

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SUSTENTABILIDADE AGROPECUÁRIA

Fatores Determinantes para a ocorrência de piroplasmose
equina no Pantanal Sul Matogrossense

Autor: João Bosco Vilela Campos
Orientador: Dr. Heitor Miraglia Herrera
Coorientadora: Dra. Carina Elisei de Oliveira

"Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SUSTENTABILIDADE AGROPECUÁRIA, no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária da Universidade Católica Dom Bosco - Área de concentração: "Sustentabilidade Ambiental e Produtiva" Aplicada a Saúde, Ambiente e Sustentabilidade"

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Janeiro - 2017



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
Inspira o futuro

Aspectos associados à piroplasmose equina no Pantanal Sul Matogrossense

Autor: João Bosco Vilela Campos

Orientador: Prof. Dr. Heitor Miraglia Herrera

Coorientadora: Profa. Dra. Carina Elisei de Oliveira

TITULAÇÃO: Mestre em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária

Área de concentração: Sustentabilidade Ambiental e Produtiva

APROVADO em 31 de janeiro de 2017.

Prof. Dr. Heitor Miraglia Herrera - UCDB

(Orientador)

Profa. Dra. Carina Elisei de Oliveira - UCDB

(Coorientadora)

Profa. Dra. Eliane Mattos Piranda - UFMS

Prof. Dr. Fernando de Almeida Borges - UFMS

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca da Universidade Católica Dom Bosco – UCDB, Campo Grande, MS, Brasil)

C198f Campos, João Bosco Vilela
Fatores determinantes para a ocorrência de piroplasmose equina no Pantanal Sul Matogrossense / João Bosco Vilela Campos; orientador Heitor Miraglia Herrera; coorientadora Carina Elisei de Oliveira. -- 2017
100 f.

Dissertação (mestrado em ciências ambientais e sustentabilidade agropecuária) – Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2017.

Inclui bibliografias.

1. Equino 2. Theileriose 3. *Babesia caballi* 4. Carrapato 5. Pantanal Mato-grossense (MT e MS) I. Herrera, Heitor Miraglia II. Oliveira, Carina Elisei de III. Título.

CDD: 636.10896

"Quando tudo está perdido, sempre existe um caminho. Quando tudo está perdido, sempre existe uma luz". Renato Russo!

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ter me proporcionado Força, Persistência e Coragem nesse novo desafio traçado por mim e por toda a minha família e todos que acreditaram nesta ideia.

Dedico a minha família por todo o apoio que me deste nos momentos de alegria e principalmente nos momentos de dificuldades que passamos juntos.

Ao meu pai “*Djair*” por ter sido simplesmente a minha “*base*”, ou seja, o meu Porto Seguro para todo e qualquer tipo de interesse ou desafio. À minha mãe “*Aláide*” pelo incentivo na hora de me dedicar a qualquer atividade, além do apoio em qualquer situação que me encontrasse. À minha irmã mais velha “*Rita*”, pela sua experiência profissional e as demais irmãs “*Mariana, Amanda*”, incluindo os meus sobrinhos “*Luana e Raul*” pela Alegria proporcionada nos momentos difíceis.

Aos demais familiares que participaram diretamente ou indiretamente apoiando de alguma forma essa jornada.

Dedico também a todos os meus amigos que de alguma forma, estiveram ou às vezes não presentes, mas que colaboraram para que o meu segundo objetivo que é o título de *Mestre* pudesse ser concretizado.

A todos os docentes pesquisadores do programa pela atenção e dedicação para comigo e a todos os demais alunos.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer à UCDB por todo apoio, incentivo e investimento no programa de Pós – graduação em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária.

Em especial ao meu orientador “*Dr. Heitor Miraglia Herrera*” junto de sua esposa e também docente “*Dra. Gisele Braziliano de Andrade*” e a minha coorientadora “*Dra. Carina Elisei de Oliveira*”, pela atenção e tempo exclusivo que tiveram para se dedicar a este trabalho que na qual desenvolvemos juntos.

A “*Dra. Jania de Rezende*”, que com o passar dos anos em que trabalhamos juntos acabou tornando-se além de uma grande amiga, mas uma pessoa muito especial, que sempre que precisei, esteve pronta para me acudir em qualquer situação que me encontrava.

A professora “*Dra. Eliane Piranda*”, que além de se tornar uma parceira, mas por simplesmente transpassar os seus conhecimentos em determinadas áreas de interesse do nosso trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado ao programa.

As técnicas, e que hoje tornaram grande amigas com o passar dos anos na rotina dos laboratórios, mas que sem elas grande parte do trabalho não seria possível à conclusão: *Maria Helena, Daiane, Mirian e Vânia*.

Aos meus companheiros que estiveram presentes desde o início até o término de mais esta etapa, onde pudemos partilhar discussões e experiências já vivenciadas por cada um: Pós-Doutoranda *Grasiela E. Porfírio*, doutorandos *Filipe*

Martins Santos, Paula Helena Santa Rita, Jaire M. Torres, mestrandos Wanessa Teixeira Gomes de Barreto, Gabriel Carvalho de Macedo, Leonardo Nascimento.

Aos alunos de Iniciação Científica (PIBIC) que estiveram sempre dispostos, seja em reuniões como nos momentos de necessidade para finalizar alguma atividade referente ao trabalho. Em especial destaque os alunos: *Ruth, Sangi, Magnum, Edson, João Vitor e Diovana* que sempre estiveram presentes e preparados para me socorrer.

In memoriam não somente a um colega de trabalho que teve a sua graduação concluída junto comigo, mas uma pessoa que acabou tornando-se um grande amigo, que também participou do trabalho nos ajudando nos manejos e coletas de materiais nos animais: "*James Dantas*"; você deixará muitas SAUDADES...

A Fazenda Alegria por todo o apoio e espaço fornecido a que foi executado todo o trabalho de coleta dos materiais; destacando Sr. *Carlinhos*, Sr. *Marquinhos*, Dona *Lurdes*, médico veterinário da fazenda *Bruno* além dos demais funcionários que estiveram envolvidos.

A Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP-SP, pelo espaço disponibilizado para a execução de uma das etapas do trabalho.

Ao professor Dr. *Marcos Rogério André* pelo seu tempo disponível, supervisão e conhecimentos cedidos nesta etapa do trabalho realizado na UNESP.

A professora Dra. *Rosângela Zacarias Machado* por todo o seu conhecimento e experiência no assunto além de permitir que ocorresse uma etapa do trabalho no laboratório de Imunoparasitologia da UNESP-SP.

A todos os colaboradores do laboratório de Imunoparasitologia da UNESP-SP que não somente participaram, mas como ajudaram na conclusão de uma etapa. Em especial: *Aline, Márcia, Mayra, Otavio, Carla, Jenevaldo, Socorro, Bia, Keyla,*

Gustavo, Paulo, Inalda, Sr. Carlos, Dasiel, Rafaela, Natalia, Letícia, Jyan, Renan, Lana, Mirella e Arvelino.

BIOGRAFIA

João Bosco Vilela Campos nascido na cidade de Campo Grande, estado de Mato Grosso do Sul no dia 12 de junho de 1984, filho de Djair Campos Leite e Alaíde Afonso Vilela. O autor deste trabalho possui graduação em Medicina Veterinária que foi concluído no ano de 2014, pela Universidade Católica Dom Bosco. Concluiu o Curso de Técnico em Radiologia Médica no ano de 2009. Ingressou no Programa de Mestrado e Doutorado em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária da Universidade Católica Dom Bosco, com área de concentração em: Saúde, Ambiente e Sustentabilidade, na primeira turma de fevereiro de 2015.

SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO.....	01
OBJETIVOS.....	03
Objetivo Geral.....	03
Objetivos Específicos.....	03
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
O Equino.....	04
Etiologia da Piroplasmose Equina.....	05
Vetores de <i>B. caballi</i> e <i>T. equi</i>	06
Ciclo Biológico de <i>B. caballi</i> e <i>T. equi</i>	08
Sinais Clínicos.....	11
Epidemiologia.....	12
Diagnósticos da Piroplasmose Equina.....	14
Exame Parasitológico em Esfregaços Sanguíneos.....	14
Diagnóstico Sorológico.....	15
Diagnóstico Molecular.....	16
Filogenia.....	17
JUSTIFICATIVA.....	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
Fatores determinantes para a ocorrência de piroplasmose equina no Pantanal Sul Matogrossense.....	39
RESUMO.....	39
ABSTRACT.....	40
INTRODUÇÃO.....	42
MATERIAL E MÉTODOS.....	44
RESULTADOS.....	49
DISCUSSÃO.....	52
CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS.....	61

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Eritrócitos de equinos contendo merozoítas de <i>Babesia caballi</i> . Diff-Quik®, ×100 óleo de imersão (WISE et al., 2013).....	06
Figura 2. Eritrócitos de equinos contendo merozoítas de <i>Theileria equi</i> na forma característica de “cruz maltesa”. Diff-Quik®, ×100 óleo de imersão (WISE et al., 2013).....	06
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Babesia caballi</i> (WISE et al., 2013).....	09
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Theileria equi</i> (WISE et al., 2013).....	10
 Artigo:	
Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 0,9% de amplicons relativos à PCR para piroplasmas de equinos utilizando os primers NBabesia-1F/18SREV-TB resultando em um fragmento de 1600pb. M: marcador de peso molecular de 1Kb plus; 1: Controle negativo (água ultra-pura esterilizada); 2-14: amostras testes de equinos pantaneiros; 15: Controle positivo (Amostra de Jaboticabal).....	74
Figura 2. Árvore filogenética de sequências do 18S rRNA de <i>T. equi</i> . A análise foi realizada utilizando-se o método de <i>Maximum Likelihood</i> implementada com o modelo de substituição GTR+G+I. Os números nos ramos correspondem a valores de <i>bootstraps</i> acessados com 1.000 repetições. Sequências do 18S rRNA de <i>Theileria sergenti</i> , <i>Theileria orientalis</i> e <i>Theileria buffeli</i> , foram utilizadas como <i>outgroup</i>	75

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Levantamento de ocorrência sorológica e molecular de agentes causadores da piroplasmose equina no mundo.....13

Tabela 2. Levantamento de frequência de anticorpos IgG de agentes causadores da piroplasmose equina em estados brasileiros.....14

Artigo:

Tabela 1. Descrição dos primers utilizados nas análises moleculares de piroplasmídeos de equinos baseados no gene 18S rRNA.....76

Tabela 2. Frequência de anticorpos IgG de *T. equi* e *B. caballi* em equinos residentes do Pantanal Sul Matogrossense, junho a julho de 2014 e julho a agosto de 2015. Os resultados estão expressos pelo número total de positivos seguido pelo valor percentual para cada categoria com intervalo de confiança (IC).....76

Tabela 3. Detecção molecular de piroplasmídeos de equinos residentes do Pantanal Sul Matogrossense, junho a julho de 2014 e julho a agosto de 2015. Os resultados estão expressos pelo número de positivos, seguido pelo número total de animais para cada categoria e pelo valor percentual para cada categoria com intervalo de confiança (IC).....76

Tabela 4. Valores das médias seguido do desvio padrão de contagem de hemácias e volume globular nas categorias de equinos amostrados no Pantanal Sul Matogrossense, junho a julho de 2014 e julho a agosto de 2015.....77

Tabela 5. Número de animais seguido de prevalência, por categoria com infestações simples e coinfectações de espécies de carrapatos ixodídeos coletados nos equinos residentes do Pantanal Sul Matogrossense, junho a julho de 2014 e julho a agosto de 2015.....77

LISTA DE ABREVIATURAS

AIE	Anemia Infecciosa Equina
CENARGEN	Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CID	Coagulação Intravascular Disseminada
CREBIO	Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DO	Densidade Óptica Média
EDTA	Etileno diamino tetra acetato de sódio ou de potássio
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EUA	Estados Unidos
FCAV	Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Ig	Imunoglobulina
IM	Intramuscular
IV	Intravenosa
Kg	Quilograma
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
mg	Miligramma
ml	Mililitro
mm	Milímetro
MS	Mato Grosso do Sul
NE	Nível de Elisa
OIE	World Organization for Animal Health
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RFC	Reação de Fixação de Complemento
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RPM	Rotações por Minuto
SP	São Paulo
UCDB	Universidade Católica Dom Bosco

UFMS
uL
UNESP
uM

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Microlitro
Universidade Estadual Paulista
Micromolar

RESUMO

A piroplasmose equina é uma doença infecciosa causada por parasitas de células sanguíneas, *Babesia caballi* e *Theileria equi* e são disseminados por carrapatos ixodídeos. Esta enfermidade de ocorrência mundial tem importância, devido a prejuízos causados no mercado de equinos. Diante dessas informações, objetivou-se identificar a ocorrência de piroplasmose equina, associando a presença de carrapatos e alguns aspectos hematológicos em animais nascidos e criados na região do Pantanal Sul Matogrossense. Foram colhidas amostras de sangue total e soro de 170 equinos. No momento da coleta foram realizados esfregaços de sangue periférico dos animais e coletas de carrapatos para identificação taxonômica e exame parasitológico na hemolinfa e ovos. Os valores de VG e a He/mm³ foram utilizados como índice de anemia nos animais. Para as análises sorológicas foi realizado o teste ELISA com antígeno recombinante de *B. caballi* e o antígeno total para *T. equi*. Para a detecção molecular dos piroplasmas foi realizada PCR utilizando os primers NBabesia 1F e 18SRev-TB. As análises filogenéticas foram realizadas após três nPCR e posterior sequenciamento. Os resultados sorológicos mostraram que 61,8% e 52,9% dos equinos estão expostos à *T. equi* e *B. caballi*, respectivamente. A PCR detectou a infecção em 43,5% dos animais com piroplasmas de equinos. O sequenciamento revelou 98-100% de identidade com sequências previamente publicadas no GenBank para *T. equi*. Dos 170 animais analisados, 51,2% encontravam-se infestados por carrapatos das espécies *Dermacentor nitens*, *Amblyomma sculptum* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Todos os animais foram negativos aos esfregaços de sangue periférico, assim como nos testes de hemolinfa e ovos nos carrapatos. Os animais soropositivos e positivos no teste molecular não apresentaram anemia. O presente trabalho mostrou que a piroplasmose equina é endêmica na região e que os equinos podem ser considerados sentinelas dos agentes, devendo ser constantemente monitorados.

Palavras – Chave: *Babesia caballi*; diagnóstico molecular; Pantanal; sorologia; *Theileria equi*.

ABSTRACT

Equine piroplasmosis is an infectious disease caused by parasites of blood cells, *Babesia caballi* and *Theileria equi* and are disseminated by ixodidae ticks. This disease of worldwide occurrence is important, due to damages caused in the equine market. In view of this information, the objective was to identify the occurrence of equine piroplasmosis, associating the presence of ticks and some hematological aspects in animals born and raised in the Pantanal Sul Matogrossense region. Samples of whole blood and serum of 170 horses were collected. At the time of collection, peripheral blood smears were collected from the animals and collected from ticks for taxonomic identification and parasitological examination on hemolymph and eggs. The values of VG and He / mm³ were used as anemia index in the animals. For the serological analyzes, the ELISA test with recombinant *B. caballi* antigen and the total antigen for *T. equi* were performed. For the molecular detection of the piroplasms PCR was performed using the primers NBabesia 1F and 18SRev-TB. Phylogenetic analyzes were performed after three nPCR and subsequent sequencing. The serological results showed that 61.8% and 52.9% of the horses are exposed to *T. equi* and *B. caballi*, respectively. PCR detected the infection in 43.5% of the animals with equine piroplasms. Sequencing revealed 98-100% identity with sequences previously published in GenBank for *T. equi*. Of the 170 animals analyzed, 51.2% were infested with ticks of the species *Dermacentor nitens*, *Amblyomma sculptum* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. All animals were negative to peripheral blood smears, as were hemolymph and egg ticks. Positive and seropositive animals in the molecular test did not present anemia. The present study showed that equine piroplasmosis is endemic in the region and that equines can be considered sentinels of the agents and should be constantly monitored.

Key - words: *Babesia caballi*; molecular diagnostics; Pantanal; serology; *Theileria equi*.

INTRODUÇÃO

Os parasitas da ordem Piroplasmida, que incluem as espécies pertencentes aos gêneros *Babesia*, *Theileria* e *Cytauxzoon*, causam importantes doenças em seres humanos, animais selvagens, de produção e de companhia em todo o mundo (MEINKOTH & KOCAN, 2005; SOLANO-GALLEGO & BANETH, 2011; GOHIL et al., 2013; WISE et al., 2013; VANNIER et al., 2015). A piroplasmose equina é uma enfermidade infecciosa causada por dois protozoários intracelulares, *Babesia caballi* e *Theileria equi*, transmitidos por carrapatos ixodídeos [*Dermacentor nitens*, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *Amblyomma sculptum*]. A primeira descrição de um dos agentes causadores da piroplasmose equina (*Babesia equi*) ocorreu na África do Sul por Laveran em 1901 (ZAPF & SCHEIN, 1994). Entretanto, em 1998, *B. equi* foi reclassificada para *T. equi* através de investigações filogenéticas e detalhamento de sua biologia. De fato, diferentemente de *B. caballi*, que é exclusivamente intra-eritrocitária, nas fases iniciais da infecção, esquizontes de *T. equi* são observados em células mononucleares no sangue periférico (MEHLHORN & SCHEIN, 1998; UILENBERG, 2006; ALLSOPP et al., 2007; KAPPMAYER et al., 2012). No Brasil, a piroplasmose equina foi relatada pela primeira vez no estado de São Paulo em 1910, por Carini (DE WALL, 1992; WISE et al., 2013).

A doença pode se manifestar sob a forma aguda, subaguda ou crônica. Clinicamente se caracteriza por apresentar pirexia, anemia hemolítica, icterícia, hemoglobinúria, bilirrubinúria, hepatomegalia, esplenomegalia e, em casos mais avançados, morte. Muitos animais tornam-se portadores crônicos, principalmente para *T. equi*, servindo de fonte de infecção para os carrapatos (DE WALL, 1992; BOTTEON et al., 2005; RONCATI, 2006; DONNELLAN & MARAIS, 2009).

No mundo a doença é considerada como uma das principais barreiras para o trânsito de equinos seja para quaisquer atividades que os animais forem submetidos (VAN HEERDEN, 1996; SCHNITTGER et al., 2012; SHORT et al., 2012). De acordo com De Wall (1992), apenas 10% da população equina em todo o mundo habitam em locais livres do agente. Países que possuem climas tropical e subtropical e alguns temperados são os mais acometidos pela doença por haver grande

população de carrapatos vetores (SONENSHINE, 1991; DE WALL, 1992; ROTHSCHILD, 2013). Entretanto, nos EUA, o reaparecimento desses agentes reforçou a conscientização sobre a doença. Nesse sentido, muito se tem avançado em termos de diagnóstico, controle e profilaxia. Isto faz com que alguns países adotem rigorosas medidas preventivas quanto ao trânsito dos animais (ZOBBA et al., 2008; SCHNITTGER et al., 2012; SHORT et al., 2012).

O Pantanal Sul Matogrossense é uma imensa planície de aproximadamente 140.000 km², localizada no centro da América do Sul, com principal fonte de renda a pecuária extensiva. Os quase 140 mil equinos que habitam a planície Pantaneira tem importante papel na economia local por serem de fundamental importância no transporte e no manejo com os bovinos (GODOI FILHO, 1984; ALLEN & VALLS, 1987). É importante ressaltar que o Pantanal Sul Matogrossense é uma área endêmica para o vírus da Anemia Infecciosa Equina (AIE) doença causadora de imunossupressão, e quando associada a outros agentes infecciosos pode comprometer seriamente a saúde dos animais (SILVA et al., 2001; BORGES et al., 2013; PARREIRA et al., 2016).

Ainda, a região do Pantanal é conhecida por albergar uma rica diversidade biológica, com populações expressivas de vários táxons, compreendendo vertebrados e invertebrados (JUNK et al., 2006). Essa característica ecossistêmica também se refere aos carrapatos. Importante destacar que a piroplasmose equina não tem sido relatada na região do Pantanal Nhecolândia, isso faz com que a região venha ser mais bem investigada. Já que têm sido destacadas elevadas prevalências de carrapatos ixodídeos (CANÇADO et al., 2008; RAMOS et al., 2014), com eficiente mecanismo de transmissão vertical (transovariana) e horizontal (transestadial) de piroplasmas (ROCANTI, 2006; UETI et al., 2008).

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Identificar a ocorrência de piroplasmose equina, associando a presença de carrapatos e alguns aspectos hematológicos no Pantanal Sul Matogrossense, Brasil.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a exposição a *T. equi* e *B. caballi* por exames sorológicos;
- ✓ Detectar o DNA de piroplasmas de equinos nos animais infectados;
- ✓ Identificar os carrapatos parasitas dos equinos;
- ✓ Realizar exames parasitológicos em sangue periférico dos equinos, hemolinfa e ovos dos carrapatos vetores;
- ✓ Avaliar alguns parâmetros hematológicos dos animais;
- ✓ Realizar estudo filogenético das sequências obtidas.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O equino

O equino (*Equus caballus*) ocupa uma posição de destaque tanto em países desenvolvidos como aqueles em desenvolvimento, exercendo um importante papel na formação econômica, social e política. No Brasil, uma de suas principais funções é o trabalho diário nas atividades agropecuárias, com aproximadamente cinco milhões de animais utilizados, principalmente, para o manejo do gado bovino. O aspecto social do equino no Brasil também é importante quando relacionado a atividades de esporte e lazer (CEPEA, 2006).

Segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), o Brasil possui o maior rebanho (8.000.000) de equídeos na América Latina, e é o terceiro no mundo, atrás apenas de China e México. De acordo com o IBGE, (2010) o rebanho de equinos permaneceu, entre 2009 e 2010, na faixa dos 5,5 milhões de cabeças, sendo 20,4% dos animais registrados no Centro-Oeste. O estado com o maior efetivo de equinos é Minas Gerais (MG), enquanto o Mato Grosso do Sul (MS) ocupa a sétima posição com 345 mil animais. Além disto, dos 20 municípios brasileiros com os maiores efetivos, seis pertencem ao MS (Corumbá, Três Lagoas, Campo Grande, Ribas do Rio Pardo, Paranaíba e Aquidauana). Como exemplo do que tem ocorrido desde a introdução do cavalo no Brasil, esta distribuição ocorre devido à forte associação entre o rebanho equino e a pecuária bovina, demonstrada pela intensa utilização do equino na lida com o gado, resultando em uma alta correlação entre os dois rebanhos (CEPEA, 2006).

O equino foi introduzido na região do Pantanal no final do século XVIII e desde então vem sendo fundamental para o manejo com os bovinos, no transporte e no lazer, e em muitos casos, o uso não é só necessário, mas também, insubstituível, pois devido às características sazonais do Pantanal, a utilização de veículos motorizados e maquinário não são possíveis em determinadas épocas do ano. De fato, as características do cavalo pantaneiro diferem dos de outras raças devido à necessidade de se adaptar ao ambiente do Pantanal. Nesse sentido, durante a sua

evolução, os cavalos pantaneiros adquiriram características zootécnicas funcionais como tolerância à imersão em água por períodos prolongados. O estresse provocado pelo ambiente e pelo homem, como a utilização de técnicas rudimentares de doma, debilitam os animais, e infecções crônicas edêmicas como a piroplasmose equina e a anemia infecciosa equina podem acarretar prejuízos à saúde dos animais (SANTOS et al., 1995).

Etiologia da piroplasmose equina

Os parasitas da ordem Piroplasmida, que incluem as espécies pertencentes aos gêneros *Babesia*, *Theileria* e *Cytauxzoon*, causam importantes doenças em todo o mundo, em seres humanos, animais de produção, animais selvagens e animais de companhia (BISHOP et al., 2004; MEINKOTH & KOCAN, 2005; SOLANO-GALLEGO & BANETH, 2011; SCHNITTGER et al., 2012; GOHIL et al., 2013; WISE et al., 2013; VANNIER et al., 2015). A taxonomia clássica de Piroplasmida tem sido baseada em mecanismos de transmissão do hospedeiro invertebrado, tipo de célula infectada do hospedeiro vertebrado, e por vezes, a morfologia do parasita e a preferência do hospedeiro invertebrado (ALLSOPP et al., 1994; CRIADO-FORNELIO et al., 2003; ALLSOPP & ALLSOPP, 2006; IRWIN, 2009; LACK et al., 2012; SCHNITTGER et al., 2012). Espécies de *Theileria* e *Cytauxzoon* estão limitadas à transmissão transtádial no carrapato e inicialmente infecta células nucleadas dentro do hospedeiro vertebrado (SCHNITTGER et al., 2012). Alternativamente, as espécies de *Babesia* têm traços de caráter adquiridos que presumivelmente melhorem sua propagação, como a transmissão transovariana no carrapato e infecção exclusiva de eritrócitos no hospedeiro vertebrado (CHAUVIN et al., 2009). No entanto, à medida que mais informações a nível molecular e biológico vêm sendo descobertas verifica-se que este esquema de classificação é limitado e não reflete a diversidade e a evolução de Piroplasmida.

A piroplasmose equina é uma doença infecciosa de ocorrência mundial causada por protozoários intracelulares, *B. caballi* e *T. equi* (FRIEDHOFF et al., 1990; SCHNITTGER et al., 2012; SHORT et al., 2012; WISE et al., 2013; SCOLES & UETI, 2015). Estes piroplasmas podem ser facilmente distinguidos, devido às formas a que se apresentam. Dentro dos eritrócitos dos hospedeiros vertebrados (equinos), *B. caballi* aparece tipicamente como duas grandes formas piriformes arredondadas

de merozoítas, ou seja, em forma de pera medindo aproximadamente 2-5 μ m de comprimento, ou às vezes em formas ovais (Figura 1) (SCHEIN, 1988; DE WAAL, 1992).

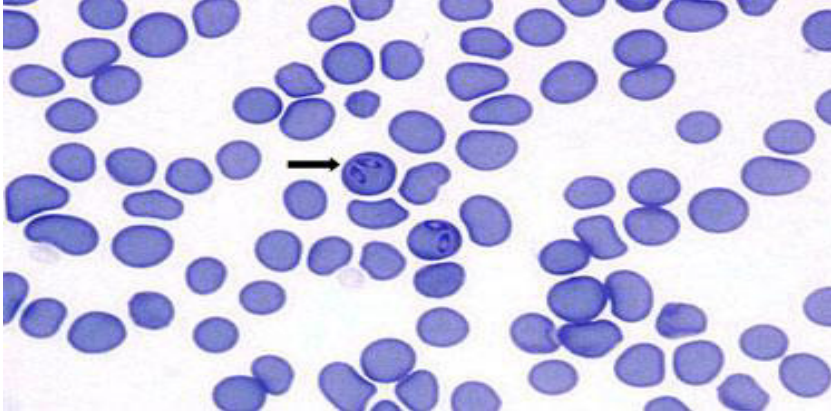


Fig 1: Eritrócitos de equinos contendo merozoítas de *Babesia caballi*. Diff-Quik®, $\times 100$ óleo de imersão (WISE et al., 2013).

Os merozoítas de *T. equi* que também estão presentes dentro dos eritrócitos dos equinos, e com capacidade polimórfica, apresentam-se como pequenos piroplasmas ocasionalmente com forma de “Cruz de Malta”, geralmente medindo 2-3 μ m de comprimento ou também podem se apresentar em formas esféricas ou ovais (SCHEIN, 1988; DE WAAL, 1992) (Figura 2).

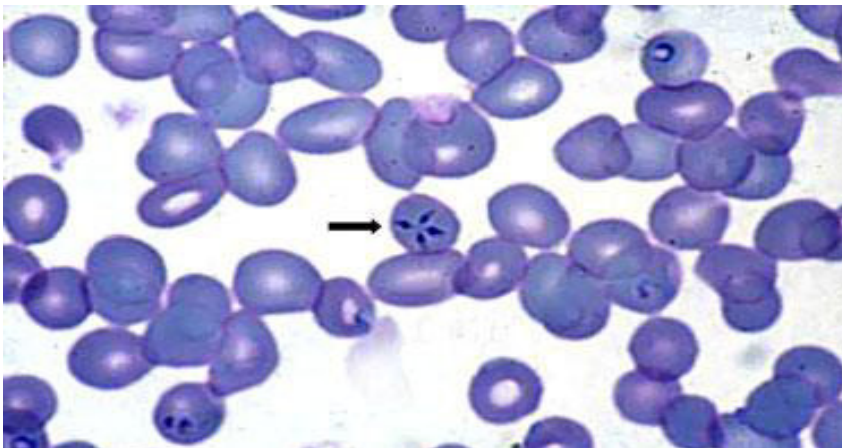


Fig 2: Eritrócitos de equinos contendo merozoítas de *Theileria equi* na forma característica de “cruz de Malta”. Diff-Quik®, $\times 100$ óleo de imersão (WISE et al., 2013).

Vetores de *B. caballi* e *T. equi*

Os ixodídeos são os vetores naturais para *B. caballi* e *T. equi*, porém há relatos de que a transmissão dos parasitas ocorre de forma iatrogênica através de manejos indevidos por parte dos criadores como a utilização de mesmas agulhas. No entanto,

o modo de transmissão mais eficiente ocorre através do carrapato infectado (ZAPF & SCHEIN, 1994; TORINA et al., 2007; PASSAMONTI et al., 2010).

O ciclo de vida dos carrapatos ixodídeos varia conforme o gênero e espécie. De um modo geral, a teleógina se desprende de seu hospedeiro, realiza a postura de todos os ovos no solo e morre. Os ovos permanecem viáveis, e dependendo das condições ambientais a eclosão pode ocorrer no décimo ao décimo oitavo dia. Após a eclosão, as larvas se alimentam de seus hospedeiros e, posteriormente, sofrerão uma muda para o estágio ninfal. As ninfas após se alimentarem sofrerão ecdise, para o estágio adulto. Existem carrapatos com ciclo de vida monoxênico, de apenas um hospedeiro [*Dermacentor nitens* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*] e heteroxênico, com mais de um hospedeiro (*R. sanguineus* e *Amblyomma* sp.) (URQUHART et al., 1996; NAVARETE et al., 1999).

Aproximadamente 15 espécies de carrapatos em todo o mundo foram associadas, tanto experimentalmente como naturalmente, a infecção por *B. caballii*, sendo estes divididos em três gêneros (*Dermacentor*, *Hyalomma* e *Rhipicephalus*) (FRIEDHOFF, 1988). Já para *T. equi*, 14 espécies são descritas, divididos em quatro gêneros (*Dermacentor*, *Hyalomma*, *Rhipicephalus*, e *Amblyomma*) (DE WAAL, 1990). Infestações por *D. nitens* estão associadas com equinos soropositivos para *B. caballii*, enquanto que as infestações por *Amblyomma* sp. estão relacionadas com equinos soropositivos para *T. equi* (ESTRADA-PEÑA et al., 2005; KERBER et al., 2009; SCOLES et al., 2011).

No Brasil, embora *T. equi* tenha sido reportada transmitida por *R. (B.) microplus* (BATTSETSEG et al., 2002), evidências sugerem que a infecção também pode estar associada a *Amblyomma cajennense* (KERBER et al., 2009), um vetor transtadial de *T. equi* encontrado no Texas, EUA (SCOLES & UETI, 2013). A espécie *A. cajennense* é conhecida popularmente como “carrapato-estrela”. Caracteriza-se por hospedar uma ampla variedade de hospedeiros, incluindo os seres humanos e animais silvestres. É um carrapato de três hospedeiros encontrado no sudeste brasileiro e norte da Argentina (GUGLIELMONE et al., 2004; LABRUNA et al., 2004; ESTRADA-PEÑA et al., 2005).

Um estudo taxonômico realizado por Nava et al. (2014), demonstrou uma possível redescritção da espécie *A. cajennense* com a combinação de informações morfológicas, moleculares e de distribuição geográfica, registrando-se que essa espécie é encontrada em alguns estados da região norte do Brasil, Venezuela e

Guianas. Ainda, os autores descrevem que a espécie *Amblyomma sculptum*, embora semelhante a *A. cajennense* possui características morfológicas e distribuições diferentes podendo ser encontrado em áreas úmidas do Norte da Argentina, Bolívia e Paraguai, e no Brasil nas regiões Sudeste, Sul do Paraná, Norte de Pernambuco e Piauí e na região Centro-Oeste, sendo considerada a principal espécie encontrada na região do Pantanal brasileiro.

Já a espécie *D. nitens* popularmente conhecida como “carrapato-de-orelha-de-cavalo”, parasita as orelhas de equídeos e eventualmente bovinos. Além das orelhas, podem fixar-se no divertículo nasal, área perianal, entre pernas, crina e cauda. É a principal espécie vetora de *B. caballii*, sendo carrapato de um único hospedeiro, e dessa forma, sua fase parasitária que em média é de 28 dias, independe de condições climáticas (GUGLIELMONE et al., 2004; LABRUNA et al., 2004; ESTRADA-PEÑA et al., 2005).

Rhipicephalus (Boophilus) microplus preferencialmente parasita bovinos, no entanto, outros animais podem servir de hospedeiros, como é o caso dos equinos. Pode desempenhar um importante papel na disseminação de *T. equi* (KNOWLES, JR. et al., 1992; STILLER & COAN, 1995; GUIMARÃES et al., 1998; STILLER et al., 2002). O período de parasitismo pode variar de 18 a 30 dias. Assim como *D. nitens*, a fase de parasitismo não é influenciada por condições climáticas (NUÑEZ et al., 1985; GUGLIELMONE et al., 2004; ESTRADA-PEÑA et al., 2005). Alguns modelos experimentais mostram que essa espécie de carrapato pode transmitir o agente *T. equi* (NUÑEZ et al., 1985; GUIMARAES et al., 1998; GUGLIELMONE et al., 2004; ESTRADA-PEÑA et al., 2005). Estudo realizado por Battsetseg et al. (2002), utilizando reação de Nested de PCR (nPCR), sugere que *R. (B.) microplus* pode servir como vetor tanto de *T. equi* como de *B. caballii*, e que a manutenção pode ocorrer tanto transestadial como transovariana.

Ciclo biológico de *B. caballii* e *T. equi*

No interior do hospedeiro vertebrado, os esporozoítas de *B. caballii*, recém-inoculados pelos carrapatos, adquirem a forma de trofozoítas, invadem os eritrócitos e multiplica-se por fissão de seus núcleos (merogonia). Após a ocorrência da lise dos eritrócitos, os merozoítas são liberados invadindo novos eritrócitos (MEHLHORN & SCHEIN, 1998; HOMER et al., 2000; WISE et al., 2013).

Após o repasto sanguíneo em equinos infectados, alguns merozoítas se transformam em macrogametas e microgametas e, através da gametogonia se origina um zigoto imóvel que se diferenciará em oocineto através de esporogonia, penetrando nas células intestinais e ovos dos carrapatos. Sucessivas reproduções por esporogonia ocorrem originando centenas de milhares de esporocinetos que invadem o sistema reprodutor das fêmeas de carrapatos penetrando nos ovos, e nas glândulas salivares (GUIMARAES et al., 1998; MEHLHORN & SCHEIN, 1998; HOMER et al., 2000) (Figura 3).

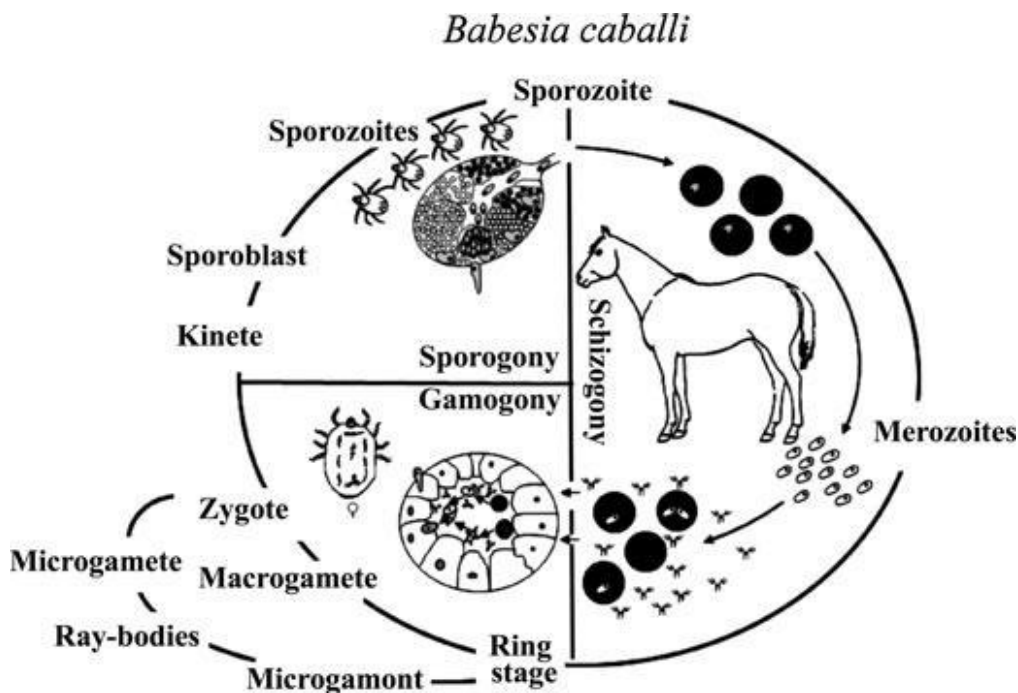


Figura 3: Ciclo de vida de *Babesia caballi* (WISE et al., 2013).

Para *T. equi* existe uma particularidade no início do ciclo, pois os esporozoítas se desenvolvem em grandes esquizontes nas células do sistema monofagocitário do hospedeiro vertebrado (KAPPMAYER et al., 2012), e em um prazo de nove dias, os merozoítas se disseminam pelos eritrócitos (HOMER et al., 2000; NIZOLI, 2005; RONCATI, 2006; WISE et al., 2013). Alguns merozoítas desenvolvem-se em formas de gametócitos no sangue periférico de equinos. Quando o carrapato ingere os gametócitos contidos no sangue, esses parasitas passam por reprodução sexuada originando zigotos no interior do intestino do carrapato. Dependendo das espécies de carrapatos, estes zigotos imóveis se formarão dando origem aos oocinetos móveis. Estes oocinetos penetram no epitélio do trato digestivo e inicia uma esporogonia dando origem aos esporocinetos, que romperão essas células, sendo

transportados por via hemolinfa para diferentes tecidos do carrapato. Logo após ocorrerá novamente uma esporogonia e ocorrerá a formação e o desenvolvimento dos esporozoítas no interior das glândulas salivares dos carrapatos, no qual ocorrem por um tempo de cinco a 24 dias (HOMER et al., 2000; NIZOLI, 2005). (Figura 4).

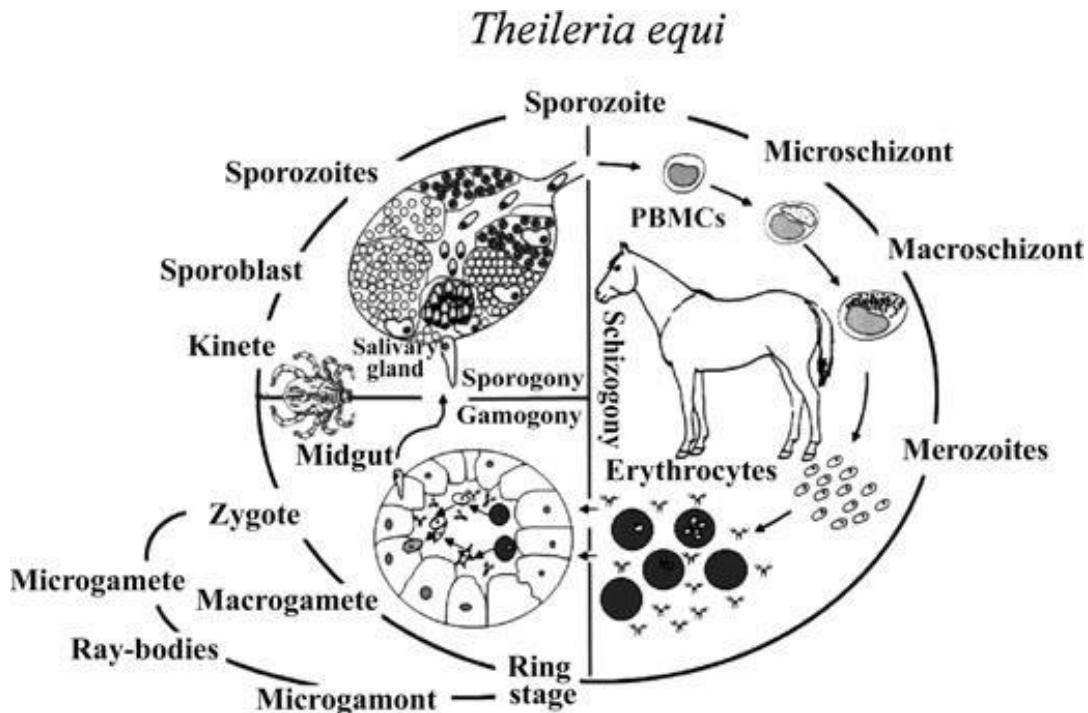


Figura 4: Ciclo de vida de *Theileria equi* (WISE et al., 2013).

Os carrapatos, como hospedeiros invertebrados de agentes infecciosos parasitários, apresentam específicas formas de manutenção: (a) esporozoítos de *B. caballi* ou *T. equi* são disseminados pela saliva do carrapato para outro equídeo; (b) transovariana ou vertical, quando a fêmea ao se alimentar de sangue de algum animal infectado, adquire os parasitas, que adentram aos seus ovários e são mantidos a sua prole ao longo de suas gerações; (c) transestadial ou horizontal, quando o parasita se desenvolve dentro do vetor, e esse mesmo vetor seja no estágio em que se encontra tem a capacidade de infectar os demais subsequentes estágios (UETI et al., 2008).

Vários aspectos na relação parasita – hospedeiro – carrapato – vetor ainda não estão totalmente definidos (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2011). O reservatório de *T. equi* é o equídeo infectado persistentemente, visto que há apenas a transmissão horizontal (transestadial) em seus vetores *R. (B.) microplus* e *A. sculptum*. Ao se tratar de *B. caballi*, tanto o equino infectado como o carrapato são considerados reservatórios por que, além da transmissão horizontal, a

transmissão vertical (transovariana) ocorre em seu principal vetor (*D. nitens*) (UETI et al., 2008; KERBER, 2009).

A manutenção de piroplasmas de equinos pode ocorrer por via iatrogênica, como transfusões de sangue infectado e compartilhamento de agulhas (SIMPSON & NEAL, 1980; GERSTENBERG et al., 1998; UETI et al., 2008; SHORT et al., 2012). Alguns estudos relatam a manutenção de *B. caballi* ou *T. equi* por via placentária para os fetos de éguas portadoras (PHIPPS & OTTER, 2004; ALLSOPP et al., 2007; GEORGES et al., 2011), resultando em abortos, natimortos ou infecções neonatais (CORREA et al., 1978; LEWIS et al., 1999; GEORGES et al., 2011).

Sinais clínicos

Os sinais clínicos da piroplasmose equina não devem ser indicados unicamente como forma de diagnóstico, pois a doença apresenta-se de forma subclínica; além de não ser possível diferenciar as infecções de ambos os agentes (POTGIETER et al., 1992; BHOORA et al., 2009).

Os animais uma vez infectados por *T. equi* permanecem ao longo de toda a sua vida com o agente, enquanto que na infecção por *B. caballi*, os equinos podem permanecer infectados por até quatro anos (DE WAAL & VAN HEERDEN, 1994). O período de incubação é de 10-30 dias para *B. caballi* e 12-19 dias para *T. equi*, dependendo de condições, como imunidade animal e dose infectante do parasita (DE WAAL, 1992).

Nos países endêmicos, diversos fatores podem tornar as taxas de mortalidades em torno de 5-10%, como: saúde dos animais, dose infectante, antigenicidade da cepa, ocorrência de coinfeção e administração de tratamento (MAURER, 1962; DE WAAL, 1992; BRÜNING, 1996; WISE et al., 2013; SUMBRIA et al., 2015). Normalmente, a infecção por *B. caballi* apresenta-se de maneira menos severa que *T. equi*, porém os sinais variam de uma região para outra (ROTHSCHILD & KNOWLES, 2007).

Nos casos de infecção aguda a presença de anemia hemolítica, associadas com mucosas pálidas ou ictéricas está relacionada a infecções por *T. equi*. Enquanto nas infecções por *B. caballi*, à formação sistêmica de microtrombos e desenvolvimento de coagulação intravascular disseminada (CID) (DE WAAL, 1992; DONNELLAN & MARAIS, 2009). Durante a infecção aguda tem sido observado

outros sinais, como: fraqueza, taquicardia, taquipnéia, hemoglobínúria e bilirrúbinúria (DE WAAL, 1992; RONCATI, 2006). Alguns animais podem apresentar distúrbios gastrointestinais como diarreias, compactações e cólicas (BOTTEON et al., 2005).

Os sinais clínicos mais comuns e observados nos animais com piroplasmas são: anorexia, letargia, perda de peso, febre alta e edema periférico, petéquias nas mucosas devido à trombocitopenia (DE WAAL, 1992; NICOLAIEWSKY et al., 2001; ZOOBA et al., 2008).

Os equinos portadores crônicos, na maioria das vezes apresentam-se assintomáticos tanto para *T. equi* como para *B. caballi*. A persistência da infecção ocorre, em parte, devido ao sequestro das hemácias parasitadas (MAURER, 1962; FRIEDHOFF et al., 1990; DE WAAL, 1992).

As infecções crônicas por *T. equi* e *B. caballi* são despercebidas devido aos sinais clínicos inespecíficos como letargia, anorexia parcial, perda de peso, e um mau desempenho as atividade físicas. Pode ocorrer uma leve anemia e esplenomegalia, relacionada à hemólise extravascular (NOGUEIRA et al., 2005). Os animais assintomáticos atuam como reservatórios dos agentes, tanto para os vetores, como para os equinos através das infecções verticais (transplacentária) e horizontais (iatrogênica) (FRIEDHOFF et al., 1990). Éguas portadoras assintomáticas que se encontrarem prenhas podem apresentar aborto ou infecção neonatal (GUIMARAES et al., 1950; LEWIS et al., 1999; GEORGES et al., 2011).

Os animais que manifestam a doença clinicamente se devem muitas vezes a resposta imunológica dos animais infectados e densidade na população de carrapatos (RETIEF, 1964; BRÜNING, 1996; FRIEDHOFF & SOULÉ, 1996; SUMBRIA et al., 2015).

Epidemiologia

A grande deficiência na busca por dados de ocorrência da doença em determinadas regiões é a dificuldade em comunicar os casos ou surtos a Organização Mundial de Saúde Animal. A comunicação entre os médicos veterinários, Conselhos Regionais, Conselhos Federais, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) têm sido essenciais para que sejam expostos o cenário atual das regiões mais acometidas pelos parasitas, e também que determinadas regiões elaborem formas de vigilâncias diferenciadas (OIE, 2013).

Tem-se estimado que na população mundial dos equinos, 90% estão relacionados a infecções por *T. equi*, no entanto em alguns países a infecção não ocorre de forma endêmica (FRIEDHOFF et al., 1990). A Tabela 1 mostra o cenário atual de ocorrência da piroplasmose equina no mundo.

Tabela 1: Levantamento de ocorrência sorológica e molecular de agentes causadores da piroplasmose equina no mundo.

Países	Diagnóstico Sorológico		Diagnóstico Molecular		Referências
	<i>Theileria equi</i>	<i>Babesia caballi</i>	<i>Theileria equi</i>	<i>Babesia caballi</i>	
ITÁLIA	39,8%	8,9%	70,3%	10,3%	Bartolomé Del Pino et al. (2016)
FRANÇA	58%	12,9%	-	-	Guidi et al. (2015)
HUNGRIA	67,9%	-	49%	-	Farkas et al. (2013)
ESPAÑA	56,1%	13,2%	-	-	García-Bocanegra et al. (2013)
HOLANDA	25%	75%	1,6%	-	Butler et al. (2012)
SUÍÇA	8,5%	4,8%	-	-	Sigg et al. (2010)
GRÉCIA	11%	2,2%	-	-	Kouam et al. (2010)
TURQUIA	12,8%	9,6%	-	-	Karatepe et al. (2009)
ÍNDIA	62,78%	47,74%	14,14%	-	Sumbria et al. (2015)
ISRAEL	-	-	-	9,3%	Rapoport et al. (2014)
PAQUISTÃO	41,2%	21,6%	-	-	Hussain et al. (2014)
CHINA	11,51%	51,16%	-	-	Wang et al. (2014)
REPÚBLICA DA CORÉIA	-	-	0,9%	-	Seo et al. (2013)
ARÁBIA SAUDITA	10,4%	7,5%	-	-	Alanazi et al. (2012)
MONGÓLIA	78,8%	65,7%	66,5%	19,1%	Rüegg et al. (2007)
JAPÃO	2,2%	5,4%	-	-	Ikadai et al. (2002)
MÉXICO	45,2%	27,9%	-	-	Cantú-Martínez et al. (2012)
VENEZUELA	50,3%	70,6%	-	-	Mujica et al. (2011)
TRINDAD E TOBAGO	33,3%	68,8%	-	-	Asgarali et al. (2007)
BRASIL (SÃO PAULO)	29,8%	68,5%	-	-	Heuchert et al. (1999)
ÁFRICA DO SUL	61%	40%	-	-	Gummow et al. (1996)
SUDÃO	-	-	35,9%	-	Salim et al. (2013)

A manutenção natural de *T. equi* até o ano de 2009 havia sido reportada em apenas duas espécies de carrapatos, *D. nitens* e *R. (B.) microplus*, localizadas na região sul dos Estados Unidos (WISE et al., 2013). No entanto, um surto de piroplasmose equina no estado do Texas encontrou-se quatro diferentes espécies de carrapatos: *A. cajennense*, *A. maculatum*, *D. nitens* e *D. variabilis*. O carrapato encontrado em maior ocorrência foi a espécie *A. cajennense*, seguido pelo *A. maculatum*, *D. variabilis*, e *D. nitens*. Até a ocorrência deste surto, a espécie *A. cajennense* não havia sido reportada disseminando *T. equi*. (ESTRADA-PENA et al., 2004; SCOLES et al., 2011; UETI et al., 2012; WISE et al., 2013).

Têm sido descritas algumas variações significativas nas taxas de prevalência de acordo com as categorias e sistemas de criação individual ou conjunta com bovinos, em diferentes regiões do Brasil (CUNHA et al., 1996; HEUCHERT et al., 1999; BOTTEON et al., 2002). Estudos soroepidemiológicos realizados em alguns estados do Brasil mostram a situação da piroplasmose equina (Tabela 2).

Tabela 2: Levantamento de frequência de anticorpos IgG para agentes causadores da piroplasmose equina em estados brasileiros.

MUNICÍPIOS	Diagnóstico Sorológico	Agentes Piroplasmas		Referências
		<i>Theileria equi</i>	<i>Babesia caballi</i>	
PARAÍBA	RIFI	59,6%	0%	Ferreira et al. (2016)
PARANÁ	cELISA	78,3%	69,2%	Vieira et al. (2013)
SÃO PAULO	TFC e ELISA	21,6%	54,1%	Kerber et al. (2009)
MINAS GERAIS	RIFI	91%	83%	Heim et al. (2007)
RIO DE JANEIRO	RIFI	73,5%	-	Botteon et al. (2002)
SÃO PAULO E MATO GROSSO DO SUL	ELISA	81%	90%	Xuan et al. (2001)
SÃO PAULO	RIFI	29,8%	68,5%	Heuchert et al. (1999)
MINAS GERAIS	RIFI	60,4%	-	Ribeiro et al. (1999)
RIO GRANDE DO SUL	RIFI	57,9%	-	Cunha et al. (1996)
RIO DE JANEIRO	RIFI	90,6%	59,4%	Pfeifer Barbosa et al. (1995)

Em estudo realizado por Barros et al. (2015) do Pantanal Mato-Grossense, municípios de Poconé e Barra do Bugre-MT, foi detectado DNA de *B. caballi* e *T. equi*, em 17 (14%) de 121 equídeos avaliados. Uma amostra do município de Poconé obteve 99% de similaridade com sequência de *B. caballi*, e 14 amostras de equinos e dois muares apresentaram-se idênticas (100%) com sequência de *T. equi* disponíveis no Genbank.

A expansão geográfica de piroplasmídeos tem relação com movimentação de seus hospedeiros, a exemplo do que ocorreu com *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* para bovinos (KUTTLER, 1988), Da mesma forma devemos considerar a dispersão dos vetores, como exemplo os carrapatos do subgênero *Boophilus* sp. que mantém *Babesia* sp. para bovinos, *Amblyomma* sp. disseminador de espécies de *Theileria* (KUTTLER, 1988; KAKOMA & MEHLHORN, 1994; MEHLHORN et al., 1994).

Diagnósticos da piroplasmose equina

Exame parasitológico em esfregaços sanguíneos

A enfermidade comumente pode ser diagnosticada por técnicas parasitológicas convencionais, como esfregaços de sangue periférico corados, além das técnicas sorológicas e moleculares (BÖSE et al., 1995; SUMBRIA et al., 2015).

O método de esfregaço sanguíneo poderá revelar a presença do parasita principalmente em infecções agudas. No entanto, nas infecções crônicas, a porcentagem da parasitemia permanece baixa, o que proporciona a ocorrência de falso-negativos (BÖSE et al., 1995; FRIEDHOFF & SOULE, 1996). Durante a infecção clínica, a porcentagem de eritrócitos parasitados por *B. caballi* se encontra abaixo de 1%, às vezes menor que 0,1%. Já em relação à *T. equi* a porcentagem de

eritrócitos parasitados se encontra normalmente entre 1 e 5%, ultrapassando os 20% em casos mais severos (DONNELLAN & MARAIS, 2009; WISE et al., 2013).

Fonseca et al. (2011) compararam o uso das técnicas de esfregaço de sangue periférico e de punção esplênica para o diagnóstico da piroplasmose em cavalos portadores subclínicos, e observaram melhores resultados com material oriundo do órgão linfóide.

Normalmente, o exame de esfregaço de sangue periférico é o primeiro método de escolha para detectar e identificar os parasitas sanguíneos de equinos (DE WAAL, 1992). No entanto, esta técnica possui uma baixa sensibilidade na detecção, devido à ocorrência de baixa parasitemia (infecções subclínicas), dificuldade na experiência do técnico e qualidade do uso dos reagentes (MYLONAKIS et al., 2003; PADDOCK & CHILDS, 2003; PASSOS et al., 2005).

Diagnóstico sorológico

Diversos trabalhos soro-epidemiológicos relacionados à piroplasmose equina têm sido realizados em todo mundo (PERSING et al., 1995; GRANDI et al., 2011; MUJICA et al., 2011; CANTÚ-MARTÍNEZ et al., 2012; STEINMAN et al., 2012) devido as dificuldades na detecção dos parasitas, tanto nas infecções agudas como nas infecções crônicas. As técnicas usualmente empregadas são ELISA e RIFI (KAPPMAYER et al., 1999; IKADAI et al., 2000; BOOZER & MACINTIRE, 2003; PASSOS et al., 2005; SUMBRIA et al., 2015).

O teste imuno-enzimático (Enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA) é um teste que permite a detecção de anticorpos específicos no plasma e soro sanguíneo (BRUNING et al., 1997; KAPPMAYER et al., 1999; IKADAI et al., 2000). Desde 2004, o cELISA (“competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay”) é um dos testes prescritos pela OIE para o transporte internacional de equinos. As proteínas para a detecção de anticorpos devem ser específicas da espécie, imunogênicas e comuns à cepa dos parasitas em diferentes localizações geográficas (BRUNING et al., 1997). A proteína recombinante purificada *histidine-tagged protein* equine merozoite antigen (His6-EMA1) utilizada no ELISA para a detecção de anticorpos anti-*T. equi* diferenciou soros de equinos infectados por *T. equi* e *B. caballii* (BALDANI et al., 2011).

A tecnologia de anticorpos monoclonais tornou possível isolar e caracterizar antígenos de importantes parasitas, incluindo *Babesia* sp. As pesquisas têm se intensificado quando se trata de piroplasmose de bovinos, as quais têm sido utilizadas para isolar proteínas com potencial de vacinação (PALMER et al., 1991; MACHADO et al., 1993).

Entretanto, ainda que os testes sorológicos tenham elevada sensibilidade, se limitam devido à baixa especificidade, reação-cruzada e limites na detecção de anticorpos (PERSING et al., 1995; BRUNING et al., 1997). Ainda, em se tratando de piroplasmose dos equinos, poucos estudos de antigenicidade têm sido realizados (PEYMANN et al., 1993; BÖSE & PEYMANN, 1994).

Diagnóstico molecular

Com os avanços da biologia molecular, muitos hemoparasitas têm sido detectados e identificados, além de ser possível caracterizá-los geneticamente (CACCIO et al., 2000; NAGORE et al., 2004). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem sido utilizada na detecção de muitas espécies de *Babesia* e *Theileria*, além de ter se mostrado com alta sensibilidade e especificidade se comparado aos testes sorológicos (GEYSEN et al., 2003; BULING et al., 2007; JEFFERIES et al., 2007; SIBEKO et al., 2008).

As PCRs convencionais, multiplex, tempo real e nested de PCR (nPCR), foram desenvolvidas ou adaptadas para o diagnóstico com primers baseados nas sequências dos genes 16S rRNA, (BASHIRUDDIN et al., 1999), EMA-1 (BATTSETSEG et al., 2001; NICOLAIEWSKY et al., 2001; FARAH et al., 2003), 48-*kDa* antigen (BC48) (BATTSETSEG et al., 2001; GÜÇLÜ & KARAER, 2007) e 18S rRNA (RAMPERSAD et al., 2003; ALHASSAN et al., 2005; BHOORA et al., 2009).

A nPCR ou a semi-nested PCR normalmente é utilizada para aumentar a sensibilidade da técnica. Na primeira etapa da nPCR um par de primers é utilizado para amplificar um fragmento de DNA genômico, onde os produtos de PCR (amplicons) são utilizados como molde para uma segunda etapa de amplificação com outros dois primers (RAMPERSAD et al., 2003; MOLINA & TOBO, 2004).

Apesar da PCR ser descrita como uma técnica de alta sensibilidade à ocorrência de variações pode existir, e algumas vezes apresentar desempenho inferior a outras técnicas de diagnóstico. Por exemplo, em estudo comparativo entre

cultivo *in vitro*, PCR e nPCR para diagnóstico em 15 equinos portadores de *T. equi* submetidos a estresse induzido por exercícios, onde recidivas de sinais clínicos se fizeram presentes, a nPCR apresentou 100% de sensibilidade, pois todos os animais foram identificados como positivos, enquanto que o cultivo *in vitro* detectou 14 animais positivos, e a PCR convencional não diagnosticou nenhum animal (BALDANI et al., 2008).

Em trabalho, Rampersad et al. (2003) também demonstraram que a nPCR possui maior sensibilidade, pois detectaram 3,6 vezes mais infecções de *T. equi* que o exame de esfregaço sanguíneo e 2,2 vezes mais que a PCR. A sensibilidade superior da nPCR em detectar infecções crônicas está relacionada as duas etapas de amplificação (BALDANI et al., 2008). No entanto, este método demanda maior tempo de execução e custo, para que a sensibilidade e especificidade permaneçam elevadas. Nesse sentido, a PCR convencional e principalmente a PCR multiplex apresentam vantagens. Essa última modalidade de PCR permite diagnosticar simultaneamente dois ou mais agentes patogênicos utilizando pares de primers específicos para cada espécie (MOLINA & TOBO, 2004). Assim como a PCR multiplex desenvolvida por Alhassan et al. (2005) apresentou alta sensibilidade e especificidade para detectar *T. equi* e *B. caballi*.

Filogenia

Análises filogenéticas tendem serem mais satisfatórias em relação análises morfológicas (ALLSOPP et al., 1994; COX, 1994; KJEMTRUP et al., 2000a, b). No entanto, com a associação entre filogenia, morfologia e biologia, as hipóteses sempre serão mais confiáveis, levando em consideração a evolução dos organismos (WOESE, 1981; COX, 1994).

A classificação dos Piroplasmida não está totalmente definida (COX, 1994), pois compoem-se de duas famílias de grande importância, Babesiidae, no qual é formada pelo gênero *Babesia* que contém cerca de 90 espécies e Theileriidae, composta pelo gênero *Theileria* com cerca de 40 espécies (LEVINE, 1988). Estudos realizados por Allsopp et al. (1994), Cox (1994) e Reichard et al. (2005), com análises de seqüências para o gene 18S rRNA, revelaram que os membros das famílias Theileriidae e Babesiidae constituem grupos monofiléticos, ou seja, ambas

as famílias são grupos-irmãos, derivados de um ancestral comum (ALLSOPP et al., 1994).

A posição filogenética de *T. equi* tem sido controversa, e o organismo foi renomeado várias vezes. *Babesia equi* foi renomeada como *T. equi* devido à descrição de um estágio linfocitário do parasita. Embora esta classificação tenha sido bem adotada, não corroborou com estudos filogenéticos. Através de análise bayesiana foi observado dois possíveis cenários: Quatro espécies de piroplasmas, (*T. parva*, *T. annulata*, *B. bovis* e *T. equi*), representariam um único gênero ou, alternativamente, essas espécies representariam três gêneros separados (MEHLHORN & SCHEIN, 1998). De fato, as análises moleculares e filogenéticas indicam uma posição de *T. equi* entre *B. bovis* e *Theileria* spp. (ALLSOPP et al., 1994; ALLSOPP & ALLSOPP, 2006; KAPPMAYER et al., 2012). Esta opção provavelmente resultaria no renomeamento de algumas taxas relacionadas incluindo *Cytauxzoon felis*, que se agrupa como o parente mais próximo de *T. equi* no estudo 18S rRNA (CRIADO-FORNELIO et al., 2003).

Bhoora et al. (2009) observaram variação na sequência do gene 18S rRNA de *T. equi*, o que possibilitou a identificação de três grupos genéticos distintos dessa espécie de hemoparasita na África do Sul. A sequência do gene 18S rRNA de *B. caballii* apresentou menor polimorfismo, que permitiu a caracterização de apenas dois grupos genéticos. A análise do gene que codifica o antígeno EMA-1 não evidenciou polimorfismo genético entre isolados de *T. equi* do Brasil ou com as sequências já disponíveis de outros isolados geográficos dessa espécie de hemoparasita (HEIM et al., 2007).

JUSTIFICATIVA

Diante deste cenário, nota-se a ocorrência de piroplasmose equina tanto em regiões endêmicas como não endêmicas e que os equinos além de toda a sua importância no trabalho, principalmente na região do Pantanal Sul Matogrossense, deve ser mais bem monitorados. O fato de estarem em contato desde os primeiros dias de vida com carrapatos, faz destes animais, sentinelas para estes vetores que carregam os piroplasmas causadores da doença. O trabalho a seguir foi elaborado segundo as normas do periódico **“Ciência Rural, Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria-RS”**.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALHASSAN, A.; PUMIDONMING, W.; OKAMURA, M.; HIRATA, H.; BATTSETSEG, B.; FUJISAKI, K.; YOKOYAMA, N.; IGARASHI, I.. Development of a single round and multiplex PCR method for the simultaneous detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in horse blood. *Veterinary Parasitology*, v. 129, p. 43-49, 2005.

ALANAZI, A.D.; ALYOUSIF, M.S.; HASSIEB, M.M. Seroprevalence study on *Theileria equi* and *Babesia caballi* antibodies in horses from central province of Saudi Arabia. *J Parasitol.* 2012 Oct;98(5):1015-7.

ALLEM, A.C. & VALLS, J.F.M. Recursos forrageiros nativos do Pantanal Mato-Grossense. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1987. 339 p. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 8).

ALLSOPP, M.T.E.P.; CAVALIER-SMITH, T.; DE WAAL, D.T.; ALLSOPP, B.A. Phylogeny and evolution of the piroplasms. *Parasitology*, v. 108, p. 147-152. 1994.

ALLSOPP, M.T. & ALLSOPP, B.A. Molecular sequence evidence for the reclassification of some *Babesia* species. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1081: 509±517. 2006.

ALLSOPP, M.T.; LEWIS, B.D.; PENZHORN, B.L. Molecular evidence for transplacental transmission of *Theileria equi* from carrier mares to their apparently healthy foals. *Vet Parasitol* 2007; 148:130–136.

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. *Vet Parasitol.* 2007 Mar 15;144(1-2):167-71.

BALDANI, C.D.; CANOLA, P.A.; NETO, J.C.L.; MACHADO, R.Z. *In vitro* culture, PCR, and nested PCR for the detection of *Theileria equi* in horses submitted to exercise. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 60, n. 3, p. 550-558, 2008.

BALDANI, C.D.; HILARIO, E.; NAKAGHI, A.C.H.; BERTOLINI, M.C.; R.Z.; MACHADO. Production of recombinant EMA-1 protein and its application for the diagnosis of *Theileria equi* using an enzyme immunoassay in horses from São Paulo State, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, Jaboticabal, v. 20, n. 1, p. 54-60, jan.-mar. 2011.

BARROS, E.M.; BRAGA, Í.A.; SANTOS, L.G.F.; ZILIANI, T.F.; MELO, A.L.T.; BORGES, A.M.C.M.; SILVA, L.G.; AGUIAR, D.M. Detecção de *Theileria equi* e *Babesia caballi* e anticorpos anti-Ehrlichia spp. em equídeos do Pantanal Mato-Grossense, Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.67, n.3, p.716-722, 2015.

BARTOLOMÉ DEL PINO, L.E.; ROBERTO, N.; VINCENZO, V.; FRANCESCA, I.; ANTONELLA, C.; LUCA, A.G.; FRANCESCO, B.; TERESA, S.M. *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses in Central-Southern Italy: Sero-molecular survey and associated risk factors. *Ticks and Tick-borne Diseases* xxx (2016) xxx–xxx.

BASHIRUDDIN, J.B.; CAMMÀ, C.; REBÊLO, E. Molecular detection of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horse blood by PCR amplification of part of the 16S rRNA gene. *Vet Parasitol* 1999; 84(1-2): 75-83.

BATTSETSEG, B.; XUAN, X.; IKADAI, H.; BAUTISTA, J.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 *Dermacentor nuttalli* adult ticks. *Int J Parasitol.* 2001 Apr;31(4):384-6.

BATTSETSEG, B.; LUCERO, S.; XUAN, X.; Claveria, F.G.; Inoue, N.; Alhassan, A.; Kanno, T.; Igarashi, I.; Nagasawa, H.; Mikami, T.; Fujisaki, K. Detection of natural infection of *Boophilus microplus* with *Babesia equi* and *Babesia caballi* in Brazilian

horses using nested polymerase chain reaction. *Vet Parasitol.* Aug 22; 107(4):351-7. 2002.

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. *Vet Parasitol*, v. 159, n. 2, p. 112-20, 2009.

BISHOP, R.; MUSOKE, A.; MORZARIA, S.; GARDNER, M.; NENE, V. *Theileria*: intracellular protozoan parasites of wild and domestic ruminants transmitted by ixodid ticks. *Parasitology* 129 Suppl: S271±283. 2004.

BOOZER, A. L. & MACINTIRE, D. K. Canine babesiosis. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, Philadelphia, v. 33, n. 4, p. 885-904, 2003.

BORGES, A.M.; SILVA, L.G.; NOGUEIRA, M.F.; OLIVEIRA, A.C.; SEGRI, N.J.; FERREIRA, F.; WITTER, R.; AGUIAR, D.M. Prevalence and risk factors for Equine Infectious Anemia in Poconé municipality, northern Brazilian Pantanal. *Res Vet Sci.* 2013 Aug;95(1):76-81.doi: 10.1016/j.rvsc.2013.02.011. Epub 2013.

BÖSE, R. & PEYMANN, P. Diagnosis of *Babesia caballi* infections in horses by enzyme-linked immunosorbent assay and Western blot. *Int. J. Parasitol.*, 24 (3): 341-346. 1994.

BÖSE, R.; JORGENSEN, W.K.; DALGLIESH, R.J.; FRIEDHOFF, K.T. & DE VOS, A.J. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Veterinary Parasitology*, 57, 61–74. 1995.

BOTTEON, P.T.; BOTTEON, R.C.C.M.; LINHARES, G.F.C.; MASSARD, C.L.; LOSS, Z. G. Seroprevalencia de *Babesia equi* en tres diferentes sistemas de criação de equinos de Brasil. *Parasitologia Latino americana*, v.57, n.3-4, p.141-145, 2002.

BOTTEON, P.T.L.; BOTTEON, R.C.C.M.; REIS, T.P.R.; MASSARD, C.L. Babesiose em cavalos atletas portadores. *Ciência Rural*, v. 35, n. 5, p. 1136-1140, 2005.

BRÜNING, A. Equine piroplasmosis an update on diagnosis, treatment and prevention. *British Veterinary Journal*, London, v.152, p.139-151,1996.

BRUNING, A.; PHIPPS, P.; POSNETT, E.; CANNING, E.U. Monoclonal antibodies against *Babesia caballi* and *Babesia equi* and their application in serodiagnosis. *Vet. Parasitol.* 68, 11–26. 1997.

BULING, A.; CRIADO-FORNELIO, A.; ASENZO, G.; BENITEZ, D.; BARBA-CARRETERO, J.C.; FLORIN-CHRISTENSEN, M. A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Vet. Parasitol.* 147, 16–25. 2007.

BUTLER, C.M.; SLOET, V.A.N.; OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, M.M.; STOUT, T.A.; VAN DER KOLK, J.H.; WOLLENBERG, L.V.; NIELEN, M.; JONGEJAN, F.; WERNERS, A.H.; HOUWERS, D.J. Prevalence of the causative agents of equine piroplasmosis in the South West of The Netherlands and the identification of two autochthonous clinical *Theileria equi* infections. *Vet J.* 2012 Aug;193(2):381-5.

CACCIO, S.; CAMMA, C.; ONUMA, M.; SEVERINI, C. The beta-tubulin gene of *Babesia* and *Theileria* parasites is an informative marker for species discrimination. *Int. J. Parasitol.* 30, 1181–1185. 2000.

CANÇADO, P.H.; PIRANDA, E.M.; MOURÃO, G.M.; FACCINI, J.L. Spatial distribution and impact of cattle-raising on ticks in the Pantanal region of Brazil by using the CO(2) tick trap. *Parasitol Res.* 2008 Jul; 103 (2):371-7.

CANTÚ-MARTÍNEZ, M.A.; SEGURA-CORREA, J.C.; SILVA-PÁEZ, M.L.; AVALOS-RAMÍREZ, R.; WAGNER, G.G. Prevalence of antibodies to *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses from northeastern Mexico. *J Parasitol.* 2012 Aug;98(4):869-70.

CEPEA. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. Estudo do Complexo do Agronegócio Cavalos. Piracicaba. 2006.

CHAUVIN, A.; MOREAU, E.; BONNET, S.; PLANTARD, O.; MALANDRIN, L. *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Veterinary Research*, v. 40, n. 2, p. 37, 2009.

CORREA, W.M.; CORREA, C.N.M.; FANTON, E.B. Aborto por babesiose fetal em equino. *Arquivo da Escola de Veterinária da UFMG*, v. 30, n. 3, p. 303-305, 1978.

COX, F.E.G. The evolutionary expansion of the sporozoa. *International Journal for Parasitology*, v. 24, p.1301-1316. 1994.

CRIADO-FORNELIO, A.; MARTINEZ-MARCOS, A.; BULING-SARANA, A.; BARBA-CARRETERO, J.C.: Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history. *Vet Parasitol* 2003, 114(3):173–194.

CUNHA, C.W.; SILVA, S.S.; PIMENTEL, C.A.; DAPPER, E. Avaliação da frequência de eqüinos soropositivos a *Babesia equi* no Jóquei Clube de Pelotas e em dois haras da zona sul do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.5, p.119-122, 1996.

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

DE WAAL, D.T. & VAN HEERDEN, J. Equine piroplasmiasis. In: COETZER, J.A.W., Tustin, R.C. (Eds.), *Infectious Diseases of Livestock*, vol. 1. Oxford University Press, New York. 1994.

DONNELLAN, C.M. & MARAIS, H.J. Equine piroplasmiasis. In: Mair TS, Hutchinson RE, eds. *Infectious Diseases of the Horse*. Cambridgeshire, England, UK: EVJ Ltd: 333–340, 2009.

ESTRADA-PEÑA, A.; VENZAL, J.M.; CARROS-BATTESTI, D.M.; ONOFRIO, V.C.; TRAJANO, E.; FIRMINO, J.V.L. Three new species of *Antricola* (Acari: Argasidae)

from Brazil, with a key for the known species in the genus. J. Parasitol. 90: 490-498. 2004.

ESTRADA-PEÑA, A.; VENZAL, J.M.; MANGOLD, A.J.; CAFRUNE, M.M.; GUGLIELMONE, A.A. The *Amblyomma maculatum* Koch, 1844 (*Acari: Ixodidae: Amblyomminae*) tick group: diagnostic characters, description of the larva of *A. parvitarsum* Neumann, 1901, 16S rDNA sequences, distribution and hosts. 2005. Syst. Parasitol. 60: 99-112.

FARAH, A.W.; HEGAZY, N.A.; ROMANY, M.M.; SOLIMAN, Y.A.; DAOUD, A.M. Molecular detection of *Babesia equi* in infection and carrier horses by polymerase chain reaction. Journal Article, v. 10, n. 2, p. 73-79, 2003.

FARKAS, R.; TÁNCZOS, B.; GYURKOVSKY, M.; FÖLDVÁRI, G.; SOLYMOSI, N.; EDELHOFER, R.; HORNOK, S. Serological and molecular detection of *Theileria equi* infection in horses in Hungary. Vet Parasitol. 2013 Feb 18;192(1-3):143-8.

FERREIRA, E.P.; VIDOTTO, O.; ALMEIDA, J.C.; RIBEIRO, L.P.; BORGES, M.V.; PEQUENO, W.H.; STIPP, D.T.; DE OLIVEIRA, C.J.; BIONDO, A.W.; VIEIRA, T.S.; VIEIRA, R.F. Serological and molecular detection of *Theileria equi* in sport horses of northeastern Brazil. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2016 Aug;47:72-6.

FONSECA, L.A.; TEIXEIRA NETO, A.R.; FONSECA, E.F.; SILVA, A.M.G.B.; LIMA, E.M.M.; GODOY, R.F. Comparative study of smears of spleen and peripheral blood for diagnosis of babesiosis in horses. Ars Veterinaria, 27(4): 211-215, 2011.

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

FRIEDHOFF, K.T.; TENTER, A.M.; MÜLLER, I. Haemoparasites of equines: Impact on international trade of horses. Rev Sci Tech 1990; 9:1187-1194.

FRIEDHOFF, K.T. & SOULE, C. An account on equine babesioses. *Rev Sci Tech*, 15: 1191–1201, 1996.

GARCIA-BOCANEGRA, I.; ARENAS-MONTES, A.; HERNANDEZ, E.; ADASZEK, L.; 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*, 195, 172–8. 2013.

GEYSEN, D.; DELESPAUX, V.; GEERTS, S. PCR-RFLP using *Ssu*-rDNA amplification as an easy method for species-specific diagnosis of *Trypanosoma* species in cattle. *Vet. Parasitol.* 110, 171–180. 2003.

GEORGES, K.C.; EZEOKOLI, C.D.; SPARAGANO, O.; PARGASSA, I.; CAMPBELLA, M.; D'ABADIEA, R.; YABSLEYD, M. J. A case of transplacental transmission of *Theileria equi* in a foal in Trinidad. *Vet Parasitol* 2011; 175:363–366.

GODOI FILHO, J.D. Aspectos geológicos do Pantanal Mato-Grossense e de sua área de influência. In: Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal, 1., 1984. Corumbá. Anais. Brasília: EMBRAPA-DDT, 1986. p.63-76. (EMBRAPA-CPAP. Documentos, 5).

GERSTENBERG, C.; ALLEN, W.R.; PHIPPS, L.P. The mechanical transmission of *Babesia equi* infection in a British herd of horses. In: Proceedings of the Eighth International Conference on Equine Infectious Diseases. Dubai, United Arab Emirates, 1998:100.

GOHIL, S.; HERRMANN, S.; GUNTHER, S.; COOKE, B.M. Bovine babesiosis in the 21st century: advances in biology and functional genomics. *Int J Parasitol* 43: 125±132. 2013.

GRANDI, G.; MOLINARI, G.; TITTARELLI, M.; SASSERA, D. Kramer, L.H. Prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infection in horses from northern Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11, 955–956. 2011.

GUGLIELMONE, A.A.; BECHARA, G.H.; SZABÓ, M.P.J.; BARROS-BATTESTI, D.M.; FACCINI, J.L.H.; LABRUNA, M.B.; DE LA VEGA, R.; ARZUA, M.; CAMPOS PEREIRA, M.; FURLONG, J.; MANGOLD, A.J.; MARTINS, J.R.; RODRÍGUEZ, M.; SERRA-FREIRE, N.M.; VENZAL, J.M. Ticks of importance for domestic animals in Latin America and Caribbean countries. Com versão simultânea em espanhol, português e inglês. Impresso em disco compacto pelo International Consortium on Ticks and Tick-Borne Diseases-2 of the European Commission INCO-DEV programme. 2004.

GUIDI, E.; PRADIER, S.; LEBERT, I.; LEBLOND, A. Piroplasmosis in an endemic area: analysis of the risk factors and their implications in the control of Theileriosis and Babesiosis in horses. *Parasitol Res.* 2015 Jan;114(1):71-83.

GUIMARÃES, L.M.; ARAÚJO, T.L.; DE LACERDA JR., P.M.G. Ocorrência de nuttalliose em equinos puro sangue de corrida em São Paulo. *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária de São Paulo, São Paulo*, v. 4, p. 357-362, 1950.

GUIMARÃES, A.M.; LIMA, J.D.; RIBEIRO, M.F.; CAMARGOS, E.R.; BOZZI, I.A. Ultrastructure of sporogony in *Babesia equi* in salivary glands of adult female *Boophilus microplus* ticks. *Parasitol Res.* 1998; 84(1):69-74.

GÜÇLÜ, H.Z. & KARAER, K.Z. [Detection of *Babesia caballi* (Nuttall, 1910) and *Theileria equi* (Syn. *Babesia equi*, Laveran, 1901) by the polymerase chain reaction (PCR) in show and sport horses in the region of Ankara]. *Turkiye Parazitoloj Derg.* 2007;31(2):89-93. Turkish.

GUMMOW, B.; DE WET, C.S.; DE WAAL, D.T. A sero-epidemiological survey of equine piroplasmosis in the northern and eastern Cape Provinces of South Africa. *J S Afr Vet Assoc.* 1996 Dec;67(4):204-8.

HEIM, A.; PASSOS, L.M.; RIBEIRO, M.F.; COSTA-JÚNIOR, L.M.; 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. *Parasitol Res.* 2007 Dec;102(1):63-8.

HEUCHERT, C.M.S.; GIULLI Jr., V.; ATHAIDE, D.F.; BÖSE, R.; FRIEDHOFF, K.T. Seroepidemiologic studies on *Babesia equi* and *Babesia caballi* infections in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.85, p.1-11, 1999.

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

HUSSAIN, M.H.; SAQIB, M.; RAZA, F.; MUHAMMAD, G.; ASI, M.N.; MANSOOR, M.K.; SALEEM, M.; JABBAR, A. Seroprevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in five draught equine populated metropolises of Punjab, Pakistan. *Vet Parasitol.* 2014 May 28; 202(3-4):248-56.

IKADAI, H.; OSORIO, C.R.; XUAN, X.; IGARASHI, I.; KANEMARU, T.; NAGASAWA, H.; FUJISAKI, K.; SUZUKI, N.; MIKAMI, T. Detection of *Babesia caballi* infection by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant 48-kDa merozoite rhoptry protein. *Int. J. Parasitol.* 30, 633–635. 2000.

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. *J Vet Med Sci.* 2002 Apr;64(4):325-8.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Pecuária Municipal. IBGE, 38: 39, 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>> Acesso em: 01/04/2016.

IRWIN, P.J. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasit. Vectors* 2 (Suppl. 1), S4, <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-2-S1-S4>. 2009.

JEFFERIES, R.; RYAN, U.M.; IRWIN, P.J. PCR-RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. *Vet. Parasitol.* 144, 20–27. 2007.

JUNK, W.J.; CUNHA, C.N.; WANTZEN, K.M.; PETERMANN, P.; STRUSSMANN C.; MARQUES, M.I.; ADIS, J. Biodiversity and its conservation in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil. *Aquat Sci.* 68: 278-309. 2006.

KAKOMA, I. & MEHLHORN, H. *Babesia* of domestic animals. In: KREIER, J. P. *Parasitic Protozoa*. 2^a edition, Vol. 7. Academic Press, New York. 1994. p. 141-216.

KAPPMAYER, L.S.; PERRYMAN, L.E.; HINES, S.A.; BASZLER, T.V.; KATZ, J.B.; HENNAGER, S.G.; KNOWLES, D.P. Detection of equine antibodies to *Babesia caballi* by recombinant *B. caballi* rhoptry-associated protein 1 in a competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2285–2290. 1999.

KAPPMAYER, L.S.; THIAGARAJAN, M.; HERNDON, D.R.; RAMSAY, J.D.; CALER, E.; DJIKENG, A.; GILLESPIE, J.J.; LAU, A.O.; ROALSON, E.H.; SILVA, J.C.; SILVA, M.G.; SUAREZ, C.E.; UETI, M.W.; NENE, V.M.; MEALEY, R.H.; KNOWLES, D.P.; BRAYTON, K.A. Comparative genomic analysis and phylogenetic position of *Theileria equi*. *BMC Genomics*. 2012 Nov 9;13:603.

KARATEPE, B.; KARATEPE, M.; ÇAKMAK, A.; KARAER, Z.; ERGÜN, G. Investigation of seroprevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses in Niğde province, Turkey. *Trop Anim Health Prod.* 2009 Jan; 41(1):109-13.

KERBER, C.E.; LABRUNA, M.B.; FERREIRA, F.; DE WAAL, D.T.; KNOWLES, D.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of equine Piroplasmosis and its association with tick infestation in the State of São Paulo, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* (Online) vol.18 no.4 Jaboticabal Oct./Dec. 2009.

KJEMTRUP, A.M.; THOMFORD, J.; ROBINSON, T.; CONRAD, P.A. Phylogenetic relationships of human and wildlife piroplasm isolates in the Western United States inferred from the 18S nuclear small subunit RNA gene. *Parasitology*, v. 120, p. 487-493. 2000a.

KJEMTRUP, A.M.; KOCAN, A.A.; WHITWORTH, L.; MEINKOTH, J.; BIRKENHEUER, A.J.; CUMMINGS, J.; BOUDREAUX, M.K.; STOCKHAM, S.L.; IRIZARRY-ROVIRA, A.; CONRAD, P.A. There are at least three genetically distinct small piroplasms from dogs. *International Journal for Parasitology*, v. 30, p. 1501-1505. 2000b.

KNOWLES, D.P.JR.; KAPPMAYER, L.S.; STILLER, D.; HENNAGER, S.G.; PERRYMAN, L.E. Antibody to a recombinant merozoite protein epitope identifies horses infected with *Babesia equi*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.30, p.3122-3126, 1992.

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. *Vet. Parasitol.* 169 (3-4), 273-278. 2010.

KUTTLER, K.L. World-wide impact of babesiosis. In: RISTIC, M. *Babesiosis of Domestic Animals and Man*. CRC Press, Boca Raton. 1988. p. 1-22.

LABRUNA M.B.; LEITE, R.C.; OLIVEIRA GOBESSO, A.A.; GENNARI, S.M.; KASAI, N. Controle estratégico do carrapato *Amblyomma cajennense* em equinos. *Cien. Rural* 34: 195-200. 2004.

LACK, J.B.; REICHARD, M.V.; VAN DEN BUSSCHE, R.A. Phylogeny and evolution of the Piroplasmida as inferred from 18S rRNA sequences. *International Journal for Parasitology* 42: 353±363. 2012.

LEVINE, N.D. *The Protozoan Phylum Apicomplexa*. Vol. 2. CRC Press, Boca Raton. 1988. 154 p.

LEWIS, B.D.; PENZHORN, B.L.; VOLKMANN, D.H. Could treatment of pregnant mares prevent abortions due to equine piroplasmosis? *J S Afr Vet Assoc* 1999; 70:90–91.

MACHADO, R.Z.; MCELWAIN, T.F.; SUAREZ, C.E.; HINES, S.A. & PALMER, G.H. *Babesia bigemina*: isolation and characterization of merozoite rhoptries. *Exp. Parasitol.*, 77:315-325. 1993.

MAURER, F.D. Equine piroplasmosis—Another emerging disease. *J Am Vet Med Assoc* 1962; 141:699–702.

MEHLHORN, H.; SCHEIN, E.; AHMED, J.S. *Theileria*. In: KREIER, J. P. *Parasitic Protozoa*. 2^a edition, Vol. 7. Academic Press, New York. 1994. p. 217-304.

MEHLHORN, H. & SCHEIN, E. Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein 1998. *Parasitol Res.* 1998; 84:467–475.

MEINKOTH, J.H. & KOCAN, A.A. Feline cytauxzoonosis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 35: 89±101, vi. 2005.

MOLINA, A.L. & TOBO, P.R. Serie - Biología molecular, Atualização, Parte 2 – Uso das técnicas de biología molecular par diagnóstico. *Eistein*, v 2, n. 2, p.139, 2004.

MUJICA, F.F.; PERRONE, T.; FORLANO, M.; CORONADO, A.; MELÉNDEZ, R.D.; BARRIOS, N.; ALVAREZ, R.; GRANDA, F. Serological prevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in horses of Lara State, Venezuela. *Vet Parasitol.* 2011 May 31;178(1-2):180-3.

MYLONAKIS, M.E.; KOUTINAS, A.F.; BILLINIS, C.; LEONTIDES, L.S.; KONTOS, V.; PAPADOPOULOS, O.; RALLIS, T.; FYTIANOU, A. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. *Veterinary Microbiology, Amsterdam*, v. 91, n. 2-3, p. 197-204, 2003.

NAGORE, D.; GARCIA-SANMARTIN, J.; GARCIA-PEREZ, A.L.; JUSTE, R.A.; HURTADO, A. Detection and identification of equine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blotting: epidemiological survey and phylogenetic analysis. *Vet. Parasitol.* 123, 41–54. 2004.

NAVA, S.; BEATI, L.; LABRUNA, M.B.; CÁCERES, A.G.; MANGOLD, A.J.; GUGLIELMONE, A.A. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844, and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). Ticks Tick Borne Dis. 2014 Apr;5(3):252-76.

NAVARETE, I.; SERRANO, F.; REINA, D. Babesiosis. In: CORDERO-DEL-CAMPILLO, M.; ROJO-VAZQUEZ, F.A.; FERNANDEZ, A.R.M.; ACEDO, M.C.S.; RODRIGUEZ, S.H.; LOPEZ-COZAR, I.N.; BAÑOS, P.D.; ROMERO, H.Q.; VARELA, M.C. Parasitologia Veterinária. P. 587- 592. Madrid McGraw Hill-Interamericana de España, 1999.

NICOLAIEWSKY TB, RICHTER MF, LUNGE VR, CUNHA CW, DELAGOSTIN O, IKUTA N, FONSECA AS, DA SILVA SS, OZAKI LS. Detection of *Babesia equi* (Laveran, 1901) by nested polymerase chain reaction. Vet Parasitol. 2001 Oct31;101(1):9-21.

NIZOLI, L.Q. Alterações hematológicas e humorais de equinos expostos à infecção por *Babesia equi*, na região sul do Rio Grande do Sul. Dissertação apresentada na Universidade Federal de Pelotas. 2005.

NOGUEIRA, C.E.W.; SILVA, S.S.; NIZOLI, L.Q.; RIBAS, L.M.; ALBUQUERQUE, L.P.A.N. Efeito quimioprolático do dipropionato de imidocarb na prevenção da agudização de babesiose equina em cavalos portadores da infecção. A Hora Veterinária, v. 25, n. 146, 2005.

NUÑEZ, J.L.; MUÑOZ, M.E.; MOLTEDO, H.L. *Boophilus microplus*. The common cattle tick. Berlin: Spriger-Verlag, 204 p. 1985.

OIE. Website. Available at: <http://www.oie.int>. Updated: 2013. April 1, 2013.

PADDOCK, C.D. & CHILDS, J.E. *Ehrlichia chaffeensis*: a prototypical emerging pathogen. Clinical Microbiology Reviews, Washington, v. 16, n. 1, p. 37-64, 2003.

PALMER, G.H.; MCELWAIN, T.F.; PERRYMAN, L.E.; DAVIES, W.C.; REDUKER, D.R.; JASMER, D.P.; SHKAP, V.; PIPANO, E.; GOFF, W.L. & MCGUIRE, T.C. Strain variation of *Babesia bovis* merozoite surface-exposed epitopes. *Infect. Immun.*, 59 (9): 3340-3342. 1991.

PARREIRA, D.R.; JANSEN, A.M.; ABREU, U.G.; MACEDO, G.C.; SILVA, A.R.; MAZUR, C.; ANDRADE, G.B.; HERRERA, H.M. Health and epidemiological approaches of *Trypanosoma evansi* and equine infectious anemia virus in naturally infected horses at southern Pantanal. *Acta Trop. Nov*; 163:98-102. 2016.

PASSAMONTI, F.; VERONESI, F.; CAPPELLI, K.; CAPOMACCIO, S.; ET AL. *Anaplasma phagocytophilum* in horses and ticks: a preliminary survey of Central Italy. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2010; 33:73–83.

PASSOS, L.M.F.; GEIGER, S.M.; RIBEIRO, M.F.B.; PFISTER, K.; ZAHLER-RINDER, M. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 127, n. 1, p. 81-85, 2005.

PEYMANN, B.; BÖSE, R. & FRIEDHOFF, K.T. Development of an ELISA and Western blot for the diagnosis of *Babesia caballi* infections in horses and comparison with immunofluorescence antibody test (IFAT) and complement fixation test (CFT). 14th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology Cambridge, UK. 1993.

PERSING, D.H.; HERWALDT, B.L.; GLASER, C. Infection with a *Babesia* like organism in northern California. *N Engl J Med* 1995; 332(5):298-303.

PFEIFER, B.I.; BOSE, R.; PEYMANN, B.; FRIEDHOFF, K.T. Epidemiological aspects of equine babesioses in a herd of horses in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.58, p.1-8, 1995.

PHIPPS, L.P. & OTTER, A. Transplacental transmission of *Theileria equi* in two foals born and reared in the United Kingdom. *Vet Rec* 2004; 154:406–408.

POTGIETER, F.T.; DE WAAL, D.T.; POSNETT, E.S. Transmission and diagnosis of equine babesiosis in South Africa. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 87, 139–142. 1992.

RAMOS, V.doN.; OSAVA, C.F.; PIOVEZAN, U.; SZABÓ, M.P. Complementary data on four methods for sampling free-living ticks in the Brazilian Pantanal. Rev Bras Parasitol Vet. 2014. Dec; 23(4):516-21.

RAMPERSAD, J.; CESAR, E.; CAMPBELL, M.D.; SAMLAL, M.; AMMONS, D. A field evaluation of PCR for the routine detection of *Babesia equi* in horses. Vet Parasitol. 2003 May 30;114(2):81-7.

RAPOPORT, A.; AHARONSON-RAZ, K.; BERLIN, D.; TAL, S.; GOTTLIEB, Y.; KLEMENT, E.; STEINMAN, A. Molecular characterization of the *Babesia caballi* rap-1 gene and epidemiological survey in horses in Israel. Infect Genet Evol. 2014 Apr; 23:115-20.

REICHARD, M.V.; BUSSCHE, R.A.V.D.; MEINKOTH, J.H.; HOOVER, J.P.; KOCAN, A.A. A new species of *Cytauxzoon* from Pallas' cats caught in Mongolia and comments on the systematics and taxonomy of Piroplasmids. Journal of Parasitology, v. 91, n. 2, p. 420-426. 2005.

RETIEF, G.P. A comparison of equine piroplasmosis in South Africa and the United States. J. Am. vet. med. Ass. 145, 912-16. 1964.

RIBEIRO, M.F.; COSTA, J.O.; GUIMARÃES, A.M. Epidemiological aspects of *Babesia equi* in horses in Minas Gerais, Brazil. Veterinary Research Communications, v.23, p.385-390, 1999.

RONCATI, N.V. Ocorrência de *Theileria equi* congênita em potros Puro Sangue Lusitano no Brasil, diagnosticada através da técnica RT-PCR. 69f. (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo. 2006.

ROTHSCHILD, C. & KNOWLES, D. Equine piroplasmiasis. In Equine Infectious Diseases, ed. Sellon DC, Long MT. Saunders, Elsevier, St. Louis, MO. 2007; 465-473.

ROTHSCHILD, C.M. Equine piroplasmiasis. J. Equine Vet. Sci. 33, 497-508. 2013.

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 PCR prevalence data from domestic horses and ticks. Parasitology. 134, 939-398 947. 2007.

SALIM, B.; BAKHEIT, M.A.; KAMAU, J.; SUGIMOTO, C. Current status of equine piroplasmiasis in the Sudan. Infect Genet Evol. 2013 Jun;16:191-9.

SANTOS, S. A; M.C.M. MAZZA; J.R.B. SERENO; U.G.P. ABREU AND J.A. SILVA. Avaliação e conservação do cavalo Pantaneiro. Corumbá: EMBRAPA-CPAP, 1995. 40 p.il. (EMBRAPA-CPAP. Circular Técnica, 21).

SCHEIN, E. Equine babesiosis. In: Ristic M, ed. Babesiosis of Domestic Animals and Man. Boca Raton, FL: CRC; 1988:197–208.

SCOLES, G.A.; HUTCHESON, H.J.; SCHLATER, J.L.; HENNAGER, S.G.; PELZEL, A.M.; KNOWLES, D.P. Equine piroplasmiasis associated with *Amblyomma cajennense* Ticks, Texas, USA. Emerg Infect Dis. 2011 Oct; 17(10):1903-5.

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

SCOLES, G. & UETI, M.W. Vector ecology of equine piroplasmiasis. Annu. Rev. Entomol. 60, 561–580, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-021110>. 2015.

SEO, M.G.; YUN, S.H.; CHOI, S.K.; CHO, G.J.; PARK, Y.S.; CHO, K.H.; KWON, O.D.; KWAK, D. Molecular and phylogenetic analysis of equine piroplasms in the Republic of Korea. *Res Vet Sci.* 2013 Jun; 94(3):579-83.

SCHNITTGER, L.; RODRIGUEZ, A.E.; FLORIN-CHRISTENSEN, M.; MORRISON, D.A.: *Babesia*: A world emerging. *Infect Genet Evol* 2012, 12(8):1788–1809.

SHORT, M.A.; CLARK, C.K.; HARVEY, J.W.; WENZLOW, N.; HAWKINS, I.K.; ALLRED, D.R.; KNOWLES, D.P.; CORN, J.L.; GRAUSE, J.F.; HENNAGER, S.G.; KITCHEN, D.L.; TRAUB-DARGATZ, J.L. Outbreak of equine piroplasmosis in Florida. *J Am Vet Med Assoc.* 2012 Mar 1;240(5):588-95.

SIBEKO, K.P.; OOSTHUIZEN, M.C.; COLLINS, N.E.; GEYSEN, D.; RAMBRITCH, N.E.; LATIF, A.A.; GROENEVELD, H.T.; POTGIETER, F.T.; COETZER, J.A.W. Development and evaluation of a real-time polymerase chain reaction test for the detection of *Theileria parva* infections in Cape buffalo (*Syncerus caffer*) and cattle. *Vet. Parasitol.* 155, 37–48. 2008.

SIGG, L.; GERBER, V.; GOTTSTEIN, B.; DOHERR, M.G.; FREY, C.F. Seroprevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in the Swiss horse population. *Parasitol Int.* 2010 Sep; 59(3):313-7.

SIMPSON, C.F. & NEAL, F.C. Ultrastructure of *Babesia equi* in ponies treated with imidocarb. *Am J Vet Res* 1980; 41:267–271.

SILVA, R.A.M.S.; DE ABREU, U.G.P.; BARROS, A.T.M. Anemia Infecciosa Eqüina: Epizootiologia, Prevenção e Controle no Pantanal. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2001. 30p. (Embrapa Pantanal. Circular Técnica, 29).6y

SOLANO-GALLEGO, L. & BANETH, G. Babesiosis in dogs and Cats Expanding parasitological and clinical spectra. *Veterinary Parasitology* 181: 48±60. 2011.

SONENSHINE, D.E. *Biology of Ticks*. New York, NY: Oxford University Press; 1991.

STEINMAN, A.; ZIMMERMAN, T.; KLEMENT, E.; LENSKY, I.M.; BERLIN, D.; GOTTLIEB, Y.; BANETH, G. Demographic and environmental risk factors for infection by *Theileria equi* in 590 horses in Israel. *Vet. Parasitol.* 187, 558–562. 2012.

STILLER, D. & COAN, M.E. Recent developments in elucidating tick vector relationships for anaplasmosis and equine piroplasmosis. *Veterinary Parasitology*, v.57, p.97-108, 1995.

STILLER, D.; GOFF, W.L.; JOHNSON, L.W.; KNOWLES, D.P. *Dermacentor variabilis* and *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae): Experimental vectors of *Babesia equi* to equids. *Journal of Medical Entomology*, v.39, p.667-670, 2002.

SUMBRIA, D.; DAS SINGLA, L.; SHARMA, A. *Theileria equi* and *Babesia caballi* infection of equids in Punjab, India: a serological and molecular survey. *Trop Anim Health Prod.* 2015. Jan; 48(1):45-52.

TORINA, A.; VICENTE, J.; ALONGI, A.; SCIMECA, S.; ET AL. Observed prevalence of tick-borne pathogens in domestic animals in Sicily, Italy during 2003–2005. *Zoonoses Public Health* 2007; 54:8–15.

UETI, M.W.; PALMER, G.H.; SCOLES, G.A.; KAPPMAYER, L.S.; KNOWLES, D.P. Persistently infected horses are reservoirs for intrastadial tick-borne transmission of the Apicomplexan Parasite *Babesia equi*. *Infection and Immunity*, v. 76, p. 3525-3529, 2008.

UETI, M.W.; MEALEY, R.H.; KAPPMAYER, L.S.; WHITE, S.N.; KUMPULA-MCWHIRTER, N.; PELZEL, A.M.; GRAUSE, J.F.; BUNN, T.O.; SCHWARTZ, A.; TRAUB-DARGATZ, J.L.; HENDRICKSON, A.; ESPY, B.; GUTHRIE, A.J.; FOWLER, W.K.; KNOWLES, D.P. Re-emergence of the apicomplexan *Theileria equi* in the United States: elimination of persistent infection and transmission risk. *PLoS One.* 2012;7(9):e44713.

UILENBERG, G. *Babesia*—A historical overview. *Vet Parasitol.* 2006; 138:3–10.

United States Department of Agriculture APHIS National Center for Risk Analysis. Equine piroplasmosis domestic pathways assessment 2011: Pathways assessment for the spread of the causative agents of equine piroplasmosis from the movement of a horse from a quarantined premises within the contiguous United States Updated December 2011. Available at: http://www.aphis.usda.gov/animal_health/emergingissues/downloads/epdomesticpathwaysfinalapril11.pdf. Accessed February 12, 2013.

URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.L.; DUNCAN, J.L.; DUNN, A.M.; JENNINGS, F.W. Parasitologia veterinária. (2^a ed.). Scotland: Blackwell Science Ltd. 1996.

VAN HEERDEN, J. Equine babesiosis in South Africa: a report of two cases. Equine Veterinary Education, v.8, n.1, p.3-5, 1996.

VANNIER, E.G.; DIUK-WASSER, M.A.; BEN MAMOUN, C.; KRAUSE, P.J. Babesiosis. Infect Dis Clin North Am 29: 357±370. 2015.

VIEIRA, T.S.; VIEIRA, R.F.; FINGER, M.A.; NASCIMENTO, D.A.; SICUPIRA, P.M.; DUTRA, L.H.; DECONTO, I.; BARROS-FILHO, I.R.; DORNBUSCH, P.T.; BIONDO, A.W.; VIDOTTO, O. Seroepidemiological survey of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses from a rural and from urban areas of Paraná State, southern Brazil. Ticks Tick Borne Dis. 2013 Dec; 4(6):537-41

WANG, M.; GUO, W.; IGARASHI, I.; XUAN, X.; WANG, X.; XIANG, W.; JIA, H. Epidemiological investigation of equine piroplasmosis in China by enzyme-linked immunosorbent assays. J Vet Med Sci. 2014 Apr; 76(4):549-52.

WISE, L.N.; KAPPMAYER, L.S.; MEALEY, R.H.; KNOWLES, D.P. Review of equine piroplasmosis. J Vet Intern Med, 27(6): 1334-46, 2013.

WOESE, C.R. Archaeobacteria. Scientific American, v. 244, n. 6, p. 98-122. 1981.

XUAN, X.; NAGAI, A.; BATTSETSEG, B.; FUKUMOTO, S.; MAKALA, L.H.; INOUE, N.; IGARASHI, I.; MIKAMI, T.; FUJISAKI, K. Diagnosis of equine piroplasmosis in

Brazil by serodiagnostic methods with recombinant antigens. *Journal of Veterinary Medical Science*, v.63, p.1159-1160, 2001.

ZAPF, F. & SCHEIN, E. The development of *Babesia (Theileria) equi* (Laveran, 1901) in the gut and the haemolymph of the vector ticks. *Hyalomma* species. *Parasitol Res* 1994; 80: 297–302.

ZOOPA, R.; ARDU, M.; NICCOLINI, S.; CHESSA, B.; MANNA, L.; COCCO, R.; PAPPAGLIA, M.L.P. Clinical and Laboratory Findings in Equine Piroplasmiasis. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 28, n.5, p. 301-308, 2008.

1 Fatores Determinantes para a ocorrência de piroplasmose equina no Pantanal Sul

2 Matogrossense

3 Determining factors for the occurrence of equine piroplasmosis in the Pantanal Sul

4 Matogrossense

5 João Bosco Vilela Campos^I, Luiz Ricardo Gonçalves^{II}, Carla Roberta Freschi^{II}, Filipe Martins
6 Santos^I, Carina Elisei de Oliveira^I, Alinne Pereira de Castro^I, Gisele Braziliano de Andrade^I,
7 Gabriel Carvalho Macedo^I, Rosângela Zacarias Machado^{II}, Marcos Rogério André^{II}, Heitor
8 Miraglia Herrera^I

10 RESUMO

11 Piroplasmose equina é uma doença infecciosa causada por protozoários
12 intracelulares, *Babesia caballi* e *Theileria equi*, acometidos por carrapatos ixodídeos.
13 Objetivou-se identificar a ocorrência de piroplasmose equina, associando a presença de
14 carrapatos e alguns aspectos hematológicos entre diferentes categorias de equinos do Pantanal
15 Sul Matogrossense. Foram colhidas amostras de sangue total e soro de 170 animais de
16 diferentes idades e categorias. No momento da coleta foram realizados esfregaços de sangue
17 periférico dos animais e coletas de carrapatos para identificação taxonômica e exame
18 parasitológico na hemolinfa e ovos. Os valores hematológicos foram realizados para
19 investigar a presença de anemia nos animais. Para as análises sorológicas foi realizado o teste
20 ELISA com antígeno recombinante de *B. caballi* e o antígeno total para *T. equi*. A detecção
21 molecular foi realizada utilizando-se primers para piroplasmídeos dos equinos. A filogenia foi
22 realizada a partir de três nPCR e posterior sequenciamento. Os resultados sorológicos
23 mostraram que 61,8% e 52,9% dos equinos estão expostos a *T. equi* e *B. caballi*,
24 respectivamente. A PCR detectou a infecção de piroplasmídeos de equinos em 43,5% dos
25 animais. O sequenciamento revelou 98-100% de identidade com sequências previamente

1 publicadas no Genbank para *T. equi*. Todos os animais foram negativos aos esfregaços de
2 sangue periférico, assim como nos testes de hemolinfa e ovos nos carrapatos. Foram
3 encontrados 51,2% dos equinos infestados por carrapatos das espécies *Dermacentor nitens*,
4 *Amblyomma sculptum* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Os valores hematológicos
5 mostraram que os animais apresentam infecções subclínicas. A piroplasmose equina é
6 endêmica na região do Pantanal Sul Matogrossense sendo que os animais podem ser
7 considerados sentinelas para os agentes e devem ser mais bem monitorados.

8 **Palavras – Chave:** *Babesia caballi*; diagnóstico molecular; Pantanal; sorologia; *Theileria*
9 *equi*.

10

11 **ABSTRACT**

12 Equine piroplasmosis is an infectious disease caused by intracellular protozoa, *Babesia*
13 *caballi* and *Theileria equi*, afflicted by ixodidae ticks. The objective of this study was to
14 identify the occurrence of equine piroplasmosis, associating the presence of ticks and some
15 hematological aspects among different equine categories of the Pantanal Sul Matogrossense.
16 Samples of whole blood and serum of 170 animals of different ages and categories were
17 collected. At the time of collection, peripheral blood smears were collected from the animals
18 and collected from ticks for taxonomic identification and parasitological examination on
19 hemolymph and eggs. The hematological values were performed to investigate the presence
20 of anemia in the animals. For the serological analyzes, the ELISA test with recombinant *B.*
21 *caballi* antigen and the total antigen for *T. equi* were performed. Molecular detection was
22 performed using primers for equine piroplasmids. Phylogeny was performed from three nPCR
23 and subsequent sequencing. The serological results showed that 61.8% and 52.9% of the
24 horses are exposed to *T. equi* and *B. caballi*, respectively. PCR detected the infection of
25 equine piroplasmids in 43.5% of the animals. Sequencing revealed 98-100% identity with

1 sequences previously published in Genbank for *T. equi*. All animals were negative to
2 peripheral blood smears, as were hemolymph and egg ticks. 51.2% of equine infested by ticks
3 of the species *Dermacentor nitens*, *Amblyomma sculptum* and *Rhipicephalus (Boophilus)*
4 *microplus* were found. Haematological values showed that the animals presented subclinical
5 infections. Equine piroplasmosis is endemic in the South Pantanal region where animals can
6 be considered sentinels for agents and should be better monitored.

7 **Key - words:** *Babesia caballi*; molecular diagnostics; Pantanal; serology; *Theileria equi*.

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24 ^I Programa de Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária, Universidade Católica Dom Bosco –
25 (UCDB), Campo Grande, MS, Brasil. 79117-900, Campo Grande, MS, Brasil. E-mail:
26 bjoaocampos@gmail.com. Autor para correspondência.

27 ^{II} Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias –
28 (UNESP).

1 INTRODUÇÃO

2 A piroplasmose equina é uma doença infecciosa de ocorrência mundial causada por
3 protozoários parasitas de células sanguíneas, *Babesia caballi* e *Theileria equi*, transmitidos
4 por carrapatos ixodídeos. É considerada uma doença de maior impedimento para o trânsito
5 internacional de cavalos, causando importantes perdas econômicas (FRIEDHOFF et al., 1990;
6 RONCATI, 2006; SCHNITTGER et al., 2012; SHORT et al., 2012; WISE et al., 2013;
7 SCOLES & UETI, 2015).

8 A doença pode causar perdas econômicas significativas no sistema de produção de
9 equinos globalmente. A espécie *T. equi* é considerada mais virulenta do que *B. caballi*, e os
10 sinais clínicos da piroplasmose equina são muitas vezes não específicos, impedindo o
11 diagnóstico preciso (FRIEDHOFF et al., 1990; POSNETT et al., 1991; MEHLOM &
12 SCHEIN, 1998). Tanto *B. caballi* como *T. equi* são responsáveis por causar uma doença
13 hemolítica, caracterizada por pirexia, anemia hemolítica, icterícia, hemoglobinúria,
14 bilirrubinúria, hepatomegalia, esplenomegalia e, em casos mais avançados, morte (DE
15 WAAL, 1992). Muitos animais tornam-se portadores crônicos, servindo de fonte de infecção
16 para os carrapatos (FRIEDHOFF et al., 1990; RONCATI, 2006; SCHNITTGER et al., 2012;
17 SHORT et al., 2012; WISE et al., 2013; SCOLES & UETI, 2015).

18 No Brasil, *B. caballi* é mantida pela espécie *Dermacentor nitens* de forma
19 transovariana (ROBY & ANTHONY, 1963; ROCANTI, 2006; UETI et al., 2008; KERBER
20 et al., 2009), enquanto *T. equi* é mantida por *Amblyomma sculptum* (*A. cajennense*) de
21 forma transestadial (ROCANTI, 2006; UETI et al., 2008; KERBER et al., 2009; NAVA et al.,
22 2014). Além disso, algumas evidências sugerem que *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*
23 está associado à infecção por *T. equi* (BATTSETSEG et al., 2002).

24 A classificação dos Piroplasmida não está totalmente definida (COX, 1994), pois
25 compoem-se de duas famílias de grande importância, Babesiidae, no qual é formada pelo

1 gênero *Babesia* e Theileriidae, composta pelo gênero *Theileria* (LEVINE, 1988). A posição
2 filogenética de *T. equi* tem sido controversa, e o organismo foi renomeado várias vezes.
3 *Babesia equi* foi renomeada como *T. equi* devido à descrição de um estágio linfocitário do
4 parasita. Embora esta classificação tenha sido bem adotada, não corroborou com estudos
5 filogenéticos.

6 O gene 18S rRNA é amplamente utilizado como marcador genético e análise
7 filogenética de piroplasmas devido à sua baixa taxa de substituição e ocorrência em múltiplas
8 cópias (HUNFELD et al., 2008). Entretanto, estudos filogenéticos incluindo genes
9 mitocondriais e ribossômicos indicam a inclusão de *T. equi* em um gênero distinto de
10 *Theileria* e *Babesia* mais próximo de *Cytauxzoon felis* estudos (SCHREEG et al., 2016).

11 O Pantanal alberga uma enorme diversidade biológica, compreendendo vertebrados e
12 invertebrados (JUNK et al., 2006). É uma região endêmica para o vírus da Anemia Infecciosa
13 Equina (AIE) doença causadora de imunossupressão, e quando associada a outros agentes
14 infecciosos pode comprometer seriamente a saúde dos animais (SILVA et al., 2001; BORGES
15 et al., 2013; PARREIRA et al., 2016).

16 Importante destacar que a piroplasmose equina não tem sido relatada na região do
17 Pantanal Nhecolândia, isso faz com que venha ser mais bem investigada, já que têm sido
18 destacadas elevadas prevalências de carrapatos ixodídeos (CANÇADO et al., 2008; RAMOS
19 et al., 2014). Nessa área, a pecuária extensiva é a principal atividade econômica na qual os
20 equinos tem importante participação (ALLEN & VALLS, 1987; PARREIRA et al., 2016).

21 O presente trabalho objetivou identificar a ocorrência de piroplasmose equina na região
22 do Pantanal Sul Matogrossense, associando alguns parâmetros hematológicos e a presença de
23 carrapatos.

24

25

26

1 MATERIAL E MÉTODOS

2 O trabalho foi realizado na região central do Pantanal Sul Matogrossense; subregião
3 Nhecolândia (18° 59' 15'' S; 56° 37' 03''). Essa região é caracterizada por apresentar duas
4 estações distintas: chuvosa e seca. O volume de chuvas no verão é muito maior do que no
5 inverno, isso faz com que o verão seja uma estação chuvosa, enquanto que o inverno é seco
6 (BACANI, 2007). O tamanho da amostra foi determinado por meio do método de
7 amostragem não probabilística por conveniência segundo MATTAR, (1996) e SCHIFFMAN
8 & KANUK, (2000).

9 Foram colhidas amostras de sangue e soro de 170 equinos de raça pantaneira. Os
10 animais foram divididos em quatro categorias de acordo com a idade sexo e condição
11 reprodutiva: 41 machos de serviço (MAS), 54 fêmeas de serviço (FES), 39 fêmeas em
12 reprodução (FER) e 36 potros (POT). As coletas ocorreram nos períodos de junho a julho de
13 2014 e julho a agosto de 2015. Todos os animais amostrados nasceram e foram criados na
14 área e encontravam-se aparentemente saudáveis por ocasião das coletas.

15 Durante as primeiras 12 horas após a colheita do sangue com EDTA foram
16 quantificados o volume globular (VG) pela técnica do micro-hematócrito e contagem do
17 número total de hemácias (He/mm³) em câmara de Neubauer (SINK & FELDMAN, 2006;
18 DOUGLAS & WARDROP, 2010). Consideramos os valores de VG e He/mm³ como
19 indicadores de anemia, de acordo com achados reportados por RIBEIRO et al. (2008).

20 Colheu-se sangue periférico a partir da perfuração de ponta de orelha e narinas para
21 confecção de duas lâminas de esfregaços sanguíneos por animal para serem corados pelo
22 método rápido (Panótico Rápido LB®), de acordo com as recomendações do fabricante.

23 Foram colhidos carrapatos que estavam parasitando os equinos com ajuda de uma
24 pinça anatômica, para que não fosse comprometida a identificação morfológica dos espécimes
25 que foram armazenadas em tubos Falcon de 15 ml. O esforço de coleta foi sistematizado com

1 inspeção visual por todo corpo do animal durante um minuto. As fêmeas ingurgitadas foram
2 armazenadas em placas de Petri para mais tarde realizarem postura e logo após exame de
3 hemolinfa e ovos. Os carrapatos foram identificados com auxílio de guias com chaves
4 dicotômicas para identificação das espécies de carrapatos segundo BARROS-BATTESTI et
5 al. (2006); NAVA et al. (2014).

6 Após cinco dias da realização da postura das fêmeas ingurgitadas, foram extraídas
7 hemolinfas a partir de secção dos tarsos ou tíbias com auxílio de uma lâmina de bisturi
8 (BURGDORFER, 1970; BARREIRA, 1988; ANGELO et al., 2010; REZENDE, 2012).
9 Também, foram colhidos os ovos provenientes dessas fêmeas ingurgitadas, que em seguida
10 foram macerados junto a uma lâmina de microscopia com o auxílio de uma espátula
11 (REZENDE, 2012). Tanto os ovos como as hemolinfas, foram colocados em lâminas de
12 microscopia óptica, separadas e coradas com Panótico Rápido LB® de acordo com as
13 recomendações do fabricante e levadas ao microscópio de luz para a observação de formas de
14 esporocinetos com objetiva de 100x (BURGDORFER, 1970; BARREIRA, 1988; REZENDE,
15 2012).

16 Para a realização dos testes de ELISA, foi utilizado um antígeno recombinante de *B.*
17 *caballi* (Kit imunodot®), segundo recomendação do fabricante, enquanto que para *T. equi* foi
18 utilizado antígeno total (BALDANI et al., 2004). O conteúdo protéico para cada um dos
19 antígenos foi determinado pelo método do ácido bicinônico com Kit de reagentes BCA
20 (BCA Reagents Kit – Pierce Chemical Company®), de acordo com as recomendações do
21 fabricante.

22 O ELISA–teste para ambos agentes foi realizado conforme descrito por BALDANI
23 et al. (2006). O ponto de corte foi estabelecido com a escala do nível de ELISA (NE)
24 anteriormente definido por MACHADO et al. (1997), ou seja, os níveis de anticorpos de valor
25 diagnóstico ($NE \geq 3$) para *B. caballi* foram considerados positivos dentro do intervalo de

1 densidade óptica de 0,538. Para *T. equi*, os níveis de anticorpos de valor diagnóstico ($NE \geq 2$)
2 foram considerados positivos dentro do intervalo de densidade óptica de 0,372. Nessas
3 condições, a menor densidade óptica dos soros negativos foi de $(0,215 \pm 0,020)$ para *B.*
4 *caballi* e $(0,149 \pm 0,029)$ para *T. equi*. A maior densidade óptica verificada para os soros de
5 referência positiva foi de $(1,085 \pm 0,045)$ para *B. caballi* e $(1,290 \pm 0,400)$ para *T. equi*.

6 A extração de DNA de sangue total foi realizada com o QIAamp DNA Blood Mini
7 Kit (Qiagen®) de acordo com as recomendações do fabricante. A quantificação do material
8 genômico foi realizada em aparelho Nanodrop (Thermo Scientific®), por meio da leitura de
9 absorvância e armazenada a -20°C .

10 Foi realizada uma primeira reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificar
11 piroplasmídeos de equinos, conforme descrito por NIJHOF et al. (2005). Os oligonucleotídeos
12 iniciadores (primers) utilizados foram descritos para a sequência da região 18S rRNA do gene
13 ribossomal, específico para gênero de piroplasmídeos de equinos, Nbabesia-1F e 18SRev-TB
14 (Tabela 1). As condições da reação de PCR utilizadas estão descritas segundo OOSTHUIZEN
15 et al. (2008) e BHOORA et al. (2009), resultando em fragmento amplificado de
16 aproximadamente 1.600 pb. O controle positivo para *B. caballi* e *T. equi* utilizado nas reações
17 foi cedido gentilmente pelo professor Dr. Marcos Rogério André do Laboratório de
18 Imunoparasitologia da Universidade Estadual Paulista – UNESP – campus Jaboticabal. O
19 controle negativo utilizado na reação foi água ultrapura esterilizada. Embora a amplificação
20 de um fragmento genômico não necessariamente indique a integridade de um parasita, no
21 presente trabalho consideramos a positividade no PCR como presença dos piroplasmídeos de
22 equinos.

23 Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de
24 agarose a 0,9% corado com Brometo de Etídeo (Invitrogen®) $(0,5\mu\text{L}/\text{mL})$ em tampão de

1 corrida TEB 0,5X pH 8,0 (44,58M Tris-base; 0,44M ácido bórico; 12,49mM EDTA). A
2 eletroforese foi realizada a 100V / 50mA durante 130 minutos.

3 Para as análises filogenéticas realizou-se três Nested de PCR (nPCR), de acordo com
4 BHOORA et al. (2009), utilizando-se primers mostrados na Tabela 1. Para a purificação dos
5 produtos das nPCR, utilizou-se o kit “Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (ThermoFisher)”
6 de acordo com as recomendações do fabricante.

7 Das amostras amplificadas na nPCR, foram selecionadas 30 com positividade na
8 sorologia entre as diferentes categorias de equinos, e, posteriormente encaminhadas para o
9 sequenciamento. O sequenciamento dos produtos amplificados foi realizado por meio de
10 sistema automatizado baseado no método da terminação da cadeia por dideoxynucleotídeo
11 (SANGER et al., 1977) no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO -
12 FCAV - UNESP).

13 A qualidade dos eletroferogramas obtidos por meio do sequenciamento dos produtos
14 amplificados foram visualmente analisados no programa FinchTV 1.4.0. Adicionalmente, as
15 sequências consenso foram obtidas pela análise das sequências *forward* utilizando o programa
16 CAP3 (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/MobylyePortal/portal.py>). Com o propósito de se
17 realizar a análise de identidade das sequências, os fragmentos gênicos amplificados foram
18 confrontados com outros previamente depositados no Genbank por meio do BLASTn
19 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Por fim, as sequências do gene 18S rRNA de *T. equi*
20 foram individualmente alinhadas com outras sequências disponíveis no Genbank utilizando-se
21 o Clustal/W (THOMPSON et al., 1994) e ajustadas no programa Bioedit v. 7.0.5.3 (HALL,
22 1999). As análises filogenéticas utilizando o critério de *Maximum Likelihood* (ML) foram
23 inferidas com RAxML-HPC BlackBox (7.6.3) (STAMATAKIS et al., 2008) por meio do
24 CIPRES *Science Gateway* (MILLER et al., 2010). Os AICs (*Akaike Information Criterion*)
25 obtidos por meio da análise das sequências, realizada no programa MEGA 5.05, foram

1 utilizados para seleccionar o modelo de evolução *best of fit*. O modelo de evolução GTR+G+1,
2 foi o seleccionado e conseqüentemente utilizado na análise supracitada.

3 Para verificar se houve diferença nos resultados dos testes sorológicos e moleculares
4 para as variáveis idade, condição reprodutiva e sexo, entre as categorias MAS; FES; FER e
5 POT, utilizou-se o teste do “Qui-quadrado”. Foi utilizada a correlação de Yates para
6 determinar em quais categorias ocorreram diferenças nas ocorrências de anticorpos e detecção
7 molecular (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011).

8 Foi verificado pelo Teste Shapiro se as distribuições dos resultados das He/mm³ e
9 VG possuíam uma distribuição normal. Em seguida, utilizou-se o ANOVA pelo software R
10 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011), para verificar se houve diferença significativa
11 entre as médias dos valores relativos às He/mm³ e VG entre as diferentes categorias. O teste
12 de ANOVA também foi utilizado para verificar se houve diferença entre os animais
13 soropositivos e soronegativos para *B. caballi* e *T. equi*. Em seguida, foi realizado o teste de
14 Tukey para saber em quais grupos houve diferença significativa.

15 O teste *t* foi utilizado com um nível de significância de 95% ($p \leq 0,05$) para comparar
16 as médias dos valores hematológicos dos indivíduos positivos para ambos a PCR e sorologia,
17 de cada categoria animal, com os valores dos grupos apresentados por RIBEIRO et al. (2008):
18 POT (machos e fêmeas até oito meses); MAS (machos adultos castrados); FES (fêmeas com
19 idade de nove até 24 meses); e FER (fêmeas prenhas).

20 Para determinar se existe correlação entre os testes sorológicos (*T. equi* e *B. caballi*)
21 e a detecção molecular (PCR) utilizou-se o teste KAPPA, medida baseada no número de
22 respostas concordantes, ou seja, no número de casos cujo resultado é o mesmo entre os testes.
23 As análises foram realizadas entre as seguintes combinações de resultados: (a) PCR vs
24 sorologia para *T. equi*; (b) PCR vs sorologia para *B. caballi*; (c) sorologia para *T. equi* vs
25 sorologia para *B. caballi*; e (d) PCR vs sorologia para ambos *T. equi* e *B. caballi*.

1 RESULTADOS

2 Dos 170 animais amostrados, 105 (61,8%) e 90 (52,9%) apresentaram-se
3 soropositivos para *T. equi* e *B. caballi*, respectivamente. Foram registrados 84 animais
4 soropositivos para ambos os piroplasmídeos (Tabela 2), enquanto que 21 equinos
5 apresentaram soropositividade somente para *T. equi* e apenas seis animais positivos na
6 sorologia somente para *B. caballi*.

7 Das 170 amostras de sangue analisadas, 74 (43,5%) mostraram resultados positivos
8 ao teste molecular para piroplasmídeos de equinos, com um fragmento de aproximadamente
9 1.600 pb correspondente ao gene 18S rRNA. As categorias FER e POT apresentaram maiores
10 números de animais positivos (86,1%), enquanto que a categoria MAS apresentou as menores
11 ocorrências moleculares (14,6%) (Tabela 3 e Figura 1).

12 Considerando a detecção molecular e a sorologia positiva para ambos *B. caballi* e *T.*
13 *equi* dos 170 animais amostrados, 21 (12,3%) foram considerados efetivamente coinfectados.
14 Não foi possível realizar as análises estatísticas entre as categorias dos animais coinfectados
15 devido ao número baixo de animais.

16 Foi verificado uma concordância entre os testes sorológicos (sorologia *T. equi* vs
17 sorologia *B. caballi*) (valor de Kappa 0,678). Contudo, não foi observado concordância entre
18 os resultados do teste parasitológico molecular (PCR) e sorológicos (*T. equi* e *B. caballi*)
19 (valor de Kappa <0).

20 Dos 59 animais soronegativos para *B. caballi* e *T. equi*, 41 (69,5%) apresentaram
21 positividade na PCR. Observamos que 88% desse grupo (falso-negativos) estavam compostos
22 por FER e POT. Entre os animais soropositivos tanto para *B. caballi* como para *T. equi*
23 (n=84), 63 (75%) foram negativos ao diagnóstico molecular, 98% desse grupo formado por
24 MAS e FES.

1 O teste de ANOVA mostrou diferenças significativas entre as quatro categorias em
2 relação aos índices hematológicos. Quando analisadas pelo Teste de Tukey, observou-se que
3 as médias de He/mm³ e VG para POT estavam acima ($p < 0,05$) dos valores médios das demais
4 categorias (MAS, FES e FER). Os valores hematológicos estão expressos na Tabela 4.

5 O teste de ANOVA não mostrou diferenças significativas para He/mm³ e VG entre
6 os animais positivos e negativos para *T. equi* e *B. caballi*, para as categorias (MAS, FES,
7 FER), tanto na sorologia como no diagnóstico molecular. O mesmo ocorre com a categoria
8 POT observada separadamente. Também não houve diferença entre os animais coinfectados,
9 adultos e potros.

10 Quando comparado os valores hematológicos dos animais coinfectados por meio de
11 He/mm³ e pelo VG, respectivamente no presente trabalho, com achados reportados por
12 RIBEIRO et al. (2008) para raça pantaneira, observou-se que não houve diferenças
13 significativas entre as categorias de animais.

14 Foram observados que 51,2% (87/170) dos equinos encontravam-se infestados por
15 carrapatos. Sendo que as FER apresentaram a maior infestação, com 87,2% (34/39), seguido
16 dos POT com 63,9% (23/36). As FES apresentaram 44,4% (24/54) e os MAS apenas 17,1%
17 (7/41) com a presença de carrapatos (Tabela 5).

18 Foi observado que *D. nitens* parasita os equinos indiscriminadamente por ter sido
19 observado em todas as categorias avaliadas, sendo que FER e POT com as maiores
20 infestações 35,9% e 27,9%, respectivamente. Ainda, foi registrado que as FER apresentaram
21 as maiores ocorrências de coinfectações por duas espécies de ixodídeos (*A. sculptum* / *D.*
22 *nitens*) ou três [*R. (B.) microplus* / *A. sculptum* / *D. nitens*] (Tabela 5).

23 Os exames de hemolinfa e ovos das fêmeas ingurgitadas não detectaram
24 esporocinetos de *Babesia* sp. e *Theileria* sp. Também, não foram encontradas estruturas

1 sugestivas de piroplasmídeos característicos de *B. caballi* e *T. equi* em eritrócitos nos
2 esfregaços sanguíneos.

3 Foram amplificadas 67 amostras na nPCR, sendo que os 30 produtos selecionados
4 para sequenciamento resultaram em 180 seqüências (forward e reverse), das quais recuperou-
5 se 54 seqüências forward. Dessas, foram formados 18 contigs, devidamente depositados no
6 Genbank com os números de acessos KY464019 a KY464036. As análises do BLASTn dos
7 contigs revelaram uma identidade variando de 98-100% com seqüências de *T. equi*
8 previamente amplificadas nos EUA (JX177673) e Brasil (KU240071). Todas as seqüências
9 detectadas no presente estudo mostraram *query coverages* variando de 98-100%.

10 Todas as 18 seqüências submetidas à análise ML foram arranjadas em dois grupos
11 principais com 98 e 100% de similaridade (Figura 2). As seqüências pertencentes ao grupo A,
12 subdividiram em dois subgrupos (A1 e A2). Quatro seqüências do subgrupo A1 (JC9, JC16,
13 JC28 e JC29) agruparam com seqüências detectadas no Rio de Janeiro (KJ573370), Rio
14 grande do Sul (KU240065, KU24008, KU240064, KU240072 e KU240069), África do Sul
15 (EU888906) e Estados Unidos (JX177673, JX177671, JX177672 e JX177670). Enquanto
16 cinco seqüências do subgrupo A2 (JC2, JC3, JC6, JC7 e JC12) posicionaram-se próximas a *T.*
17 *equi* detectada no Rio de Janeiro (KJ573373), África do Sul (EU642508) e Espanha
18 (AY150062 e AY150063).

19 Adicionalmente, amostras do Grupo B foram agrupadas em dois subgrupos (B1 e
20 B2). Sete seqüências (JC4, JC10, JC13, JC15, JC17, JC19 e JC20) pertencentes ao subgrupo
21 B1, foram posicionadas próximas àquelas detectadas no Rio de Janeiro (KJ573371), Rio
22 Grande do Sul (KU240067 e KU240071) e Estados Unidos (JQ390047). Por outro lado, duas
23 seqüências do subgrupo B2 (JC18 e JC21) posicionaram-se no mesmo cluster e próximas a
24 seqüência detectada no Rio Grande do Sul (KU240066 e KU240070), Rio de Janeiro

1 (KJ573374), Africa do Sul (EU888905, EU642511, EU888903, EU642510), Sudão
2 (AB515309, AB515312, AB515307, AB515315) (Figura 2).

3

4 **DISCUSSÃO**

5 Nossos resultados mostraram que os piroplasmas de equinos ocorrem em torno de
6 metade dos animais amostrados. De fato, constatamos soroprevalências para *T. equi* e *B.*
7 *caballi* de 61,8% e 52,9%, respectivamente, e 43,5% dos animais com detecção de
8 piroplasmas pelo PCR. Esses valores, associados à infestação por carrapatos encontrados nos
9 animais, indicam o caráter endêmico da piroplasmose equina na região. Pesquisas soro-
10 epidemiológicas realizadas no Brasil vêm sendo desenvolvidas por diversos autores em
11 diferentes regiões brasileiras, reportando maiores soroprevalências para *T. equi* como em
12 Minas gerais (IFAT 91,0%), Rio de Janeiro (IFAT 90,6%) e Paraná (cELISA 78,3%)
13 (PFEIFER BARBOSA et al., 1995; HEIM et al., 2007; VIEIRA et al., 2013), como também
14 para *B. caballi* (90%) em São Paulo e Mato Grosso do Sul (XUAN et al., 2001). As
15 diferenças regionais nas soroprevalências e na detecção molecular dos piroplasmídeos podem
16 estar associadas ao ambiente e ao manejo no qual os equinos estão submetidos, bem como as
17 diferentes técnicas de diagnóstico utilizadas pelos diferentes autores (BARROS et al., 2015;
18 DAVITKOV et al., 2016; LIU et al., 2016).

19 A soroprevalência para *T. equi* ligeiramente maior que *B. caballi* encontrada no
20 presente trabalho também foi reportada em vários estudos em diferentes regiões do Brasil
21 (BARBOSA et al., 1995; HEIM et al., 2007; VIEIRA et al., 2013; FERREIRA et al., 2016),
22 como mundialmente (AKKAN et al., 2003; BOLDBAATAR et al., 2005; CAMACHO et al.,
23 2005; ASGARALI et al., 2007; KARATEPE et al., 2009; GARCIA-BOCANEGRA et al.,
24 2013). Esta situação pode ser atribuída ao fato de que as infecções por *T. equi* são
25 permanentes, enquanto que infecções por *B. caballi* habitualmente desaparecem após 4-5

1 anos (SHKAP et al., 1998; VIAL & GORENFLOT, 2006; RÜEGG et al., 2007; RÜEGG et
2 al., 2008) e comumente tem ótima resposta ao tratamento (BRÜNING, 1996, SCHWINT et
3 al., 2009).

4 Os resultados sorológicos mostraram que os equinos adultos de serviço estão mais
5 expostos aos piroplasmas do que as fêmeas em reprodução e os potros. De fato, à criação dos
6 animais livre a campo, associado à exposição continuada aos vetores ixodídeos, estaria
7 garantido que um grande número de animais chegue à idade adulta com anticorpos
8 direcionados a esses agentes tornando-se portadores assintomáticos (D'OLIVEIRA et al.,
9 1995; AKTAS et al., 2002; KERBER et al., 2009).

10 Provas sorológicas são imprescindíveis em estudos epidemiológicos, revelando a
11 presença de anticorpos contra o agente, indicando a exposição dos animais frente ao parasita.
12 Entretanto, os resultados devem ser avaliados com cautela, pois diversos autores relatam
13 haver reações cruzadas no diagnóstico sorológico para piroplasmas dos equinos (GOTZ,
14 1982; MERKLE, 1983; ALCHER, 1984; WEILAND, 1986). KNOWLES et al. (1991),
15 sugerem que a ocorrência dessas reações podem se dar devido a semelhança das proteínas
16 expressas pelos merozoítas. De maneira geral, as soroprevalências registradas no presente
17 estudo indicam que metade dos equinos foram expostos aos agentes.

18 O caráter subclínico da piroplasmose equina na região estudada pode ser
19 comprovado pela não visualização de parasitas nos esfregaços sanguíneos, juntamente com os
20 resultados obtidos nos índices de anemia. Elevadas parasitemias foram relatadas por FARAH
21 et al. (2003) e SALIB et al. (2013), que encontraram uma incidência de 38,8% e 34%,
22 respectivamente para *T. equi* em esfregaços sanguíneos de equinos no Egito. A detecção
23 visual de piroplasmas por meio de microscopia óptica é o teste de diagnóstico mais comum,
24 simples e acessível, confirmando o diagnóstico. No entanto, a baixa sensibilidade neste
25 método não permite apenas o uso em investigações epidemiológicas conforme descrito por

1 SADEGHI DEHKORDI et al. (2010), resultando em desvantagem do exame parasitológico
2 tradicional pela observação dos parasitas no esfregaço sanguíneo, por não detectar animais
3 positivos na forma crônica da doença (BRÜNING, 1996). De fato, durante a fase crônica da
4 infecção, quando o nível de parasitemia é menor ou igual a 0,01%, a sensibilidade da técnica
5 de esfregaço sanguíneo obtido de sangue periférico diminui, aumentando assim os resultados
6 falso-negativos aos exames parasitológicos tradicionais (NIZOLI, 2005).

7 O diagnóstico molecular realizado no presente estudo mostrou uma prevalência de
8 43,5%, semelhante aos resultados encontrados por HEIM et al. (2007) em animais coletados
9 nos estados da Bahia, Goiás, São Paulo e Minas Gerais. Também, FERREIRA et al. (2016) na
10 Paraíba, avaliando equinos utilizados em esportes, encontrou metade dos animais investigados
11 positivos na PCR. No entanto, em trabalho realizado em equídeos do Pantanal de Mato
12 Grosso (Poconé e Barra do Bugre), obteve-se uma detecção molecular de apenas 14% dos 121
13 equídeos amostrados (BARROS et al., 2015). BHOORA et al. (2009) mostram a existência
14 de variação de sequências nos genes 18S rRNA dos parasitas causadores da piroplasmose
15 equina, alertando para o cuidado deste alvo para fins de diagnóstico. Entretanto é possível
16 identificar regiões conservadas e exclusivas de cada espécie de piroplasmas de equinos no
17 gene 18S rRNA. A utilização de primers gênero-específico para detectar a presença do DNA
18 de piroplasmas vem sendo utilizada por diferentes autores (CRIADO-FORNELIO et al.,
19 2003; DAVITKOV et al., 2016).

20 Foram observadas diferenças no padrão da infecção quando avaliamos os animais
21 por categorias: (i) as maiores prevalências moleculares observadas nos potros (86,1%) pode
22 estar relacionadas à fase aguda da piroplasmose equina. Como em áreas endêmicas os vetores
23 invertebrados são considerados hospedeiros reservatórios, mantendo a infecção nas suas
24 populações por via transovariana e transtadiária (BASHIRUDDIN et al., 1999;
25 BATTSETSEG et al., 2002), o encontro de muitos animais novos com piroplasmas na

1 circulação sistêmica é esperado. Ainda, potros podem apresentar uma parasitemia elevada por
2 *T. equi* devido à transmissão vertical (PHIPPS & OTTER, 2004; ALLSOPP et al., 2007;
3 GEORGES et al., 2011); (ii) Os animais adultos de serviço (MAS e FES) apresentaram as
4 menores prevalências moleculares, indicando a cronicidade da doença, caracterizada por
5 baixas parasitemias. Como mostrado por BARTOLOMÉ DEL PINO et al. (2016), onde
6 equinos adultos são mais eficientes em controlar as infecções por piroplasmas devido a
7 imunidade mediada por células, eliminando ou mantendo a carga parasitária mais baixa do
8 que o limite de detecção na PCR. Ainda, por serem animais fundamentais na utilização do
9 trabalho com os bovinos, os animais recebem melhores cuidados e atenção (SHKAP et al.,
10 1998; RÜEGG et al., 2007); (iii) as fêmeas em reprodução (FER) apresentaram uma
11 prevalência molecular acima da metade dos animais amostrados (59%), por motivos de
12 poderem estar relacionados à imunossupressão resultante do estresse do aleitamento e
13 cuidados com a cria (COHEN et al., 2012).

14 De fato, situações de estresse estimulam a síntese e liberação do hormônio liberador
15 de corticotropina (CRH), que atua sobre a adeno-hipófise, induzindo a liberação do hormônio
16 adrenocorticotrópico (ACTH) (KHANSARI et al., 1999). O ACTH possui forte ação sobre o
17 córtex adrenal, promovendo a formação e liberação de glicocorticóides (cortisol e
18 corticosterona) no sangue. Fisiologicamente, os glicocorticoides são responsáveis por
19 modular a resposta imune, provocando uma diminuição de células linfóides. Esta via de
20 resposta, quando o indivíduo submetido a uma situação de estresse persistente, no caso de
21 aleitamento e cuidado com as crias pelas éguas causam aumento crônico nos níveis
22 plasmáticos de glicocorticóides, resultando em imunossupressão e uma susceptibilidade
23 aumentada às doenças (KHANSARI et al., 1999; DOBSON & SMITH, 2000; COHEN et al.,
24 2012).

1 A debilidade do sistema imune das éguas em reprodução pode explicar o fato de ter
2 sido encontrado no presente trabalho 87,2% de infestação por carrapatos, principalmente
3 nessa categoria. Nesse sentido, tanto o estresse reprodutivo, como a presença de elevadas
4 infestações por carrapatos, estariam comprometendo ainda mais o sistema imune (AKTAS et
5 al., 2002; COHEN et al., 2012).

6 Nossas análises mostraram não haver correlação entre os resultados dos testes
7 moleculares e sorológicos, indicando fortemente a necessidade de utilizar essas duas
8 ferramentas de diagnóstico para estudos epidemiológicos. A detecção de *Babesia* sp. e
9 *Theileria* sp. em animais portadores utilizando-se da PCR, denomina-se uma poderosa
10 ferramenta, uma vez que por serem criados livremente a campo, os equinos estão
11 constantemente expostos aos carrapatos ixodídeos mostrando-se cronicamente parasitados
12 (D'OLIVEIRA et al., 1995; AKTAS et al., 2002). Como nas áreas endêmicas encontramos
13 equinos com parasitemias crípticas, tão baixas que não são detectáveis nem por testes
14 moleculares (GEORGES et al., 2011), a sorologia torna-se imprescindível para amostrar a
15 fração dos animais que estão expostos.

16 No presente trabalho, pôde ser observado que houve uma ocorrência considerável de
17 animais soropositivos com negatividade ao exame molecular (75%). Esse resultado
18 provavelmente está associado à cronicidade das infecções caracterizada por parasitemias
19 crípticas, como também a eliminação de patógenos, principalmente *B. caballi* (MACHADO
20 et al., 2012). Esses animais considerados falsos positivos, 98% pertenciam às categorias
21 machos e fêmeas de serviço. Por outro lado, foram observados que 69,5% dos animais
22 amostrados apresentaram-se soronegativos e positivos ao teste molecular, o que caracteriza
23 infecções agudas, comuns em áreas endêmicas (LAUS et al., 2013). Essa análise foi composta
24 por 88% de animais pertencentes às categorias fêmeas em reprodução e potros. Vários autores
25 também têm descrito a divergência entre resultados dos testes sorológicos e moleculares

1 quando em infecções naturais (DONNELLY et al., 1980; RIBEIRO et al., 1999;
2 ABDELKEBIR et al., 2001; AKKAN et al., 2003; DE LA FUENTE et al., 2005; ZINORA et
3 al., 2007).

4 A presença de carrapatos ixodídeos nos equinos amostrados, em infestações únicas
5 ou múltiplas, pode ter forte correlação com a presença observada de coinfeção por *T. equi* e
6 *B. caballi*. De fato existe uma forte associação entre *A. sculptum* e *T. equi* e *D. nitens* e *B.*
7 *caballi* (KERBER et al., 2009). Importante ressaltar que o ambiente no qual os equinos
8 habitam encontra-se altamente infestado por formas imaturas de carrapatos, especialmente da
9 espécie multi-hospedeira, *A. sculptum*, reportada parasitando uma grande quantidade de
10 espécies de mamíferos silvestres e domésticos na região (RAMOS et al., 2014). Entretanto no
11 presente trabalho não foram correlacionadas formas imaturas. Esse caráter enzoótico poderia
12 explicar as elevadas soroprevalências encontradas nos equinos, principalmente para *T. equi*.
13 RAZMI et al. (2002), também observou que grande número de carrapatos nas áreas
14 endêmicas para piroplasmose equina estaria expondo continuamente equinos jovens e
15 adultos à infecções por *T. equi* e *B. caballi*. De fato, fatores de risco como idade e criação
16 extensiva vêm sendo associados à piroplasmose (RÜEGG et al., 2007; KOUAM, et al., 2010;
17 MORETTI et al., 2010; ABUTARBUSH et al., 2012; VERONESI et al., 2014).

18 A piroplasmose equina tem sido associada a animais mantidos em ambientes
19 conjuntos com ruminantes domésticos (GARCIA-BOCANEGRA et al., 2013; BARTOLOMÉ
20 DEL PINO et al., 2016). Nesse sentido, a criação extensiva de bovinos na região favorece
21 grandemente as populações de *R. (B.) microplus*. Como foi observado no presente estudo
22 infestações por *R. (B.) microplus* especialmente nas éguas em reprodução e nos potros, a
23 transmissão de *T. equi* estaria sendo assegurada (BASHIRUDDIM et al., 1999;
24 BATTSETSEG et al., 2002).

1 A manutenção das populações de carrapatos no ambiente natural é um fator de risco
2 à piroplasmose equina na região do Pantanal, as ações de controle e profilaxia devem incluir
3 obrigatoriamente, medidas de combate a esses vetores. De fato, programas de controle de
4 doenças diminuem as chances de piroplasmose em equinos mantidos para fins esportivos e
5 recreativos em centros urbanos, enquanto que os animais criados em pastagens a campo para
6 fins comerciais aumentam a probabilidade da infecção (KOUAM et al., 2010; MORETTI, et
7 al., 2010; ABUTARBUSH et al., 2012; DAVITKOV et al., 2016).

8 A característica subclínica da piroplasmose equina foi confirmada no presente
9 trabalho, também por não apresentar diferenças significativas para os valores médios de
10 He/mm^3 e VG entre os animais positivos e negativos, inclusive quando comparados com
11 RIBEIRO et al. (2008) para a raça pantaneira. O não aparecimento de sintomatologia clínica
12 que possam indicar quais animais estaria parasitado, implica em que equinos portadores
13 crônicos continuem atuando como fonte de infecção para os artrópodes vetores (LIU et al.,
14 2016). De fato, animais portadores assintomáticos constituem um grande desafio no controle
15 da erradicação dos parasitas. Equinos parasitados por piroplasmas sem alterações nos índices
16 de anemia foram também relatados em trabalhos realizados por KUMAR et al. (2009);
17 MACHADO et al. (2012); VERONESI et al. (2014); e BARTOLOMÉ DEL PINO et al.
18 (2016).

19 Raças locais, por estarem adaptadas ao ambiente que na qual vem sendo criadas,
20 apresentam imunidade e resistência à piroplasmose equina (VRANOVÁ et al., 2011).
21 Entretanto, como os piroplasmídeos são parasitas de células sanguíneas, as infecções
22 subclínicas devem ser diagnosticadas e os animais monitorados, especialmente aqueles
23 submetidos a esforços físicos contínuos, como nas fazendas do Pantanal. Um recente trabalho
24 realizado por FERREIRA et al. (2016) na Paraíba, mostrou que cavalos utilizados em esportes

1 estão infectados pelo agente *T. equi* alertando a possibilidade dos animais parasitados
2 apresentarem comprometimento no rendimento físico.

3 O estado de portador crônico assintomático encontrado neste trabalho,
4 principalmente nos animais adultos de serviço, pode ser explicado pelo fato de que os equinos
5 entram em contatos com os carrapatos vetores infectados logo nos primeiros dias de vida,
6 submetidos a uma imunização natural. Características também observadas por
7 ABDELKEBIR et al. 2001; CAMACHO et al. 2005, em província do Paquistão. Para
8 VERONESI et al. (2014), a exposição elevada e constante à patógenos transmitidos por
9 carrapatos favorece a aquisição de imunidade tornando os animais portadores crônicos. Deve-
10 se considerar que as infecções subclínicas e aparente bom estado clínico dos animais
11 amostrados estariam indicando um bom manejo no qual os equinos estariam sendo
12 submetidos (PARREIRA et al., 2016).

13 O presente trabalho revelou através do sequenciamento que *T. equi* pode se manter
14 circulante no sangue dos animais em baixas parasitemias. Consistente com trabalhos
15 realizados por BASHIRUDDIN et al. (1999); CRIADO-FORNELIO et al. (2004); NAGORE
16 et al. (2004); ACICI et al. (2008); KOUAM et al. (2010); ROS-GARCÍA et al. (2013);
17 DAVITKOV et al. (2016), que relatam que *T. equi* é mais prevalente do que *B. caballi*,
18 devido a maior persistência após infecção, maior parasitemia e transmissão transplacentária
19 (DE WAAL & VAN HEERDEN, 1994; ALLSOP et al., 2007; GEORGES et al., 2011).

20 As análises filogenéticas mostraram fortemente a colocação de *T. equi* encontrada
21 parasitando os equinos do Pantanal Sul Matogrossense no clade *Theileria*. Ainda, algumas
22 sequencias encontradas no presente estudo indicam novos genótipos para *T. equi*. De fato,
23 embora dois genótipos fosse originalmente propostos para a espécie *T. equi* (NAGORE et al.,
24 2004), estudos posteriores na África do Sul (BHOORA et al., 2009), Sudão (SALIM et al.,
25 2010), Jordânia (QABLAN et al., 2013) e América do Norte (HALL et al., 2013) adicionaram

1 novos genótipos. LIU et al. (2016) relatam que a diversidade de *T. equi* pode aumentar com a
2 adição de sequências de regiões geográficas atualmente inexploradas.

3 Para conhecimento, este foi o primeiro relato confirmado de ocorrência de
4 piroplasmose equina na região do Pantanal Sul Matogrossense, e segundo em equídeos no
5 Pantanal (BARROS et al., 2015).

6

7 **CONCLUSÃO**

8 A região estudada demonstra ser enzoótica para *B. caballi* e *T. equi* devido à
9 positividade aos exames sorológicos e moleculares, bem como a infestação de diferentes
10 espécies de carrapatos vetores nos equinos nascidos e criados na região do Pantanal Sul
11 Matogrossense. Ainda, os animais soropositivos e positivos no teste molecular não
12 apresentaram anemia, expressa pelos valores normais de contagem global de hemácias e
13 volume globular, confirmando a existência de infecções subclínicas. Entretanto, a detecção
14 molecular demonstra que os equinos cronicamente infectados na região estariam contribuindo
15 para a manutenção destes agentes infecciosos atuando como fonte de infecção aos carrapatos
16 vetores.

17

18 **AGRADECIMENTOS**

19 Os autores agradecem a UCDB por todo apoio, incentivo e investimento no
20 programa de Pós – graduação em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária. A
21 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES, pela concessão da
22 bolsa de mestrado ao programa. Aos alunos de Iniciação Científica (PIBIC) que estiveram
23 sempre dispostos, seja em reuniões como nos momentos de necessidade para finalizar alguma
24 atividade referente ao trabalho. A Fazenda Alegria por todo o apoio e espaço fornecido a que
25 foi executado todo o trabalho de coleta dos materiais; destacando Sr. *Carlinhos*, Sr.

1 *Marquinhos*, Dona *Lurdes*, médico veterinário da fazenda *Bruno* além dos demais
2 funcionários que estiveram envolvidos. E a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias –
3 FCAV/UNESP-SP, pelo espaço disponibilizado para a execução de uma das etapas do
4 trabalho.

5

6 **COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA**

7 O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da
8 Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), protocolo nº. 021/2015.

9

10 **REFERÊNCIAS**

11

12 ABDELKEBIR, R.; SAHIBI, H.; LASRI, S., et al. Validation of a competitive enzyme-
13 linked immunosorbent assay for diagnosing *Babesia equi* infections of Moroccan origin and
14 its use in determining the seroprevalence of *B. equi* in Morocco. **J. Vet. Diagn. Invest.** 13,
15 249–251. 2001.

16 ABUTARBUSH, S.M.; ALQAWASMEH, D.M.; MUKBEL, R.M. et al. Equine babesiosis:
17 Seroprevalence, risk factors and comparison of different diagnostic methods in Jordan.
18 **Transbound. Emerg. Dis.** 59, 72-78. 2012.

19 ACICCI, M.; UMUR, S.; GUVENC, T., et al. Seroprevalence of equine babesiosis in the
20 Black Sea region of Turkey. **Parasitology International**, v. 57, p. 198-200, 2008.

21 AKKAN, H.A.; KARACA, M.; TUTUNCU, M., et al. Serologic and microscopic studies on
22 babesiosis in horses in the east-ern border of Turkey. **J. Eq. Vet. Sci.** 23, 181–183. 2003.

23 AKTAS, M.; DUMANLI, N.; CETINKAYA, B., et al. Field evaluation of PCR in detecting
24 *Theileria annulata* infection in cattle in the east of Turkey. **Vet. Rec.** 150, 548–549. 2002.

- 1 AKTAŞ, M.; ALTAY, K.; DUMANLI, N. Development of a polymerase chain reaction
2 method for diagnosis of *Babesia ovis* infection in sheep and goats. **Vet Parasitol.** Nov
3 5;133(4):277-81. 2005.
- 4 ALCHER, B.M. Möglichkeiten der serologischen differenzierung der *Babesia equi* and
5 *Babesia caballi*-infektion des pferdes mit hilfe von KBR, IFAT, und ELISA. **Dissertação**
6 **(Mestrado)** – Faculdade de Veterinária, Universidade de Munique, Munique, 1984.
- 7 ALLSOPP, M.T.E.P.; CAVALIER-SMITH, T.; DE WAAL, D.T., **et al.** Phylogeny and
8 evolution of the piroplasms. **Parasitology**, v. 108, p. 147-152. 1994.
- 9 ALLSOPP, M.T.; LEWIS, B.D.; PENZHORN, B.L. Molecular evidence for transplacental
10 transmission of *Theileria equi* from carrier mares to their apparently healthy foals. **Vet**
11 **Parasitol**; 148:130–136. 2007.
- 12 ÂNGELO, I.C.; GÔLO, P.S.; CAMARGO, M.G., **et al.** Haemolymph protein and lipid
13 profile of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infected by fungi. **Transboundary Emerging**
14 **Disease**, v.57, p. 79-83. 2010.
- 15 BACANI, V.M. Sensoriamento remoto aplicado à análise evolutiva do uso e ocupação do
16 solo no Pantanal da Nhecolândia (MS): o exemplo da fazenda Firme. Universidade Federal do
17 Mato Grosso do Sul. Aquidauana. 160p. **(Dissertação)**. 2007.
- 18 BALDANI, C.D.; MACHADO, R.Z.; BOTTEON, P.T.L., **et al.** An enzyme-linked
19 immunosorbent assay for the detection of IgG antibodies against *Babesia equi* in horses.
20 **Ciência Rural, Santa Maria**, v.34, n.5, p.1525-1529, set-out, 2004.
- 21 BALDANI, C.D. Clonagem e expressão do gene EMA-1 em *Eschechia coli* e sua aplicação
22 no diagnóstico sorológico e molecular de *Babesia equi*. **Tese de Doutorado**. Jaboticabal-SP.
23 2006.
- 24 BARBOSA, I.P; BÖSE, R.; PEYMANN, B., **et al.** Epidemiological aspects of equine
25 babesioses in a herd of horses in Brazil. **Vet. Parasitol.** 58, 1–8. 1995.

- 1 BARREIRA, J.D. Caracterização Morfológica, Aspectos Biológicos e Patogenia das formas
2 evolutivas de *Babesia bigemina* (Smith; Kilborne, 1893) e *Babesia bovis* (Babes, 1888)
3 (Protozoa: Babesiidae) em *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). 1988. 103 p. (**Mestrado**
4 **em Medicina Veterinária**) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1988.
- 5 BARROS, E.M.; BRAGA, Í.A.; SANTOS, L.G.F., **et al.** Detecção de *Theileria equi* e
6 *Babesia caballi* e anticorpos anti-Ehrlichia spp. em equídeos do Pantanal Mato-Grossense,
7 Brasil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.67, n.3, p.716-722, 2015.
- 8 BARROS-BATTESTI, D.M.; ARZUA, M.; BECHARA, G.H. Carrapatos de importância
9 Médico-Veterinária da Região Neotropical: **Um guia ilustrado para identificação de**
10 **espécies.** 2006.
- 11 BARTOLOMÉ DEL PINO, L.E.; ROBERTO, N.; VINCENZO, V., **et al.** *Babesia caballi*
12 and *Theileria equi* infections in horses in Central-Southern Italy: Sero-molecular survey and
13 associated risk factors. **Ticks and Tick-borne Diseases** xxx xxx–xxx. 2016.
- 14 BASHIRUDDIN, J.B.; CAMMÀ, C.; REBÊLO, E. Molecular detection of *Babesia equi* and
15 *Babesia caballi* in horse blood by PCR amplification of part of the 16S rRNA gene. **Vet**
16 **Parasitol**; 84(1-2): 75-83. 1999.
- 17 BATTSETSEG, B.; LUCERO, S.; XUAN, X., **et al.** Detection of natural infection of
18 *Boophilus microplus* with *Babesia equi* and *Babesia caballi* in Brazilian horses using nested
19 polymerase chain reaction. **Vet Parasitol.** Aug 22;107(4):351-7. 2002.
- 20 BHOORA, R.; FRANSSEN, L.; OOSTHUIZEN, M.C., **et al.** Sequence heterogeneity in the
21 18S rRNA gene within *Theileria equi* and *Babesia caballi* from horses in South Africa. **Vet**
22 **Parasitol**, v. 159, n. 2, p. 112-20, 2009.
- 23 BRÜNING, A. Equine piroplasmiasis an update on diagnosis, treatment and
24 prevention. **British Veterinary Journal**, London, v.152, p.139-151, 1996.

- 1 BOLDBAATAR, D.; XUAN, X.; BATTSETSEG, B., **et al.** Epidemiological study of equine
2 piroplasmosis in Mongolia. **Vet. Parasitol.** 127, 29–32. 2005.
- 3 BURGDORFER, W.A. Technique for detection of rickettsiae in tick. **American Journal of**
4 **Tropical Medicine and Hygiene**, v. 19, n. 6, p. 1010-14. 1970.
- 5 CAMACHO, A.T.; GUITIAN, Fz.J.; PALLAS, E., **et al.** *Theileria (Babesia) equi* and
6 *Babesia caballi* infections in horses in Galicia. **Trop Anim Health Prod.** 37:293–302. 2005.
- 7 CANÇADO, P.H.; PIRANDA, E.M.; MOURÃO, G.M., **et al.** Spatial distribution and impact
8 of cattle-raising on ticks in the Pantanal region of Brazil by using the CO(2) tick trap.
9 **Parasitol Res.** Jul; 103(2):371-7. 2008.
- 10 COHEN, S.; JANICKI-DEVERTS, D.; DOYLE, W.J., **et al.** Chronic stress, glucocorticoid
11 receptor resistance, inflammation, and disease risk. **Proc Natl Acad Sci** 109: 5995–5999.
12 2012.
- 13 COX, F.E.G. The evolutionary expansion of the sporozoa. **International Journal for**
14 **Parasitology**, v. 24, p.1301-1316. 1994.
- 15 CRIADO-FORNELIO, A.; MARTINEZ-MARCOS, A.; BULING-SARANA, A., **et al.**
16 Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part II.
17 Phylogenetic analysis and evolutionary history. **Vet Parasitol**, 114(3):173–194. 2003.
- 18 CRIADO-FORNELIO, A.; GÓNZALEZ-DEL-RIO, M.A.; BULING-SARANA, A., **et al.**
19 The “expanding universe” of piroplasms. **Vet Parasitol.** 119, 337–345. 2004.
- 20 DAVITKOV, D.; VUCICEVIC, M.; STEVANOVIC, J., **et al.** Molecular detection and
21 prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses of central Balkan. **Acta**
22 **Parasitologica**, 61(2), 337–342; ISSN 1230-2821. 2016.
- 23 DE LA FUENTE, J.; TORINA, A.; CARACAPPA, S., **et al.** Serologic and molecular
24 characterization of *Anaplasma* species infection in farm animals and ticks from Sicily.
25 **Veterinary Parasitology** 133, 357–362. 2005.

- 1 DE WAAL, D.T. The transovarial transmission of *Babesia caballi* by *Hyalomma truncatum*.
2 Onderstepoort. **J Vet Res**; 57:99–100. 1990.
- 3 DE WAAL, D.T. Equine piroplasmiasis: a review. **British Veterinary Journal**, v. 148, n. 1,
4 p. 6-14, 1992.
- 5 DE WAAL, D.T. & VAN HEERDEN, J. Equine piroplasmiasis. In: COETZER, J.A.W.,
6 Tustin, R.C. (Eds.), **Infectious Diseases of Livestock**, vol. 1. Oxford University Press, New
7 York. 1994.
- 8 DOBSON, H. & SMITH, R.F. What is stress, and how does it affect reproduction? **Anim**
9 **Reprod Sci.** Jul 2;60-61:743-52. Review. 2000.
- 10 D'OLIVEIRA, C.; VAN DER WEIDE, M.; HABELA, M.A., **et al.** Detection of *Theileria*
11 *annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR. **J. Clin. Microbiol.** 33, 2665 – 2669.
12 1995.
- 13 DONNELLY, J.; JOYNER, L.; GRAHAM-JONES, O., **et al.** A comparison of the
14 complement fixation and fluorescent antibody tests in a survey of the prevalence of *Babesia*
15 *caballi* in horses in the Sultanate of Oman. **Trop. Anim. Health Prod.** 12, 50–60. 1980.
- 16 DOUGLAS, J.W. & WARDROP, K.J. Schalm's Veterinary hematology. **6ed. Wiley**
17 **Blackwell**, 1232p. 2010.
- 18 FARAH, A.W.; HEGAZY, N.A.; ROMANY, M.M., **et al.** Molecular detection of *Babesia*
19 *equi* in infection and carrier horses by polymerase chain reaction. **Journal Article**, v. 10, n. 2,
20 p. 73-79, 2003.
- 21 FERREIRA, E.P.; VIDOTTO, O.; ALMEIDA, J.C., **et al.** Serological
22 and molecular detection of *Theileria equi* in sport horses of northeastern Brazil. **Comp**
23 **Immunol Microbiol Infect Dis.** Aug; 47:72-6. 2016.
- 24 FRIEDHOFF, K.T.; TENTER, A.M.; MULLER, I. Haemoparasites of equines: Impact on
25 international trade of horses. **Rev Sci Tech**; 9:1187–1194. 1990.

- 1 GARCIA-BOCANEGRA, I.; ARENAS-MONTES, A.; HERNANDEZ, E., **et al.**
2 Seroprevalence and risk factors associated with *Babesia caballi* and *Theileria equi* infection
3 in equids. **The Veterinary Journal**, 195, 172–8. 2013.
- 4 GEORGES, K.C.; EZEOKOLI, C.D.; SPARAGANO, O., **et al.** A case of transplacental
5 transmission of *Theileria equi* in a foal in Trinidad. **Vet Parasitol**; 175:363–366. 2011.
- 6 GOTZ, F. Suitability of ELISA, IFAT, IHA and CFT for detecting *Babesia equi* infections.
7 1982. 39f. **Tese (Doutorado)** – Universidade de Munique. Munique, 1982.
- 8 GUIMARÃES, A.M.; LIMA, J.D.; RIBEIRO, M.F., **et al.** Ultrastructure of sporogony in
9 *Babesia equi* in salivary glands of adult female *Boophilus microplus* ticks. **Parasitol Res.**
10 1998; 84(1): 69-74.
- 11 HALL, T.A. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis
12 program for windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, n.41, 95-98, 1999.
- 13 HALL, C.M.; BUSCH, J.D.; SCOLES, G.A., **et al.** Genetic characterization of *Theileria equi*
14 infecting horses in North America: evidence for a limited source of U.S introductions.
15 **Parasit.Vectors** 6, 35. 2013.
- 16 HEIM, A.; PASSOS, L.M.; RIBEIRO, M.F., **et al.** Detection and molecular characterization
17 of *Babesia caballi* and *Theileria equi* isolates from endemic areas of Brazil. **Parasitol**
18 **Res.** Dec; 102(1):63-8. Epub 2007 Sep 9. 2007.
- 19 HUNFELD, K.P.; HILDEBRANDT, A.; GRAY, J.S. Babesiosis: recent insights into an
20 ancient disease. **Int J Parasitol.** Sep; 38(11):1219-37. 2008.
- 21 JUNK, W.J.; CUNHA, C.N.; WANTZEN, K.M., **et al.** Biodiversity and its conservation in
22 the Pantanal of Mato Grosso, Brazil. **Aquat Sci.** 68: 278-309. 2006.
- 23 KARATEPE, B.; KARATEPE, M.; CAKMAK, A., **et al.** Investigation of seroprevalence of
24 *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses in Nigde province, Turkey. **Trop Anim Health**
25 **Prod.** Jan; 41(1):109-13. 2009.

- 1 KERBER, C.E.; LABRUNA, M.B.; FERREIRA, F., **et al.** Prevalence of equine
2 Piroplasmosis and its association with tick infestation in the State of São Paulo, Brazil. **Rev.**
3 **Bras. Parasitol. Vet.** (Online) vol.18 no. 4 Jaboticabal Oct./Dec. 2009.
- 4 KHANSARI, D.; MURGO, A.J.; FAITH, R.E. Effects of stress on the immune system.
5 **Immunol Today** 11:170–175. 1999.
- 6 KNOWLES, D.P. JR.; PERRYMAN, L.E.; KAPPMAYER, L.S., **et al.** Detection of equine
7 antibody to *Babesia equi* merozoite proteins by a monoclonal antibody-based competitive
8 inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Clin. Microbiol.** 29, 2056–2058. 1991.
- 9 KOUAM, M.K.; KANTZOURA, V.; GAJADHAR, A.A., **et al.** Seroprevalence of equine
10 piroplasms and host-related factors associated with infection in Greece. **Vet. Parasitol.** 169
11 (3-4), 273-278. 2010.
- 12 KUMAR, S.; KUMAR, R.; SUGIMOTO, C. A perspective on *Theileria equi* infections in
13 donkeys. **Jpn. J. Vet. Res.** 56 (4), 171-180. 2009.
- 14 LAUS, F.; VERONESI, F.; PASSAMONTI, F., **et al.** Prevalence of tick borne pathogens in
15 horses from Italy. **J. Vet. Med.Sci.** 75(6), 715-720. 2013.
- 16 LEVINE, N.D. The Protozoan Phylum Apicomplexa. Vol. 2. **CRC Press, Boca Raton.** 1988.
17 154 p.
- 18 LIU, Q.; MELI, M.L.; ZHANG, Y., **et al.** Sequence heterogeneity in the 18S rRNA gene in
19 *Theileria equi* from horses presented in Switzerland. **Vet Parasitol.** May 15; 221:24-9. 2016.
- 20 MACHADO, R.Z.; MONTASSIER, H.J.; PINTO, A.A., **et al.** An enzyme-linked
21 immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle.
22 **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 71, p.17-26, 1997.
- 23 MACHADO, R.Z.; TOLEDO, C.Z.P.; TEIXEIRA, M.C.A., **et al.** Molecular and serological
24 detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in donkeys (*Equus asinus*) in Brazil.
25 **Veterinary Parasitology**, 186, 461– 465. 2012.

- 1 MATJILA, P.T.; LEISEWITZ, A.L.; OOSTHUIZEN, M.C., **et al.** Detection of a *Theileria*
2 species in dogs in South Africa. **Veterinary Parasitology** 157; 34–40. 2008.
- 3 MATTAR, F. Pesquisa de marketing. São Paulo, **Atlas**. 336p. 1996.
- 4 MEHLHORN, H. & SCHEIN, E. Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria*
5 *equi* Mehlhorn, Schein 1998. **Parasitol Res.** 1998; 84:467–475.
- 6 MERKLE, F.J. Untersuchungen über die Brauchbarkeit von KBR, IFAT, und ELISA zur
7 nachweis der *Babesia caballi* – infectionen des Pferdes. **Dissertação (Mestrado em**
8 **Medicina Veterinária)** – Universidade de Hannover, Alemanha, 1983.
- 9 MILLER, M.A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. “Creating the CIPRES science gateway
10 for inference of large phylogenetic trees”, **in: Proceedings of the Gateway Computing**
11 **Environments Workshop (GCE)**, New Orleans, LA, 1-8, 2010.
- 12 MORETTI, A.; MANGILI, V.; SALVATORI, R., **et al.** Prevalence and diagnosis of *Babesia*
13 and *Theileria* infections in horses in Italy: A preliminary study. **The Veterinary Journal**,
14 184, 346–350. 2010.
- 15 NAGORE, D.; GARCIA-SANMARTIN, J.; GARCIA-PEREZ, A.L., **et al.** Detection and
16 identification of equine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blotting:
17 epidemiological survey and phylogenetic analysis. **Vet. Parasitol.** 123, 41–54. 2004.
- 18 NAVA, S.; BEATI, L.; LABRUNA, M.B., **et al.** Reassessment of the taxonomic status of
19 *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species,
20 *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n.
21 sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844, and *Amblyomma sculptum*
22 Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). **Ticks Tick Borne Dis.** Apr; 5(3):252-76. 2014.
- 23 NIJHOF, A.M.; PILLAY, V.; STEYL, J., **et al.** Molecular characterization of *Theileria*
24 species associated with mortality in four species of African antelopes. **J. Clin. Microbiol.** 43.
25 5907-5911. 2005.

- 1 NIZOLI, L.Q. Alterações hematológicas e humorais de equinos expostos à infecção por
2 *Babesia equi*, na região sul do Rio Grande do Sul. **Dissertação apresentada na**
3 **Universidade Federal de Pelotas.** 2005.
- 4 OOSTHUIZEN, M.C.; ZWEYGARTH, E.; COLLINS, N.E., **et al.** Identification of a novel
5 *Babesia* sp. from a sable antelope (*Hippotragus niger* Harris, 1838). **J. Clin. Microbiol.** 46,
6 2247–2251. 2008.
- 7 PARREIRA, D.R.; JANSEN, A.M.; ABREU, U.G., **et al.** Health and epidemiological
8 approaches of *Trypanosoma evansi* and equine infectious anemia virus in naturally infected
9 horses at southern Pantanal. **Acta Trop.** Nov; 163:98-102. 2016.
- 10 PFEIFER, B.I.; BOSE, R.; PEYMANN, B., **et al.** Epidemiological aspects of equine
11 babesioses in a herd of horses in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.58, p.1-8, 1995.
- 12 PHIPPS, L.P. & OTTER, A. Transplacental transmission of *Theileria equi* in two foals born
13 and reared in the United Kingdom. **Vet Rec**; 154:406–408. 2004.
- 14 POSNETT, E.S.; FEHRSEN, J.; DE WAAL, D.T., **et al.** Detection of *Babesia equi* infected
15 horses and carrier animals using a DNA probe. **J Vet Parasitol.** 39:19–32. 1991.
- 16 QABLAN, M.; OBORNÍK, M.; PETRŽELKOVÁ, K.J., **et al.** Infections by *Babesia caballi*
17 and *Theileria equi* in Jordanian equids: epidemiology and genetic diversity. **Parasitology.**
18 Aug; 140(9):1096-103. 2013.
- 19 R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R
20 Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. **ISBN 3-900051-07-0**, URL
21 <http://www.R-project.org/>. 2011.
- 22 RAMOS, V.doN.; OSAVA, C.F.; PIOVEZAN, U., **et al.** Complementary data on four
23 methods for sampling free-living ticks in the Brazilian Pantanal. **Rev Bras Parasitol Vet.**
24 Dec;23(4):516-21. 2014.

- 1 RAZMI, G.R.; NAGHIBI, A.; ASLANI, M.R. An epidemio-logical study on ovine babesiosis
2 in the Mashhad suburb area, province of Khorasan, Iran. **Vet Parasitol**; 108(2): 109-115.
3 2002.
- 4 REZENDE, J. Cultivo de Esporocinetos de *Babesia bigemina* em Hemócitos e Células
5 Embrionárias de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Tese de Doutorado**. Universidade
6 Federal Rural do Rio de Janeiro Instituto de Veterinária. Curso de Pós-graduação em Ciências
7 Veterinárias. 2012.
- 8 RIBEIRO, M.F.; COSTA, J.O.; GUIMARÃES, A.M. Epidemiological aspects of *Babesia*
9 *equi* in horses in Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Research Communications**, v.23, p.385-
10 390, 1999.
- 11 RIBEIRO, C.R.; FAGLIARI, J.J.; GALERA, P.D., **et al.** Hematological profile of healthy
12 Pantaneiro horses. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.60, n.2, p.492-495, 2008.
- 13 ROBY, T.O. & ANTHONY, D.W. Transmission of equine piroplasmosis by *Dermacentor*
14 *nitens* Neumann. **J Am Vet Med Assoc** 1963; 142:768–769.
- 15 RONCATI, N.V. Ocorrência de *Theileria equi* congênita em potros Puro Sangue Lusitano no
16 Brasil, diagnosticada através da técnica RT-PCR. 2006, 69f. **(Doutorado)** – Faculdade de
17 Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 18 ROS-GARCIA, A.; M'GHIRBI, Y.; HURTADO, A., **et al.** Prevalence and genetic diversity
19 of piroplasm species in horses and ticks from Tunisia. **Infection, Genetics and Evolution**,
20 17, 33- 37. 2013.
- 21 RÜEGG, S.R.; TORGERSON, P.; DEPLAZES, P., **et al.** Age-dependent dynamics of
22 *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in southwest Mongolia based on IFAT and/or
23 PCR prevalence data from domestic horses and ticks. **Parasitology**. 134, 939-398 947. 2007.
- 24 RÜEGG, S.R.; HEINZMANN, D.; BARBOUR, A.D., **et al.** Estimation of the transmission
25 dynamics of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses. **Parasitology** 135, 555–565. 2008.

- 1 SADEGHI DEHKORDI, Z.; ZAKERI, S.; NABIAN, S. Molecular and biomorphometrical
2 identification of ovine babesiosis in Iran. **Iranian J Parasitol**; 5(4): 21-30. 2010.
- 3 SALIB, F.A.; YOUSSEF, R.R.; RIZK, L.G., **et al.** Epidemiology, diagnosis and therapy of
4 *Theileria equi* infection in Giza, Egypt. **Vet World**. 2013;6(2):76–82.
- 5 SALIM, B.; BAKHEIT, M.A.; KAMAU, J., **et al.** Nucleotide sequence heterogeneity in the
6 small subunit ribosomal RNA gene within *Theileria equi* from horses in Sudan. **Parasitol**
7 **Res. Jan**; 106(2):493-8. 2010.
- 8 SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating
9 inhibitors. **Biotechnology**. 1992; 24:104-8. 1977.
- 10 SCHIFFMAN, L. & KANUK, L. Comportamento do consumidor. Rio de Janeiro, **LTC**
11 **Editora**, 475p. 2000.
- 12 SCHNITTGER, L.; RODRIGUEZ, A.E.; FLORIN-CHRISTENSEN, M., **et al.** *Babesia*: A
13 world emerging. **Infect Genet Evol**, 12(8):1788–1809. 2012.
- 14 SCHREEG, M.E.; MARR, H.S.; TARIGO, J.L., **et al.** Mitochondrial Genome Sequences and
15 Structures Aid in the Resolution of Piroplasmida phylogeny. **PLoS One**. 2016 Nov 10;11(11).
- 16 SCHWINT, O.N.; UETI, M.W.; PALMER, G.H., **et al.** Imidocarb dipropionate clears
17 persistent *Babesia caballi* infection with elimination of transmission potential. **Antimicrob**
18 **Agents Chemother**; 53: 4327–4332. 2009.
- 19 SCOLES, G. & UETI, M.W. Vector ecology of equine piroplasmosis. **Annu. Rev. Entomol.**
20 60, 561–580, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-021110>. 2015.
- 21 SHKAP, V.; COHEN, I.; LEIBOVITZ, B., **et al.** Seroprevalence of *Babesia equi* among
22 horses in Israel using competitive inhibition ELISA and IFA assays. **Vet Parasitol**. 76:251–9.
23 1998.
- 24 SHORT, M.A.; CLARK, C.K.; HARVEY, J.W. **et al.** Outbreak of equine piroplasmosis in
25 Florida. **J Am Vet Med Assoc**. 2012 Mar 1;240(5):588-95.

- 1 SINK, C.A. & FELDMAN, B.F. Urinálise e hematologia: Laboratorial para o clínico de
2 pequenos animais. São Paulo-SP: **ROCA**, Cap. 5 - P. 77. 2006.
- 3 STAMATAKIS, A; HOOVER, P.; ROUGEMONT, J. A Rapid Bootstrap Algorithm for the
4 RAxML Web Servers. **Syst. Biol.** 57(5):758–771, 2008.
- 5 THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. Improving the sensitivity of progressive
6 multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and
7 weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.
- 8 UETI, M.W.; PALMER, G.H.; SCOLES, G.A., **et al.** Persistently infected horses are
9 reservoirs for intrastadial tick-borne transmission of the Apicomplexan Parasite *Babesia equi*.
10 **Infection and Immunity**, v. 76, p. 3525- 3529, 2008.
- 11 VERONESI, F.; MORGANTI, G.; RAVAGNAN, S., **et al.** Molecular and serological
12 detection of tick-borne pathogens in donkeys (*Equus asinus*) in Italy. **Vet Microbiol.** Oct
13 10;173(3-4):348-54. 2014.
- 14 VIAL, H.J. & GORENFLOT, A. Chemotherapy against babesiosis. **Vet. Parasitol.** 138, 147–
15 160. 2006.
- 16 VIEIRA, T.S.; VIEIRA, R.F.; FINGER, M.A., **et al.** Seroepidemiological survey of *Theileria*
17 *equi* and *Babesia caballi* in horses from a rural and from urban areas of Paraná State,
18 southern Brazil. **Ticks Tick Borne Dis.** x Dec;4(6):537-41. 2013.
- 19 VRANOVÁ, M.; ALLOGGIO, I.; QABLAN, M., **et al.** Genetic diversity of the classII major
20 histocompatibility DRA locus in European Asiatic and African domestic donkeys. **Infect.**
21 **Genet. Evol.** 11, 1136–1141, 2011.
- 22 WEILAND, G. Species-specific serodiagnosis of equine piroplasma infections by means of
23 complement fixation test (CFT), immunofluorescence (IIF), and enzyme-linked
24 immunosorbent assay (ELISA). **Vet Parasitol**, 20:43–48. 1986.

1 WISE, L.N.; KAPPMAYER, L.S.; MEALEY, R.H., **et al.** Review of equine piroplasmosis. J
2 **Vet Intern Med**, 27(6): 1334-46, 2013.

3 XUAN, X.; NAGAI, A.; BATTSETSEG, B.; FUKUMOTO, S., **et al.** Diagnosis of equine
4 piroplasmosis in Brazil by serodiagnostic methods with recombinant antigens. **Journal of**
5 **Veterinary Medical Science**, v.63, p.1159-1160, 2001.

6 ZINORA, A.; COOMBS, D.K.; MOHAMMAD, F., **et al.** A serological study of *Babesia*
7 *cabali* and *Theileria equi* in Thoroughbreds in Trinidad. **Vet. Parasitol.** 144, 167–171. 2007.

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

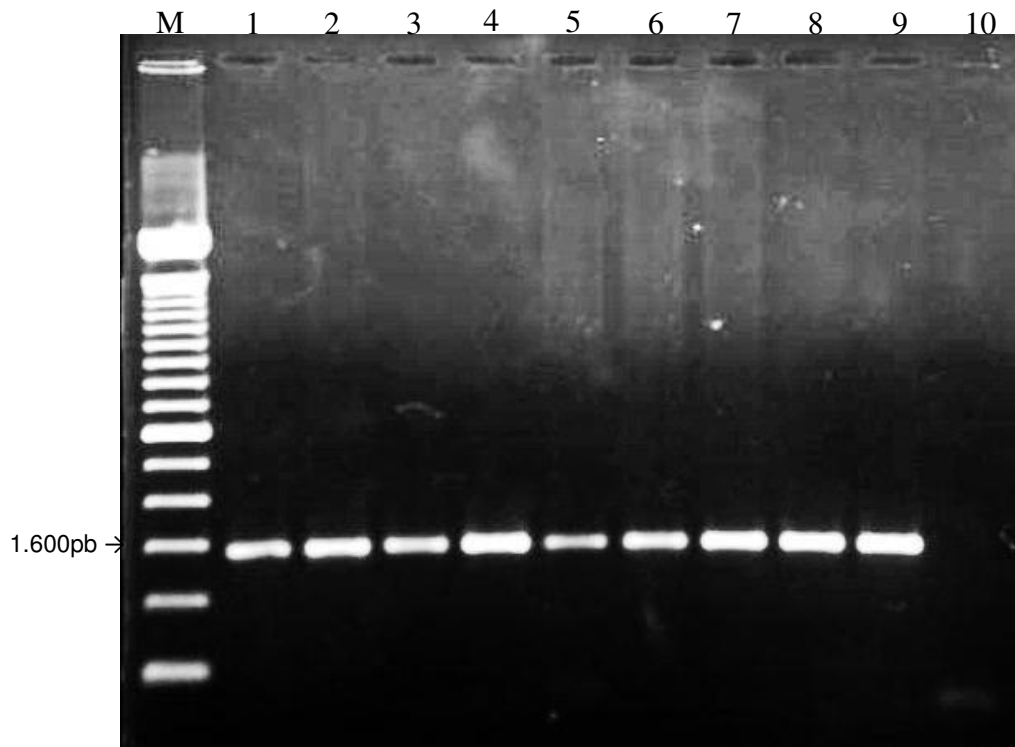
24

25

1

LISTA DE FIGURAS

2



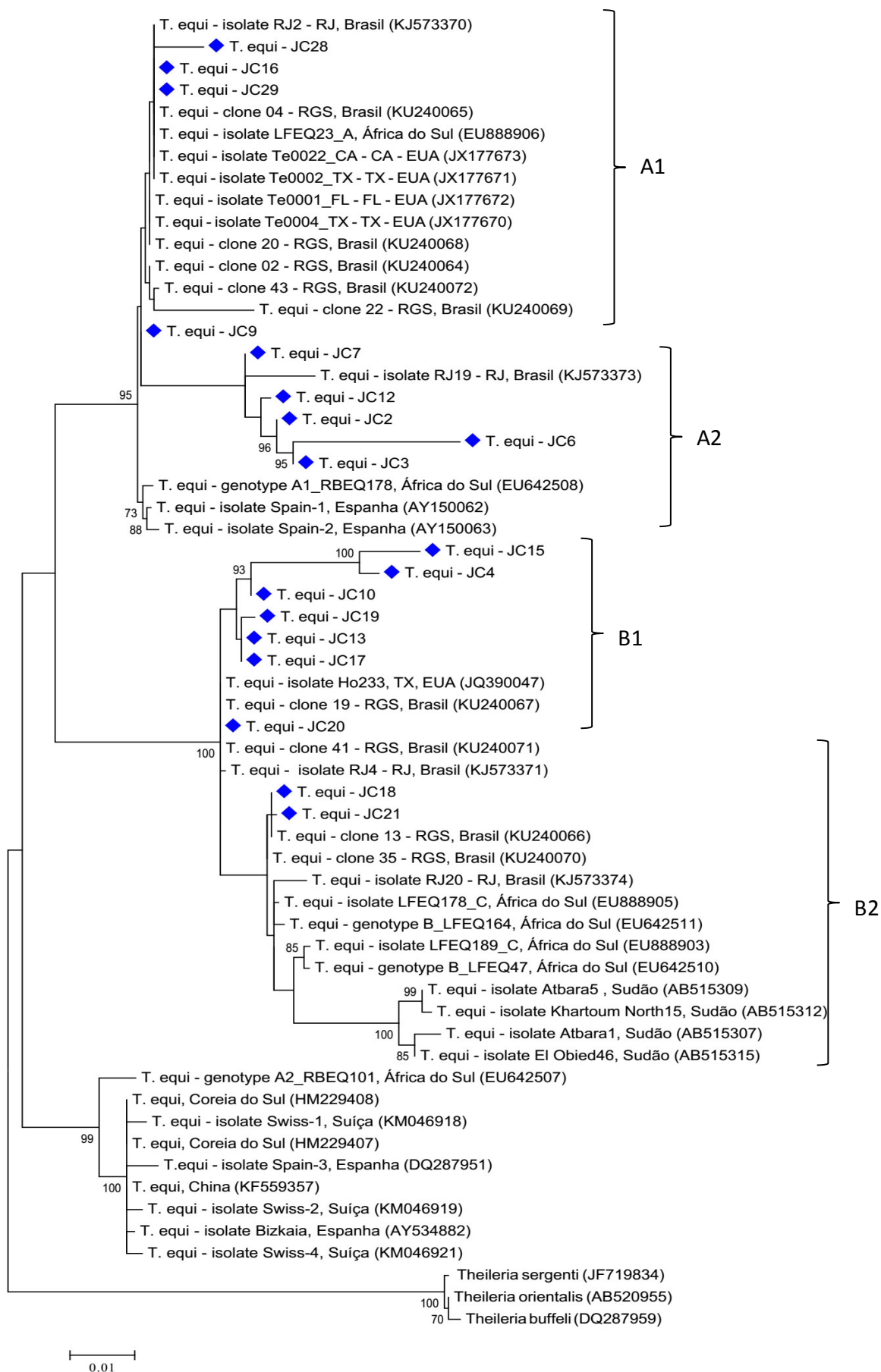
3

4

5

6

Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 0,9% de amplicons relativos à PCR para piroplasmas de equinos utilizando os primers NBabesia-1F/18SREV-TB resultando em um fragmento de 1.600 pb. M: marcador de peso molecular de 1Kb plus; 1: Controle positivo (Amostra de Jaboticabal); 2-9: amostras testes de equinos pantaneiros; 10: Controle negativo (água ultra-pura esterilizada).



1

Figura 2: Árvore filogenética de seqüências do gene 18S rRNA de *T. equi*. A análise foi realizada utilizando-se o método de *Maximum Likelihood* implementada com o modelo de substituição GTR+G+I. Os números nos ramos correspondem a valores de *bootstraps* acessados com 1.000 repetições. Seqüências do 18S rRNA de *Theileria sergenti*, *Theileria orientalis* e *Theileria buffeli*, foram utilizadas como *outgroup*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição dos primers utilizados nas análises moleculares de piroplasmídeos de equinos baseados no gene 18S rRNA.

AGENTE	SEQUÊNCIA DO OLIGONUCLEOTÍDEO	TAMANHO	REFERÊNCIA
NBabesia1F	AAGCCATGCATGTCTAAGTATAAGCTTTT	29	Oosthuizen et al. (2008)
18SRev-TB	GAATAATTCACCGGATCACTCG	22	Matjila et al. (2008)
BT18S3F	GGGCATTCGTATTTAACTGTCAGAGG	26	Oosthuizen et al. (2008)
BT18S3R	CCTCTGACAGTTAAATACGAATGCCC	26	Não publicado
BT18S2F	GGGTTCGATTCCGGAGAGGG	20	Oosthuizen et al. (2008)
BT18S2R	CCCGTGTTGAGTCAAATTAAGCCG	24	Matjila et al. (2008)

Tabela 2: Frequência de anticorpos IgG de *T. equi* e *B. caballi* em equinos residentes do Pantanal Sul Matogrossense, junho a julho de 2014 e julho a agosto de 2015. Os resultados estão expressos pelo número total de positivos seguido pelo valor percentual para cada categoria com intervalo de confiança (IC).

Categorias	Animais Amostrados	Soroprevalência		Soroprevalência		Soroprevalência	
		<i>T. equi</i>	IC (95%)	<i>B. caballi</i>	IC (95%)	Coinfecção	IC (95%)
Machos de Serviço	41	39 (95,1) ^a	82-99	34 (82,9) ^a	67-92	34 (82,9)	67-92
Fêmeas de Serviço	54	44 (81,5) ^a	68-90	44 (81,5) ^a	68-90	42 (77,7)	64-88
Fêmeas em Reprodução	39	16 (41,0) ^b	26-58	8 (20,5) ^b	10-37	6 (15,3)	6-31
Potros	36	6 (16,7) ^c	7-33	4 (11,1) ^c	4-27	2 (5,5)	1-20
Total	170	105 (61,8)	54-69	90 (52,90)	45-61	84 (49,4)	42-57

As letras b e c correspondem a valores estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$).

Tabela 3: Detecção molecular de piroplasmídeos de equinos residentes do Pantanal Sul Matogrossense, junho a julho de 2014 e julho a agosto de 2015. Os resultados estão expressos pelo número de positivos, seguido pelo número total de animais para cada categoria e pelo valor percentual para cada categoria com intervalo de confiança (IC).

Categorias	Animais amostrados	Ocorrência de piroplasmas de equinos	IC (95%)
Machos de Serviço	6/41	14,6 ^a	6-30
Fêmeas de Serviço	14/54	25,9 ^a	15-40
Fêmeas em Reprodução	23/39	59,0 ^b	42-74
Potros	31/36	86,1 ^c	70-95
Total	74/170	43,5	36-51

As letras b e c correspondem a valores estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$).

1 **Tabela 4:** Valores das médias seguido do desvio padrão de contagem de hemácias e volume
 2 globular nas categorias de equinos amostrados no Pantanal Sul Matogrossense, junho a julho
 3 de 2014 e julho a agosto de 2015.

VALORES HEMATOLÓGICOS			
Categorias	N	He/mm ³ (10 ⁶)	VG
Machos de Serviço	41	7,0 ± 1,8	35 (± 4)
Fêmeas de Serviço	54	7,3 ± 1,9	37 (± 5)
Fêmeas em Reprodução	39	6,8 ± 1,4	37 (± 6)
Potros	36	8,6 ± 1,9*	40 (± 4)

4 *diferença significativa (p<0,05)

5

6 **Tabela 5:** Número de animais seguido de prevalência, por categoria com infestações simples
 7 e coinfeições de espécies de carrapatos ixodídeos coletados nos equinos residentes do
 8 Pantanal Sul Matogrossense, junho a julho de 2014 e julho a agosto de 2015.

ESPÉCIES DE CARRAPATOS	MACHOS DE SERVIÇO (%)	FÊMEAS DE SERVIÇO (%)	FÊMEAS EM REPRODUÇÃO (%)	POTROS (%)
<i>Dermacentor nitens</i>	5 (12,2%)	13 (24,1%)	14 (35,9%)	12 (27,9%)
<i>Amblyomma sculptum</i>	2 (4,9%)	3 (5,6%)	8 (20,5%)	-
<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	-	1 (1,9%)	-	5 (13,9%)
<i>R. (B.) microplus + D. nitens</i>	-	2 (3,7%)	1 (2,6%)	4 (11,1%)
<i>A. sculptum + D. nitens</i>	-	3 (5,6%)	4 (10,3%)	1 (2,8%)
<i>R. (B.) microplus + A. sculptum</i>	-	1 (1,9%)	1 (2,6%)	1 (2,8%)
<i>R. (B.) microplus + A. sculptum + D. nitens</i>	-	1 (1,9%)	6 (15,4%)	-
Total	7 (17,1%)	24 (44,4%)	34 (87,2%)	23 (63,9%)

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO REVISTA CIÊNCIA RURAL

1. CIÊNCIA RURAL - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias, que deverão ser destinados com exclusividade.

2. Os artigos científicos, revisões e notas devem ser encaminhados via eletrônico e editado **preferencialmente em idioma Inglês**. Os encaminhados em Português poderão ser traduzidos após a 1ª rodada de avaliação para que ainda sejam revisados pelos consultores ad hoc e editor associado em rodada subsequente. Entretanto, caso **não traduzidos** nesta etapa e se **aprovados** para publicação, terão que ser **obrigatoriamente traduzidos para o Inglês** por empresas credenciadas pela Ciência Rural e obrigatoriamente terão que apresentar o certificado de tradução pelas mesmas para seguir tramitação na CR.

Empresas credenciadas:

-American Journal Express (<http://www.journalexperts.com/>)

-Bioedit Scientific Editing (<http://www.bioedit.co.uk/>)

-BioMed Proofreading (<http://www.biomedproofreading.com>)

-Edanz (<http://www.edanzediting.com>)

-Editage (<http://www.editage.com.br/>) 10% discount for CR clients. Please inform Crural10 code.

-Enago (<http://www.enago.com.br/forjournal/>) Please inform CIRURAL for special rates.

1 -GlobalEdico (<http://www.globaledico.com/>)

2 -JournalPrep (<http://www.journalprep.com>)

3 -Paulo Boschcov (paulo@bridgetextos.com.br, bridge.textecn@gmail.com)

4 -Proof-Reading-Service.com (<http://www.proof-reading-service.com/pt/>)

5

6 **As despesas de tradução serão por conta dos autores.** Todas as linhas deverão
7 ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado
8 em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por página em espaço
9 duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times
10 New Roman e tamanho 12. O máximo de páginas será **15 para artigo científico, 20**
11 **para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras.**
12 Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados ao final do texto e
13 individualmente por página, sendo que não poderão ultrapassar as margens e **nem**
14 **estar com apresentação paisagem.**

15

16 **3. O artigo científico** (Modelo .doc, .pdf) **deverá conter os seguintes**
17 **tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words;
18 Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão;
19 Conclusão e Referências; Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição;
20 Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das
21 referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente**
22 **devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já**
23 **na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado
24 (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).

1 **4. A revisão bibliográfica** (Modelo .doc, .pdf) **deverá conter os seguintes**
2 **tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words;
3 Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; e Referências. Agradecimento(s) e
4 Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e
5 Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres**
6 **humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação**
7 **de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser
8 enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo
9 Animal).

10

11 **5. A nota** (Modelo. doc. pdf) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título
12 (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem
13 subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e
14 conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências. Agradecimento(s) e
15 Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e
16 Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres**
17 **humanos e animais obrigatoriamente deve apresentar parecer de aprovação de**
18 **um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser
19 enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo
20 Animal).

21

22 **6.** O preenchimento do campo "**cover letter**" deve apresentar, obrigatoriamente, as
23 seguintes informações em inglês, **exceto** para artigos **submetidos em**
24 **português** (lembrando que preferencialmente os artigos devem ser submetidos em
25 inglês).

- 1 **a)** What is the major scientific accomplishment of your study?
2 **b)** The question your research answers?
3 **c)** Your major experimental results and overall findings?
4 **d)** The most important conclusions that can be drawn from your research?
5 **e)** Any other details that will encourage the editor to send your manuscript for
6 review?

7

8 Para maiores informações acesse o seguinte tutorial.

9

10 **7.** Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato
11 pdf no endereço eletrônico da revista www.scielo.br/cr.

12

13 **8.** Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês
14 e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do
15 artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e
16 nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando
17 estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e
18 demais seções quando necessários.

19

20 **9.** As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas
21 seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de
22 acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996),
23 como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

1 **10.** Nesse [link](#) é disponibilizado o **arquivo de estilo** para uso com o
2 software **EndNote** (o EndNote é um software de gerenciamento de referências,
3 usado para gerenciar bibliografias ao escrever ensaios e artigos).

4

5 **11.** As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000)
6 conforme normas próprias da revista.

7

8 **11.1.** Citação de livro:

9 JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia : Saunders,
10 1985. 2v.

11 TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a**
12 **bovinos e outros herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.

13

14 **11.2.** Capítulo de livro com autoria:

15 GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH,
16 D.E. **The thyroid**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

17

18 **11.3.** Capítulo de livro sem autoria:

19 COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: _____. **Sampling techniques**.
20 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.

21 TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: _____. **Técnicas cirúrgicas**
22 **em animais de grande porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

23

24

25

1 **11.4.** Artigo completo:

2 O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de
3 identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:

4 MEWIS, I.; ULRICH, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different
5 stages of the stored product pests *Tribolium confusum* (Coleoptera:
6 Tenebrionidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus*
7 *granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera:
8 Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdam (Cidade opcional),
9 v.37, p.153-164, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)
10 [474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Acesso em: 20 nov. 2008. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-
11 3.

12 PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Response of *Sitophilus*
13 *oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Oryzaephilus*
14 *surinamensis* (L.) to different concentrations of diatomaceous earth in bulk stored
15 wheat. **Ciência Rural**, Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov.
16 2008. Disponível em:
17 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso)
18 [84782008000800002&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em: 25 nov. 2008. doi:
19 10.1590/S0103-84782008000800002.

20

21 **11.5.** Resumos:

22 RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional
23 de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1.,
24 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e
25 Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236.

1 **11.6.** Tese, dissertação:

2 COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas características digestivas entre**
3 **bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad).** 1986. 132f.
4 Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) -
5 Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

6

7 **11.7.** Boletim:

8 ROGIK, F.A. **Indústria da lactose.** São Paulo : Departamento de Produção Animal,
9 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).

10

11 **11.8.** Informação verbal:

12 Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre
13 parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal).
14 Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do
15 autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi
16 emitida a informação.

17

18 **11.9.** Documentos eletrônicos:

19 MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as**
20 **possibilidades do tratamento cirúrgico.** São Paulo : Departamento de Cirurgia,
21 FMVZ-USP, 1997. 1 CD.

22 GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL ANIMAL
23 VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech
24 Republic. **Proceedings...** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Acessado em 12 fev.

- 1 2007. Online. Disponível em:
2 <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>
3 UFRGS. **Transgênicos**. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais.
4 Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em:
5 <http://www.zh.com.br/especial/index.htm>
6 ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and
7 conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland),
8 v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000.
9 Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: [http://www.](http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm)
10 [Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm](http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm)
11 MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de
12 recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In:
13 SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997,
14 Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias -
15 UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC.
16
17 **12.** Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de
18 ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras
19 devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos figuras e
20 gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico
21 sempre em qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas
22 devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e
23 não devem exceder uma lauda.
24

1 **13.** Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade
2 do(s) autor(es).

3

4 **14.** Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O
5 artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente,
6 mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser
7 utilizado.

8

9 **15.** Lista de verificação (Checklist. doc. pdf).

10

11 **16.** Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

12

13 **17.** Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o
14 encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.

15

16 **18.** Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-
17 se à Comissão Editorial.

18

19 **19.** Todos os artigos encaminhados devem pagar a taxa de tramitação. Artigos
20 reencaminhados (**com decisão de Reject and Resubmit**) deverão pagar a taxa de
21 tramitação novamente. Artigos arquivados por **decurso de prazo** não terão a taxa
22 de tramitação reembolsada.

23

24 **20.** Todos os artigos submetidos passarão por um processo de verificação de plágio
25 usando o programa "Cross Check".