy. **Veterinary Parasitology**, v.170, n.3-4, p.291-296, 2010.

JAIN, N.C. Comparative hematology of common domestic animals. In: **Essentials of Veterinary Hematology**, Jain N.C. (ed.), pp. 19-53, Lea & Febiger, Philadelphia. (1993).

KATZ, M.H. **Multivariate Analysis: A practical Guide for Clinicians**. 1ed. Cambridge, Cambridge University, 1999. 192p.

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.; 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, n.2-4, p.158-163, 2008.

KNOWLES, D.P. Equine babesiosis (Piroplasmiasis): a problem in the international movement of horses. **British Veterinary Journal**, v. 52, n.2, p. 123-126, 1996.

KNOWLES, R.C. Equine babesiosis: epidemiology, control e chemotherapy. **Equine Veterinary Science**, v.8, n.1, p.61-64, 1988.

KOUAM, M.K.; KANTZOURA, V.; GAJADHAR, A.A.; THEIS, J.H.; PAPADOPOULOS, E.; THEODOROPOULOS, G. Seroprevalence of equine piroplasms and host-related factors associated with infection in Greece. **Veterinary Parasitology**, v.169, n.3-4, p.273-278, 2010.

LABRUNA, M.B.; KERBER, CE.; FERREIRA, F.; FACCINI, J.L.H.; DE WALL, D.T.. GENARI, S.N. 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.

LAVERAN, A. Contribution a l'etude du *Piroplasma equi*. **Comptes Rendus des Seances de La Societé de Biologie**, v.12, n.1, p.385-389, 1901.

LEUTENEGGER, C. M. The Real-Time TaqMan PCR and Applications in Veterinary Medicine. **Veterinary Sciences Tomorrow**, n.1, 2001.

LINHARES, G. F. C. **Aspectos biológicos e epidemiológicos das babesioses de eqüídeos, com ênfase à microrregião de Goiânia, Goiás, Brasil**. 1994. 105 p. Tese (Doutorado em Ciência) Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

MAHONEY, D.F.; WRIGHT, I.G. FRERICHS, W.M. The identification of *Babesia equi* in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v.53, n.10, p.461-464, 1977.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Disponível em:<<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>>. Acesso em 17 de outubro de 2012.

MEHLHORN, H., SCHEIN, E. Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein 1998. **Parasitology Research**, v.84, n.6, p.467-475, 1998.

MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. The piroplasms: a long story in short or ‘‘Robert Koch has seen it’’. **European Journal of Protistology**, v.29, n.1, p.279–293, 1993.

MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. The piroplasms: life cycle and sexual stages. **Advances in Parasitology**, v.23, n.1, p.37-103, 1984.

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, n.1, p.111-120, 1983.

MONIS, P.T.; GIGLIO, S.; KEEGAN, A.R.; THOMPSON, R.C.A. Emerging technologies for the detection and genetic characterization of protozoan parasites. **Trends in Parasitology**, v.21, n.7, p.340-346, 2005.

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 preliminary study. **The Veterinary Journal**, v.184, n.3, p.346-50, 2010.

MUJICA, F. F.; PERRONE, T.; FORLANO, M.; CORONADO, A.; MELÉNDEZ, R. D.; BARRIOS, N.; ÁLVAREZ, R.; GRANDA, F. Serological prevalence of *Babesia caballi*

and *Theileria equi* in horses of Lara State, Venezuela. **Veterinary Parasitology**, v.178, n.1-2, p.180-183, 2011.

MURRELL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1984. **Parasitology Journal**, v.56, n.3, p.169-172, 2003.

NEITZ, W. O. Classification, transmission, and biology of piroplasms of domestic animals. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v.64, n.2, p.56-111, 1956.

NIZOLI, L.Q.; GÖTZE, M.M.; FÉLIX, S.R.; SILVA, S.S.; NOGUEIRA, C.E.W. Frequency of seropositive equines for *Theileria equi* in the Southern Rio Grande do Sul State, Brazil. **Parasitologia Latinoamericana**, v.63, n.1-4, p.46-50, 2008.

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. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) Avaliação de técnica para estudo de dinâmica populacional e bioecologia em Pedro Leopoldo, Minas Gerais. 1998. 110f. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

OLIVEIRA, P.R.; BORGES, L.M.F.; LEITE, R.C.; FREITAS, C.M.V. Seasonal dynamics of the Cayenne tick, *Amblyomma cajennense* on horses in Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v.17, n.4, p.412-416, 2003.

OHTA, M.; KAWASU, S.; TSUJI, N. Rapid and sensitive method for detection of newly isolated Babesia parasite (*Babesia* spp.) in the anticipated vector-tick using the polymerase reaction technique. **Journal of Protozoology Research**, v.5, n.1, p.108-117, 1995.

PAULAUSKAS, A.; RADZIJEVSKAJA, J.; AMBRASIENE, D.; ROSEF, O. Detection of tick-borne pathogens by molecular methods. **Biologija**, v.54, n.3, p.192-197, 2008.

PAULAUSKAS, A.; RADZIJEVSKAJA, J.; AMBRASIENE, D.; ROSEF, O. Detection of tick-borne pathogens by molecular methods. **Lietuvos mokslu akademijos leidykla**, v.54, n.3, p.192-197.

PEREIRA, M. G. **Epidemiologia Teoria e Prática**. 1.ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1995, 598p.

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, n.1-2, p.1-8, 1995.

PHIPPS, L. P.; OTTER, A. Transplacental transmission of *Theileria equi* in two foals born and reared in the United Kingdom. **The Veterinary Record**, v.154, n.13, p.406-408, 2004.

PIEEL, M.C.; FINLAYSON, B.L.; MCMAHON, T.A. "Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification". **Hydrology and Earth System Sciences**, v.11, n.5, p.1633-1644, 2007.

POSNETT, E.S.; FEHRSEN, J.; DE WAAL, D.T.; AMBROISIO, R.E. Detection of *Babesia equi* in infected horses and carrier animals using a DNA probe. **Veterinary Parasitology**, v.39, n.1-2, p.19-32, 1991.

- POTGIETER, F.T.; DEWAAL, D.T.; POSNETT, E.S. Transmission and diagnosis of equine babesiosis in South Africa. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, v.87, n.3, p.139-142, 1992.
- 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.; MICHEAL, S.; 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.
- 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.
- RIBEIRO, M.F.B.; LIMA, J.D. **Diagnóstico sorológico da babesiose equina por *Babesia equi* em Minas Gerais**. 6º Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Bagé, p. 111, 1989.
- RUBINO, G.; CITO, A. M.; LACINIO, R.; BRAMANTE, G.; CAROLI, A.; PIERAGOSTINI, E.; PETAZZIA, F. Hematology and Some Blood Chemical Parameters as a Function of Tick-Borne Disease (TBD) Signs in Horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.26, n.10, p.475-480, 2006.
- RÜEGG, S.R.; TORGERSON, P.; DEPLAZES, P.; MATHIS A. Age-dependent dynamics of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in southwest Mongolia based on IFAT and/or on PCR prevalence data from domestic horses and ticks. **Parasitology**, v.134, n.7, p.939-47, 2007.
- SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2ª ed. Belo Horizonte: Editora, FEPMVZ, 2002. 265p
- SANTOS, H.A. **Diagnóstico molecular de *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) em cães domésticos e carrapatos de áreas urbanas e rurais na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro**. 2011. 76 f. Tese. (Doutorado em Ciências Veterinárias). Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.
- 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.; 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.
- 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.

SCHALM, O.W.; WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. (eds.) **Veterinary Hematology**, 6th ed. Blackwell Publishing. Iowa, 2010. 1206p.

SCHEIN, E. REHBEIN, G.; VOIGT, W.P.; ZWEYGARTH, E. *Babesia equi* (Laveran 1901). Development in horses and in lymphocyte culture. **Tropenmedizin und Parasitologie, Stuttgart**, v.32, n.4, p.223-227, 1981.

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

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, n.2, p.187-193, 1982.

SEVINC, F.; MADEN, M.; KUMAS, C.; SEVINC, M.; EKICI, O.D. A comparative study on the prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in horse sub-populations in Turkey. **Veterinary Parasitology**, v.156, n.3-4, p.173-177, 2008.

SEVINC, F.; MADEN, M.; KUMAS, C.; SEVINC, M.; EKICI. A comparative study on the prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in horse sub-populations in Turkey. **Veterinary Parasitology**, v.156, n.3-4, p.173-177

SHKAP, V.; COHEN, I.; LEIBOVITZ, B.; SAVITSKY; AVNI, G.; SHOFER, S.; GIGER, U.; KAPPMAYER, L.; PIPANO, E.; KNOWLES, D. Seroprevalence of *Babesia equi* among horses in Israel using competitive inhibition ELISA and IFA Assays. **Veterinary Parasitology**, v.76, n.4, p.251-259, 1998.

SIGRIST, B. **Übertragung von *Babesia equi* durch *Hyalomma anatolicum anatolicum* und *Rhipicephalus turanicus***. Dissertação (Medicina Veterinária). School of Veterinary Medicine Hanover, Hanover, Alemanha. 1983.

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.

SOUZA, A.P.; SERRA-FREIRE, N.M. Variação sazonal dos estádios adultos de *Amblyomma cajennense* e *Anocentor nitens*, como parasitas de cavalos, no município de Itaguaí, RJ, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.1, n.1, p.31-34, 1992.

STILLER, D.; COAN, M.E. Recent developments in elucidating tick vector relationships for anaplasmosis and equine piroplasmosis. **Veterinary Parasitology**, v.57, n.1-3, 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, n.4, p.667-670, 2002.

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, n.6, 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.
- TIZARD, I.R. 2009. **Imunologia Veterinária: Uma introdução**. 8ª edição. 608p. Editora Saunders Elsevier.
- THOMPSON, P.H. Ticks as vectors of equine piroplasmiasis. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.155, n.2, p.454-457, 1969.
- UETI, W.M.; PALMER, G.H.; KAPPMAYER, 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.; KAPPMAYER, 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.
- UILENBERG, G. *Babesia* – a historical overview. **Veterinary Parasitology**, v.138, n.1-2, p.3-10, 2006.
- UILENBERG, G. Highlights in recent research on tick-borne diseases of domestic animals. **Journal of Parasitology**, v.72, n.4, p.485-491, 1986.
- WICKLER, S.; ANDERSON, T. P. Hematological changes and athletic performance in horses in response to high altitude (3,800m). **American Journal of Physiology Regulatory Integrative Comparative Physiology**, v.279, n.4, p.1176-1181, 2000.
- ZAKKYEH T.; ALI, O. M.; NASIBEH, H.V.; REZA, Y.E.M.; FARHANG, B.; FATEMEH, M. First molecular detection of *Theileria ovis* in *Rhipicephalus sanguineus* tick in Iran. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p.29-32, 2012.
- 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, n.7, p.543-548, 1994b
- ZAPF, F.; SCHEIN, E. The development of *Babesia (Theileria) equi* (Laveran 1901) in the gut and in the hemolymph of the vector ticks, *Hyalomma* species. **Parasitology Research**, v.80, n.4, p.297-302, 1994a.
- ZOBBA, R.; ARDU, M.; NICCOLINI, S.; CHESSA, B.; MANNA, L.; COCCO, R.; PAPPAGLIA, M. L. Clinical and laboratory findings in equine piroplasmiasis. **Journal of Equine Veterinary Science**. v.28, n.5, p.301-307, 2008.

ANEXOS

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

Anexo II – Parecer da Comissão de Ética na Pesquisa da UFRRJ/COMEP

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



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

QUESTIONÁRIO (AO RESPONSÁVEL PELOS ANIMAIS)

INFORMAÇÕES GERAIS SOBRE A PROPRIEDADE

Data: ____ / ____ / ____

1. Dados gerais:

Nome da propriedade: _____

Município de localização: _____

Coordenadas : _____

2. Área da propriedade

Total: _____ ha ou _____ alqueires

3. Localização dos animais

() só em baias () só em piquetes () só pasto () baias e piquetes

() baias e pasto () baias, piquetes e pasto

4. Possui eqüinos na mesma pastagem de outros animais que não sejam equinos?

() Sim () Não **Quais ?** _____

5. Alimentação dos animais

() capim () feno () ração

6. Origem do capim

() capineira () pasto Outro: _____

7. Cama das baias:

() serragem () areia e carvão () nenhuma () outro _____

8. Principal forrageira do pasto:

() Capim gordura () Capim elefante () Pangola () Tifton () *Coast cross*

() Napier () Alfafa () Capim nativo () Outros: _____

9. Características das áreas de pasto

() seca () poucas áreas alagadas () muitas áreas alagas () rios () lagos

10. Os animais apresentam infestações por carrapatos

sim não qual época do ano

Método de controle _____

11. Usa produtos carrapaticidas?

sim não

12. Se usa, com que frequência é ou são usado(s) o(s) produto(s)?

2x/mês 1x/mês 3 a 4 x/ano a cada 6 meses 1x/ano

outro: _____

13. Tipo de equipamento utilizado para aplicação do carrapaticida?

Banheiros Bomba costal Pour-on Bomba mecânica

14. Quantos animais você banha com 20 litros (volume de uma bomba costal) do carrapaticida diluído? _____

15. Como você escolhe a dose utilizada em cada animal ?

Consulta o rótulo Consulta o Veterinário Consulta de outros criadores

Consulta os vendedores de lojas de produtos veterinários

outros _____

16. Qual a procedência da água que é fornecida aos animais?

Empresa de Água Açude Canalização de córregos e riachos

outra _____

17. Número de divisões do pasto (piquetes): _____

18. Utiliza limpeza de pasto

sim não periodicidade: _____ método: _____

19. Quem cuida do(s) animais?

Veterinário: Agrônomo Zootecnista Técnico agrícola Outro

20. Ha quanto tempo existe a criação? _____

21. Percentual de animais nascidos na propriedade _____

22. Abriga animais de outras propriedades?

sim não

Ficam em áreas separadas?

sim não

24. Qual a época mais propicia ao aparecimento de doenças?

verão outono inverno primavera

25. Quais doenças já ocorreram na propriedade?

Babesiose Cólica Diarréia Aparelho Locomotor

outra _____

26. Quais doenças consideram mais importantes _____

27. Qual o tratamento utilizado para as
doenças? _____

28. Quantos animais morreram nos últimos anos? _____

29. Caso tenha morrido, quais foram as causas? _____

INFORMAÇÕES SOBRE O ANIMAL

Propriedade: _____ Região: _____ Data: ____ / ____ / ____

1. Nome: _____

2. Sexo: () Macho () Fêmea

3. Idade: _____

4. Raça: _____

5. Origem do animal

() nascido na propriedade () externa Procedência _____

6. Há quanto tempo o animal está na propriedade?

() menos de 1 mês () de 1 mês a seis meses () acima de 6 meses

7. Utilização do animal

() Passeio () Reprodução () Esporte () Exposição () outra _____

8. Alguma doença atual?

() sim () não Qual? _____

9. Este animal está tomando algum medicamento ou tomou há pouco tempo?

() Sim () Não - Caso esteja, qual? () Imizol () Antibióticos Outros ()

Quais? _____

25. Este animal apresenta carrapatos?

() sim () não Qual/Quais? _____

Grau de infestação: _____ Espécie: _____

26. Este animal apresenta outros parasitos?

() sim () não Qual/Quais? _____

Grau de infestação: _____

Anexo II – Parecer da Comissão de Ética na Pesquisa da UFRRJ/COMEP



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NA PESQUISA DA UFRRJ / COMEP

Protocolo N° 201/2012

PARECER

O Projeto de Pesquisa intitulado “*Mecanismos de infecção e transmissão de Theileria equi (Piroplasmida: Theileriidae) e Babesia caballi (Piroplasmida: Babesiidae) por carrapatos em equinos sob condições experimentais*” sob a responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Luiz Massard do Departamento de Parasitologia Animal do Instituto de Veterinária, processo 23083.001257/2012-53, atende aos princípios básicos para pesquisa envolvendo o uso de animais e está de acordo com os princípios éticos e do bem estar animal estando de acordo com a Resolução 714 de 20/06/2002 do CFMV.

UFRRJ, 24/05/2012.


Profª. Dra. Aurea Echevarria Neves Lima
Pró-reitora de Pesquisa e Pós-graduação