

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
CAMPUS ROLIM DE MOURA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

ANDERSON FERNANDES SOFFA

PIROPLASMAS EM EQUINOS NO MUNICÍPIO DE ROLIM DE MOURA-RO

Rolim de Moura-RO
2019

ANDERSON FERNANDES SOFFA

PIROPLASMAS EM EQUINOS NO MUNICÍPIO DE ROLIM DE MOURA-RO

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado à Fundação Universidade Federal de Rondônia, *Campus* Rolim de Moura, como requisito parcial para conclusão de curso de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientadora: Profa. Dra. Mayra Araguaia Pereira Figueiredo.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Fundação Universidade Federal de Rondônia
Gerada automaticamente mediante informações fornecidas pelo(a) autor(a)

S681p Soffa, Anderson Fernandes.

Piroplasmas em equinos no município de Rolim de Moura-RO / Anderson Fernandes Soffa. -- Rolim de Moura, RO, 2019.

44 f. : il.

Orientador(a): Prof.ª Dra. Mayra Araguaia Pereira Figueiredo.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) -
Fundação Universidade Federal de Rondônia

1.Babesia caballi. 2.Theileria equi. 3.PCR. 4.ELISA. 5.hemoparasitos. I.
Figueiredo., Mayra Araguaia Pereira. II. Título.

CDU 636.046.2

Bibliotecário(a) Nágila N. Chaves

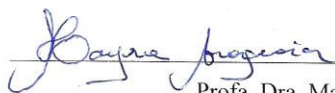
CRB 6/363

ANDERSON FERNANDES SOFFA

PIROPLASMAS EM EQUINOS NO MUNICÍPIO DE ROLIM DE MOURA-RO

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi submetido ao processo de avaliação pela Banca Examinadora como requisito parcial para obtenção do Grau de Bacharel em Medicina Veterinária no dia 01 de julho de 2019.

BANCA EXAMINADORA



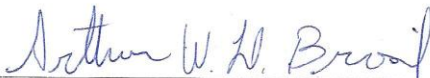
02 / 07 / 2019

Profa. Dra. Mayra Araguaia Pereira Figueiredo

Orientadora

Universidade Federal de Rondônia

Campus Rolim de Moura-RO




02 / 07 / 2019

Prof. Dr. Arthur Willian de Lima Brasil

Universidade Federal de Rondônia

Campus Rolim de Moura-RO



02 / 07 / 2019

Prof. Dr. Nadino Carvalho

Universidade Federal de Rondônia

Campus Rolim de Moura-RO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me capacitado, dado força nos momentos difíceis durante esta jornada, e por me fazer entender que existimos para sermos vencedores mediante a vontade de Deus.

Agradeço a minha família, especialmente a meu pai, Antônio Soffa, e minha mãe, Eny Fernandes da Silva Soffa, por terem me dado todo o suporte necessário. Amo vocês!

Agradeço aos proprietários por disponibilizarem seus animais para as coletas do trabalho, obrigado!

Agradeço a todos os docentes que contribuíram para minha formação profissional e pessoal. Que Deus abençoe a todos.

Agradeço aos professores, Arthur Willian de Lima Brasil e Nadino Carvalho, por aceitarem compor a banca examinadora.

Agradeço as minhas companheiras do grupo de estudo: Fernanda dos Santos Cândido, Ingrid Letícia Pereira de Freitas, Juliana Sales Fernandes, Leidiane Maximiano de Cerqueira, Lorrynne Rodrigues, Mariana Moreira dos Anjos e Maxsiele Vieira da Silva, muitíssimo obrigado!

Meus agradecimentos especiais a Leidiane Maximiano de Cerqueira, Ingrid Letícia Pereira de Freitas, Matheus Caraline de Almeida Castelo Branco, Lorrynne Rodrigues, Maxsiele Vieira da Silva, Donizete Dalaqua, Sr. Figueiredo e Kayuan Policarpo, pelo auxílio nas coletas para a realização deste trabalho.

Agradeço especialmente a minha orientadora Prof. Dra. Mayra Araguaia Pereira Figueiredo, pelas ricas orientações, e por todo o auxílio necessário para a execução deste trabalho, muitíssimo obrigado. Que Deus retribua em dobro.

Sucesso é algo que você atrai pela pessoa que se torna.
Jim Rohn

RESUMO

Os piroplasmas, *Babesia* e *Theileria*, são hemoparasitos transmitidos por carrapatos que infectam mamíferos e aves, e que são reconhecidos por seu grande impacto na saúde de animais de produção e de companhia, estando associados com altos custos econômicos em todo o mundo. Acrescente ao fato, das infecções por piroplasmas serem fatais se associadas à práticas estressantes e inadequadas de manejo. As piroplasmoses equinas, *Babesia caballi* e *Theileria equi*, apresentam como consequência, do seu ciclo de vida nos eritrócitos dos equinos, queda no desempenho, restrição no trânsito para competições internacionais, bem como à comercialização de animais soropositivos para o exterior. Dessa forma, considerando a importância do diagnóstico de hemoparasitos em equinos no cenário mundial, objetivou-se identificar piroplasmas em amostras de sangue de equinos no município de Rolim de Moura/RO. Para tal, foram amostrados 80 equinos com idade entre um e quinze anos, independente de idade, raça, sexo tipo de criação e se havia contato com animais de outras espécies. A colheita de sangue foi realizada por meio de venopunção da jugular e o sangue depositado em tubos com EDTA, para uso em técnica de PCR, em tubo sem anticoagulante, para ELISA-teste, e outra parte usada para o preparo de gota espessa e esfregaço sanguíneo. Foram soropositivos para *B. caballi* no ELISA-teste 15 amostras, e 29 amostras para *T. equi*. Na PCR, usando o gene 18S rRNA para *Babesia/Theileria*, 11 amostras de DNA, de 33 testadas, foram positivas. Das 160 lâminas preparadas, 80 de esfregaço sanguíneo e 80 de gota espessa, em 10 lâminas de esfregaço sanguíneos encontrou-se formas sugestivas de piroplasma. No Brasil, a maioria dos equinos entram em contato com os piroplasmas desde os primeiros dias de vida, sendo esta, provavelmente, a principal doença infecto-parasitária desses animais. Os testes sorológicos são utilizados como métodos mais sensíveis ao diagnóstico das piroplasmoses equinas, e nesse trabalho comprovou-se a circulação dos piroplasmas *Babesia caballi* e *Theileria equi* em equinos no município de Rolim de Moura-RO.

Palavras-chave: *Babesia caballi*, *Theileria equi*, PCR, ELISA, hemoparasitos.

ABSTRACT

The piroplasms, *Babesia* and *Theileria*, are tick-transmitted that infect mammals and birds, and are recognized for their great impact on the health of production and companion animals, being associated with high economic costs worldwide. In addition, piroplasm infections are fatal if associated with stressful and inadequate management practices. Equine piroplasmosis, *Babesia caballi* and *Theileria equi*, have as consequence of their life cycle in equine erythrocytes, a decrease in performance, a restriction in traffic for international competitions, as well as the commercialization of seropositive animals abroad. Considering the importance of the diagnosis of hemoparasites in horses in the world scenario, the objective was to identify piroplasms in blood samples from horses in the municipality of Rolim de Moura/RO. For this, 80 horses were sampled, aged between one and fifteen years, regardless of age, race, breeding type sex and contact with animals of other species. The blood collection was performed by means of venipuncture of the jugular and blood deposited in EDTA tubes for use in PCR technique, in tube without anticoagulant, for indirect ELISA test, and another part used for the preparation of thick smear and smear blood. Seropositive for *B. caballi* in the indirect ELISA test 15 samples, and 29 samples for *T. equi*. In PCR using the 18S rRNA gene for *Babesia/Theileria*, 15 DNA samples from 33 tested were positive. A total of 160 slides were prepared, 80 of blood smear and 80 of thick slides, and in 10 blood smear blades there were forms suggestive of piroplasm. In Brazil, most of the horses come into contact with the piroplasms from the first days of life, which is probably the main infectious-parasitic disease of these animals. Serological tests are used as methods more sensitive to the diagnosis of equine piroplasmosis, and in this work the circulation of the piroplasms *Babesia caballi* and *Theileria equi* in horses in the municipality of Rolim de Moura-RO was confirmed.

Keywords: *Babesia caballi*, *Theileria equi*, PCR, ELISA, hemoparasites.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esfregaço sanguíneo de cavalo: evidência de hemácia parasitada por trofozoítos de <i>Babesia caballi</i>	13
Figura 2 - Representação gráfica do ciclo biológico de <i>Babesia</i> spp.	14
Figura 3 - Esfregaço de amostra sanguínea em coloração pelo Giemsa: evidência de hemácia parasitada por merozoítos de <i>Theileria equi</i>	15
Figura 4 - Ciclo <i>Theileria equi</i> , demonstrando sua infecção inicial nos linfócitos e formação da Cruz de Malta nos eritrócitos.	16
Figura 5 - <i>Amblyomma cajennense</i> : caracterizado pela sua ornamentação característica no escudo.....	17
Figura 6 – <i>Dermacentor (Anocentor) nitens</i> conhecido popularmente como “carrapato de orelha” do cavalo.	177
Figura 7 - <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> : fêmea (esquerda) e macho (direita)	18
Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose dos DNA testados para gene endógeno de mamífero.	32
Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose dos DNA testados para gene 18S rRNA para <i>Babesia/Theileria</i>	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Soros de referência usados em todas as placas do ELISA-teste.	27
Tabela 2 - Sequências de oligonucleotídeos do gene endógeno de mamíferos, do gene para Babesia, condições de ciclagem e tamanhos de produtos de PCR.	28
Tabela 3 - Amostras positivas no ELISA-teste para <i>Babesia caballi</i> , o pontos de corte e a absorvância de cada soro.....	30
Tabela 4 - Amostras positivas no ELISA-teste para <i>Theileria equi</i> , o pontos de corte e a absorvância de cada soro.....	31

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1. <i>Babesia caballi</i>	13
2.2.1. Classificação Taxonômica.....	13
2.2.2. Ciclo Biológico.....	13
2.3. <i>Theileria equi</i>	14
2.3.1. Classificação Taxonômica.....	15
2.3.2. Ciclo Biológico.....	15
2.4. Transmissão.....	16
2.5. Aspectos epidemiológicos.....	18
2.6. Manifestações clínicas.....	19
2.7. Aspectos diagnósticos.....	20
2.8. Controle e profilaxia.....	21
3. JUSTIFICATIVA	22
4. OBJETIVOS.....	23
4.1. Objetivo Geral.....	23
4.2. Objetivo Específico.....	23
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
5.1. Ética.....	24
5.2. Delineamento da pesquisa.....	24
5.2.1. Área de estudo.....	24
5.2.2 População animal em estudo.....	24
5.2.3 Exame clínico.....	24
5.2.4. Colheita de sangue.....	25
5.3. Diagnóstico parasitológico.....	26

5.3.1 Esfregaço sanguíneo.....	26
5.3.2 Gota espessa.....	26
5.4. Diagnóstico sorológico: ELISA.....	26
5.5 Diagnóstico molecular	27
5.5.1 Extração de DNA de amostras de sangue de equinos	28
5.5.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	28
6. RESULTADOS	29
6.1 Exame clínico	29
6.2 Diagnóstico parasitológico.....	29
6.3 Diagnóstico sorológico: ELISA-teste.....	29
6.4 Diagnóstico molecular	32
6.5 Concordância entre os testes testes de ELISA e PCR	32
7. DISCUSSÃO	33
8. CONCLUSÃO	37
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
10. APÊNDICE I	43

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), o Brasil possui o quarto maior rebanho equino do mundo (5.501.872 milhões de cabeças) movimentando 16 bilhões de reais por ano, sendo responsável por gerar mais de três milhões de postos de trabalhos diretos e indiretos. (IBGE, 2017; LIMA, 2016).

A maior população brasileira de equinos encontra-se na Região Nordeste, seguidos pelas Regiões Sudeste, Centro-Oeste, Sul e Norte, tendo o Estado de Rondônia 164.607 cabeças e o município de Rolim de Moura 3.142 equinos. (IBGE, 2017).

Mesmo com a implantação de máquinas e ferramentas tecnológicas, o cavalo continua sendo essencial para o desenvolvimento de atividades pecuárias e agrícolas na maioria das propriedades rurais (LIMA, 2016). Para isso, o animal precisa estar em boas condições de saúde exigindo um bom manejo alimentar, sanitário e treinamento físico. (PIOTTO, 2009).

Os equinos quando acometidos por piroplasmose, que é causada por dois protozoários intraeritrocitários sanguíneos, *Babesia caballi* e *Theileria equi*, na qual podem ser infectados por uma ou até ambas simultaneamente (PHIPPS; OTTER, 2004). Na forma aguda causa anemia hemolítica progressiva, uma das principais características da doença. O animal também pode tornar-se portador assintomático, sendo fonte de infecção para o vetor (FEIJÓ et al., 2013; GUERRA, 2017).

Esta é uma das principais doenças que podem afetar os equinos, como consequência apresenta queda no desempenho das atividades laborais, restrição no trânsito para competições internacionais, e à comercialização de animais soropositivos para o exterior (SHKAP et al., 1998). Adicionalmente pode ser observado prejuízo na reprodução, sendo mais acentuada em potros neonatos (OLIVEIRA, 2016).

Sendo responsável por causar reabsorções embrionárias e abortos em éguas portadoras de *Babesia* spp., animais infectados apresentam febre, anemia, hepato e esplenomegalia, icterícia, além de que bilirrubinúria e hemoglobínúria podem surgir na fase final da doença (NANTES et al., 2008).

Através de estudos epidemiológicos realizados em equinos da América do Sul revelou-se infestação pelos carrapatos *Dermacentor (Anocentor) nitens* (carrapato de orelha), *Rhiphicephalus (Boophilus) microplus* (carrapato do boi) e *Amblyomma cajennense* (carrapato estrela, vermelhinho ou micuim) associados a altos níveis de infecção por *Babesia* (FRIEDHOOF et al., 1990; RONCATI et al., 2011).

Alguns estudos comprovam a participação do *Dermacentor (Anocentor) nitens* na transmissão de *Babesia caballi* (RONCATI et al., 2011). Já o *Rhiphicephalus (Boophilus) microplus* têm sido considerado o principal vetor de transmissão do protozoário *Theileria equi* (GUIMARÃES et al., 1998).

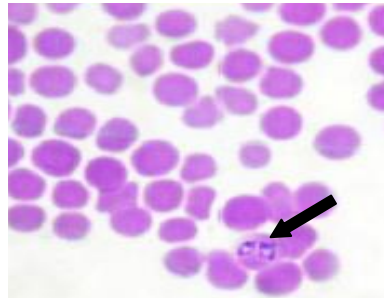
Assim, considerando a importância do diagnóstico de hemoparasitos em equinos, o objetivo deste trabalho foi identificar piroplasmas em amostras de sangue de equinos no município de Rolim de Moura/RO.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. *Babesia caballi*

Pertencente ao grupo das grandes *babesias* ($>2,5 \mu\text{m}$), os trofozoítos de *Babesia caballi* são encontrados aos pares no interior dos eritrócitos em formato de pêra, ligados pelas extremidades posteriores formando um ângulo agudo (Figura 1). Estes trofozoítos variam entre 2 a 5 μm em comprimento e 1 a 1,5 μm de largura, com diâmetro entre 1,5 e 3 μm . Predominam as formas redondas, ovais ou elípticas (TAYLOR et al., 2007; REGO, 2008).

Figura 1 - Esfregaço sanguíneo de cavalo: evidência de hemácia parasitada por trofozoítos de *Babesia caballi*.



Fonte: PIOTTO (2009).

2.2.1. Classificação Taxonômica

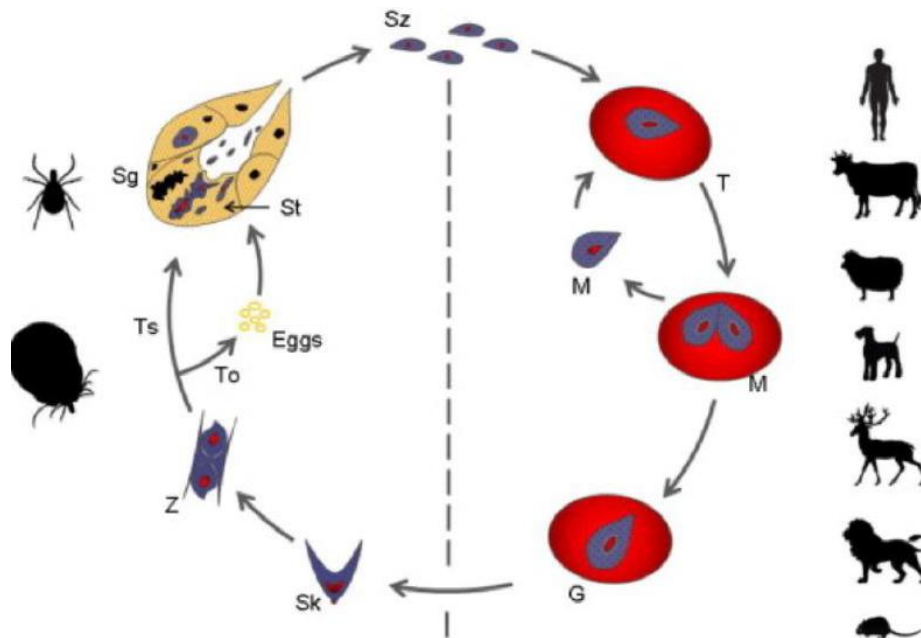
O hematozário *Babesia* é classificado como pertencente ao Filo Apicomplexa, inserido na Ordem Proplasmorida, da Família Babesidae, Gênero *Babesia* (LEVINE et al., 1989).

2.2.2. Ciclo Biológico

Ao se alimentar do sangue do hospedeiro intermediário o carrapato ingere os merozoítos que se diferenciam e fazem a reprodução sexuada originando um zigoto chamado oocineto. Este penetra nas células do tubo digestivo do carrapato e nelas se multiplica por divisão binária até as células se romperem e serem liberados na corrente sanguínea. Em seguida migram para os tecidos da fêmea do carrapato através da hemolinfa podendo chegar aos ovários ou as glândulas salivares na forma de trofozoítos. O carrapato ao sugar o hospedeiro inocula as formas trofozoítas que penetram nos eritrócitos do animal e se dividem assexuadamente por divisão binária formando merozoítos. A célula se rompe e os merozoítos

são liberados penetrando em novos eritrócitos (URQUHART et al., 1990; MONTEIRO, 2007; FLORES, 2017).

Figura 2 - Representação gráfica do ciclo biológico de *Babesia* spp.



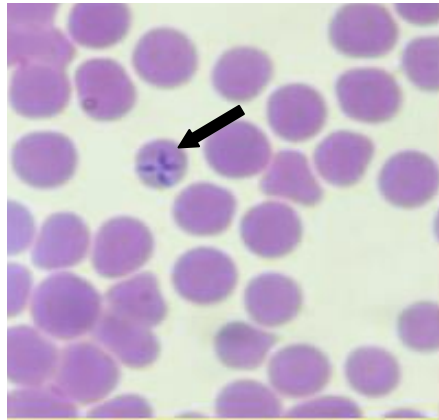
Fonte: SCHNITTGER et al. (2012)

2.3. *Theileria equi*

A principal diferenciação entre os gêneros *Theileria* e *Babesia* é que *Theileria equi* inicialmente realiza estágio de esquizogonia nos linfócitos do hospedeiro vertebrado. Devido às consequências de ações do protozoário neste estágio que manifestam sinais clínicos mais graves das infecções por *Theileria*, como linfadenopatia, piroxia, trombocitopenia e panleucopenia (HOMER et al., 2000).

No interior dos eritrócitos encontram-se de dois a quatro parasitas com o formato arredondado ou ameboide que se arranjam no formato de “Cruz de Malta”, sendo esta a principal característica para identificação do parasita através de microscopia de luz em esfregaços sanguíneos (TAYLOR et al., 2007).

Figura 3 - Esfregaço de amostra sanguínea em coloração pelo Giemsa, evidência de hemácia de equino parasitada por merozoítos de *Theileria equi*.



Fonte: PIOTTO (2009).

2.3.1. Classificação Taxonômica

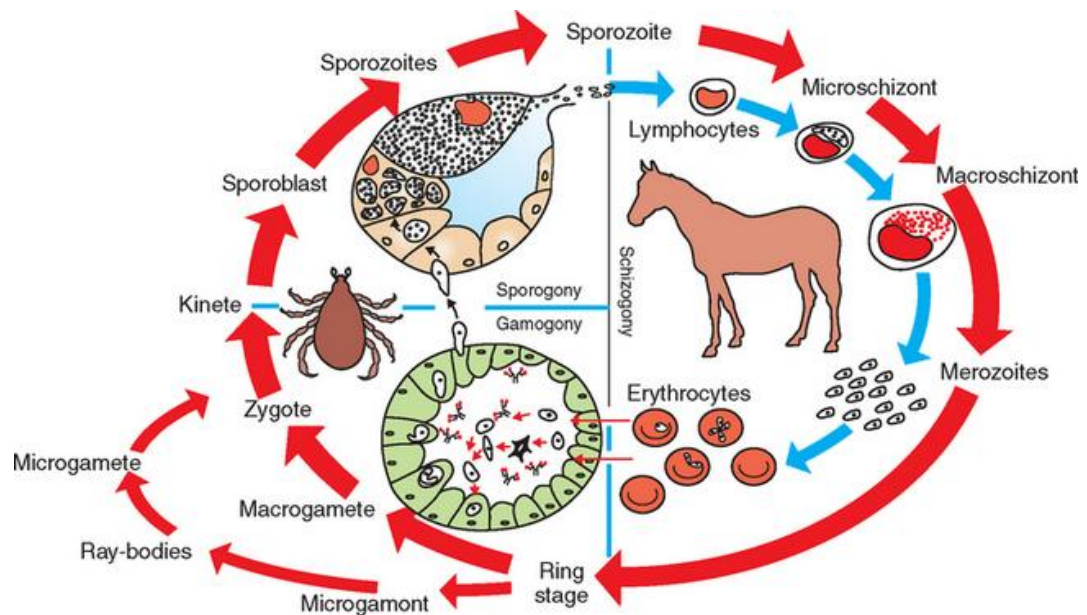
Schein (1988) questionou a taxonomia da *Theileria equi* pelo fato desta espécie iniciar o ciclo nos linfócitos. Estes fatores levaram à reclassificação do parasita *Babesia equi* como pertencente à Família Theileridae e espécie *Theileria equi* (RODRIGUES, 2018).

Atualmente, os agentes são classificados taxonomicamente como pertencentes ao Reino Eukaryota, Filo Apicomplexa, Classe Piroplasmorida, Ordem Piroplasmorida, Família Theileridae, Gênero *Theileria*, Espécie *Theileria equi* (MONTEIRO, 2007).

2.3.2. Ciclo Biológico

O carrapato quando se alimenta do sangue do hospedeiro intermediário ocorre inoculação dos esporozoítos através da saliva do carrapato. Diferentemente do que ocorre no ciclo da *Babesia caballi*, após cair na corrente sanguínea os parasitos invadem inicialmente células linfocitárias onde desenvolvem-se e dão origem aos merozoítos. Estes são liberados na circulação e invadem os eritrócitos dividindo-se assexuadamente originando os trofozoítos, que vão destruir estas células sanguíneas parasitadas e invadindo novos eritrócitos, causando anemia e hemólise, sintomas característicos da fase aguda da doença. A ingestão dos merozoítos pelo carrapato dá continuidade ao ciclo por reprodução sexuada no intestino do artrópode e esporogonia nas glândulas salivares, sem transmissão transovariana limitando a uma geração, o ciclo da *T. equi* (FRIEDHOFF et al., 1990; MONTEIRO, 2007).

Figura 4 - Ciclo *Theileria equi*: demonstrando sua infecção inicial nos linfócitos e formação da Cruz de Malta nos eritrócitos.



Fonte: RODRIGUES (2018).

2.4. Transmissão

A transmissão do protozoário *Babesia caballi* para o hospedeiro intermediário pode ocorrer de três formas: intraestadial, transestadial e transovariana. Já a transmissão do protozoário *Theileria equi* ocorre tanto nas formas transestadial e intraestadial (SCOLES; UETI, 2013). A transmissão intraestadial ocorre quando a aquisição e transmissão do parasita ocorre dentro de um estágio de vida do carrapato (sem transição de estágio antes da transmissão). Já na forma transestadial ocorre infecção em um estágio e a transmissão pode acontecer durante os estágios seguintes conforme se desenvolve no carrapato. Na transmissão transovariana na fêmea infectada os protozoários migram para os ovários e por consequência para a prole, transmitindo para a geração seguinte de carrapatos (UETI et al., 2008).

A transmissão ocorre principalmente pelos carrapatos do gênero *Dermacentor* (*Anocentor*) *nitens* (Figura 5), frequentemente encontrado na região das orelhas e que tem como seu principal hospedeiro os equinos. Também há comprovação de casos envolvendo a espécie *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*, “carrapato do boi”, acometendo equinos criados juntamente com bovinos (RADOSTITS et al., 2006; FLORES, 2017).

O *Amblyomma cajennense*/*A. sculptum* habita no corpo dos cavalos. Popularmente conhecido como “carrapato-estrela”, seu hospedeiro preferencial são os equídeos, porém

possui baixa especificidade de hospedeiro. Desta forma, *Amblyomma cajennense*/*A. sculptum* é capaz de sobreviver e completar seu ciclo de vida em regiões onde não existam equídeos, parasitando também outras espécies (TAYLOR et al., 2007; PIOTTO, 2009; NOVATO, 2014).

Figura 5 - *Amblyomma cajennense*: caracterizado pela sua ornamentação característica no escudo.



Fonte: FLORES (2017).

Dermacentor (Anocentor) nitens (carrapato de orelha), ixodídeo vetor da *Babesia caballi* (Figura 6), agente causador da babesiose equina (BOTTEON et al., 2005). Encontram-se distribuídos desde o Sul da América do Norte, México, América Central e América do Sul. Parasitam a região do pavilhão auricular e divertículo nasal de equinos, seu hospedeiro preferencial, porém em alta infestação pode ser encontrado na base da crina e região perineal, como em todo o corpo (TAYLOR et al., 2007; NOVATO, 2014).

Figura 6 – *Dermacentor (Anocentor) nitens* conhecido popularmente como “carrapato de orelha” do cavalo.



Fonte: FLORES (2017).

Guimarães et al. (1998) refere que o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Figura 7), é um importante transmissor da *Theileria equi* em criações conjuntas de equinos e bovinos. Estes carrapatos são capazes de se infectar mesmo em animais com baixa parasitemia nos estágios crônicos da doença, infectando também equinos livres da babesiose (UETI, 2008).

Figura 7 - *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: fêmea (esquerda) e macho (direita)



Fonte: FLORES (2017).

2.5. Aspectos epidemiológicos

Oliveira (2016) relata que a babesiose equina foi diagnosticada pela primeira vez por Carini em 1910, através do diagnóstico clínico e laboratorial de equinos vindos do Estado de São Paulo. Quatro animais de corrida foram diagnosticados com quadro agudo de babesiose.

É estimado que 90% da população mundial de equinos esteja exposta a *Theileria equi*, sendo relacionada à presença de carrapatos e a regiões tropicais e subtropicais. Os protozoários *Theileria equi* e *Babesia caballi* possuem a mesma espécie de vetores, o carrapato, tendo a maior prevalência correspondente à *T. equi*. Sendo a piroplasmose considerada uma doença cosmopolita (FRIEDHOOF et al., 1990; RONCATI et al., 2011; FEIJÓ et al., 2013).

A Europa é considerada uma área endêmica para *Theileria equi* e *Babesia caballi*. Na América Central e do Sul existe alta quantidade de animais infectados. Nos EUA ambas as espécies foram introduzidas através de cavalos importados de Cuba. No Brasil a piroplasmose equina é considerada endêmica (NANTES, 2008; FEIJÓ et al., 2013).

Botteon et al. (2005) relataram incidência de babesiose em 29,9% dos cavalos atletas do Regimento Escola de Cavalaria Andrade Neves do Exército Brasileiro, e na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Oliveira (2016) avaliou a ocorrência da doença no município de Patos/PB em equinos atendidos no Setor de Clínica Médica de grandes animais do Hospital Veterinário do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande, onde 1.375 equinos foram atendidos e 14 foram diagnosticados com a doença mediante achados clínicos compatíveis e comprovação laboratorial, através da identificação de mórulas de *Babesia* spp. em exame direto de esfregaços sanguíneos.

Prochno et al. (2014) verificaram a presença de anticorpos IgG contra *Theileria equi* em 400 equinos atletas da modalidade *Team Roping* na região centro-oeste no estado do Paraná, e 61% (242) animais foram positivos ao ensaio imunoenzimático (ELISA).

Babesia caballi e *Theileria equi* possuem ampla distribuição geográfica, gerando grandes perdas econômicas e prejuízos diretos e indiretos (BOTTEON et al., 2005).

2.6. Manifestações clínicas

Em equinos o período de incubação da *Theileria equi* varia de 2 a 10 dias, porém pode atingir os 21 dias. Os esquizontes são encontrados dois dias após a infecção, e entre o décimo segundo ao décimo quarto dia os trofozoítos podem ser visualizados nos eritrócitos. Em infecções por *Babesia caballi* o período de incubação é entre dez e trinta dias. Sakha (2007) demonstrou que *T. equi* é considerada a espécie de piroplasma mais patogênica, já a *B. caballi* apresenta associação a quadros anêmicos e febre mais persistente (FLORES, 2017).

Em geral, não se observa hemoglobinúria e as mucosas mostram coloração róseo-pálida e sinais de icterícia. Em equinos jovens, os sinais são mais intensos: icterícia, palidez de mucosas e fraqueza marcantes, além de petéquias evidente nas mucosas. Os animais mais acometidos podem vir a óbito entre 24 a 48 horas após os primeiros sinais (FLORES, 2017).

Potros recém-nascidos apresentam icterícia intensa e prostração marcante, cujo aparecimento é retardado por dois a três dias após o nascimento (RADOSTITS et al., 2006).

Botteon et al. (2005) consideraram a redução do desempenho sendo a principal queixa associada à babesiose equina como fator primário a manifestações clínicas, porém a doença nem sempre é diagnosticada corretamente e na prática os animais são submetidos a tratamentos com babesicidas.

2.7. Aspectos diagnósticos

Métodos diretos e indiretos podem ser utilizados para o diagnóstico da piroplasmose em equinos, os quais se destacam a pesquisa parasitológica direta por meio de esfregaços sanguíneos, a reação em cadeia da polimerase, métodos sorológicos como o ensaio imunoenzimático, reação de imunofluorescência indireta e reação de fixação do complemento (SANTOS et al., 2009).

Avaliações hematológicas podem ser consideradas, onde é possível identificar uma redução no volume de eritrócitos (FLORES, 2017).

Método direto, o esfregaço sanguíneo refere à visualização do parasito em microscopia de luz, onde durante o ciclo reprodutivo intraeritrocitário a *Theileria equi* forma um arranjo conhecido como Cruz de Malta, principal característica para identificação do parasito (FEIJÓ et al., 2013).

Roncati (2006) considera o teste de reação em cadeia da polimerase altamente sensível e extremamente eficiente no diagnóstico de *Theileria equi* e *Babesia caballi*, mas que pode resultar em falso negativo em amostras sanguíneas de portadores crônicos devido à baixa quantidade de parasitas circulantes.

Quando a parasitemia é baixa dificilmente o protozoário é visto ao microscópio podendo ser confundido com artefato, devido ao pequeno tamanho. Segundo a Organização Mundial Para Saúde Animal o método oficial para a permissão de transporte internacional de equinos é o teste sorológico ELISA (NANTES, 2008).

Devido à alta sensibilidade, as técnicas sorológicas são muito utilizadas em estudos epidemiológicos, pois detectam infecções subclínicas ou crônicas com eficácia superior aos exames diretos, já que muitos animais apresentam esfregaço sanguíneo negativo (NANTES, 2008; SANTOS et al., 2009).

Estes testes sorológicos baseiam-se na resposta imunológica do animal, onde relaciona-se a multiplicação do parasito com os anticorpos específicos, mesmo durante baixas parasitemias. Anticorpos anti-*Theileria equi* e anti-*Babesia caballi* são detectáveis quatorze dias após a infecção inicial. Portanto, testes sorológicos podem fornecer resultados falsos negativos se realizados na fase aguda da doença (CUNHA, 1998; FEIJÓ et al., 2013).

2.8. Controle e profilaxia

Em áreas livres da doença, a realização de medidas que evitem a entrada de animais infectados é fundamental, enquanto que em áreas endêmicas, é recomendado manter a estabilidade enzoótica, a fim de estimular o sistema imunológico e controle da infecção (PIOTTO, 2009).

As medidas de controle e profilaxia efetivas para a piroplasmose equina estão relacionadas ao controle ambiental, com a utilização de práticas de controle químico de vetores, rotação de pastagens, segregação de espécies e quimioprofilaxia (FEIJÓ et al., 2013).

A vacinação como potencial para indução a imunidade à infecção pelos protozoários *T. equi* e *B. caballi* é desconhecida, assim o desenvolvimento da vacina permanece distante (WISE et al., 2013).

3. JUSTIFICATIVA

Segundo Nantes (2008) há muitos animais na equinocultura nacional que são portadores do protozoário, mas que não apresentam sinais clínicos, podendo estar servindo de reservatório de protozoário. Este fator prejudica o rendimento e treinamento de animais de competição, além de aumentar o custo para manutenção destes animais em condições favoráveis a prática do esporte.

A exportação de cavalos demonstra ser um importante impulso para a equinocultura nacional, a aceitação do produto brasileiro no exterior ainda é um obstáculo devido às barreiras sanitárias e a piroplasmose equina ser considerada endêmica no país. Por isso, apesar de o plantel brasileiro apresentar qualidade existe restrição à exportação de cavalos, considerando que não há um controle para a doença (FLORES, 2017).

Devido ao impacto econômico ocasionado pelas restrições legais no trânsito de equinos tanto no território brasileiro quanto internacionalmente, além do baixo desempenho de atividades laborais dos animais (RICCIARDI, 2014), e por serem patógenos com potencial zoonótico, há a necessidade de realizar a triagem de piroplasmas em amostras sanguíneas de equídeos do município de Rolim de Moura, Rondônia.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Detectar piroplamas em amostras sanguíneas de equinos do município de Rolim de Moura-RO.

4.2. Objetivo Específico

Detectar anticorpos anti-*Babesia caballi* e anticorpos anti-*Theileria equi*;

Detectar DNA de *Babesia caballi* e *Theileria equi* em amostras sanguíneas de equinos;

Identificar formas sanguíneas de *Babesia caballi* e *Theileria equi* em amostras sanguíneas de equinos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Ética

As atividades e os protocolos de pesquisa foram submetidos à aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Rondônia, *campus* Rolim de Moura, sob o protocolo 017/2019.

5.2. Delineamento da pesquisa

5.2.1. Área de estudo

O estudo foi realizado entre os meses de outubro e dezembro de 2018 nos principais criatórios de equinos, localizados em áreas rurais, do município de Rolim de Moura, estado de Rondônia.

O município de Rolim de Moura (11°48'13" S, "61°48'12" O) está localizado a 482,2 Km da capital Porto Velho, com altitude de 225 metros acima do nível do mar. A temperatura média é de 26°C e o clima equatorial é quente e úmido. A vegetação dominante é floresta equatorial amazônica com presença de cerrado e campos. O índice de precipitação é elevado, com média anual de 1.864 mm, sobretudo entre os meses de dezembro a maio. O mês de julho corresponde ao mês mais seco, com 10 mm, e o maior índice de precipitação ocorre no mês de dezembro, com uma média de 299 mm (PACIEVITCH, 2011).

5.2.2. População animal em estudo

Foram obtidas amostras de sangue de 80 equinos com idade entre 01 e 15 anos. Os animais foram selecionados aleatoriamente independente de idade, raça, sexo tipo de criação e se havia contato com animais de outras espécies.

5.2.3. Exame clínico

Os exames clínicos básicos foram realizados antes da colheita de sangue, sempre pela mesma equipe de examinadores e foram baseados nos parâmetros descritos por Feitosa (2004).

Foi avaliado o tempo de preenchimento capilar (TPC), medido junto à mucosa bucal próximo aos dentes incisivos, realizado eversão do lábio inferior e através de compressão digital com o dedo polegar, observando-se o tempo transcorrido para o preenchimento dos capilares após a retirada do dedo. A coloração normal deve voltar dentro de dois segundos. Intervalos maiores indicam, na maioria das vezes, desidratação ou vasoconstrição periférica, associada a baixo débito cardíaco, demonstrando ineficiência na oxigenação dos tecidos (FEITOSA, 2004).

Para a aferição da temperatura retal (°C) foi utilizado termômetro clínico digital (Incoterm, faixa de medição: 32°C a 42°C). Foram considerados como valores de referência os parâmetros descritos por Feitosa (2004), equinos jovens 37,2°C a 38,9°C e adultos 37,5°C a 38,5°C.

O nível de consciência foi avaliado através da mobilidade ocular e da percepção consciente do mundo exterior e de si mesmo. O animal pode estar em alerta (normal), alerta diminuído (deprimido, apático) ou aumentado (excitado).

A condição física ou corporal foi avaliada através de observação visual considerando os seguintes critérios. Em animais normais, todas as partes proeminentes do esqueleto deveriam estar cobertas por músculos ou gordura, dando ao corpo um aspecto arredondado. Nos animais magros, várias partes do esqueleto seriam prontamente identificáveis (costelas, pelve).

Os caquéticos com pelo sem brilho, pele seca e costelas e ossos da pelve proeminentes. Enquanto, nos animais gordos ou obesos a incapacidade de palpar as costelas, falta de recorte caudal à última costela, abdome penduloso, depósito de gordura facilmente palpáveis em ambos os lados do início da cauda sobre os quadris ou na área inguinal (FEITOSA, 2004).

Ainda foi avaliada a condição geral da pele, por ser considerado um bom indicador da saúde física geral do indivíduo. Foram consideradas visualmente as características quanto à situação pelos, se limpos, brilhantes, eriçados ou quebradiços, presença de carrapatos (orelha, dorso e cauda).

5.2.4. Colheita de sangue

A colheita de sangue foi realizada por meio de venopunção da jugular, após antissepsia do local.

O sangue colhido foi depositado em tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) para uso em técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), em tubo sem anticoagulante, para teste sorológico, e outra parte usada para o preparo de gota espessa e esfregaço sanguíneo.

5.3. Diagnóstico parasitológico

5.3.1. Esfregaço sanguíneo

Para a confecção das lâminas com esfregaços sanguíneos, as amostras de sangue (6 μL) foram distendidas, secadas a temperatura ambiente, fixadas com metanol por dois minutos e coradas de forma invertida com Giemsa (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, Missouri, Estados Unidos) diluído em água tamponada por 35 minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente e, após secarem, observadas em microscópio de luz com objetiva de imersão (100x).

5.3.2. Gota espessa

Para a confecção das lâminas de gota espessa, as amostras de sangue foram espalhadas em forma de quadrado (dois por lâmina). As lâminas foram imergidas em solução azul de metileno tamponado fosfatado para desmoglobinização por 5 segundos. Em seguida, lavadas delicadamente em água destilada e coradas por sete minutos com Giemsa (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, Missouri, Estados Unidos) diluído em água tamponada (3 gotas/mL). Em seguida, lavadas em água corrente e, após estarem secas, observadas em microscópio de luz com objetiva de imersão (100x) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

5.4. Diagnóstico sorológico: ELISA

A técnica de ensaio imunoabsorvente enzimático (ELISA) foi realizado no Laboratório de Imunoparasitologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da Universidade Estadual Paulista (FCAV-Unesp), *campus* Jaboticabal, com a colaboração da profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado, conforme técnica descrita por Baldani et al. (2004).

Resumidamente, 100 μL de antígeno bruto de *B. equi* diluído na concentração de 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ em tampão carbonato-bicarbonato de sódio a 0,05 M (pH 9,6) foram adicionados a

cada poço da microplaca-ELISA (Nunclon™ Surface; Nunc, Dinamarca). Após incubação em câmara úmida durante 12 horas a 4° C, o excesso de antígeno foi removido por três lavagens com PBS Tween-80 a 0,05%. Para reduzir a ligação não específica, as placas foram bloqueadas com 200 µL de PBS Tween-80 contendo 6% de leite desnatado durante 2 horas a 37°C. O agente de bloqueio foi removido, por três lavagens, como descrito anteriormente. Os soros-testes foram diluídos 1: 100 em PBS Tween-80 com 5% de leite desnatado (PBS-TW-SM) e adicionados a cada poço e depois incubado durante 90 minutos a 37°C. Procedeu-se a lavagem das placas como descrito acima. Foram adicionados a cada poço 100 µL de anti-IgG de cavalo conjugada com fosfatase alcalina (Sigma Chemical Co.) diluída a 1: 15000 em PBS-TW-SM e depois incubados durante 90 minutos a 37°C. As placas foram lavadas e o substrato (para-nitrofenil fosfato) foi adicionado.

A leitura foi realizada a uma absorbância de 405 nm após 45 minutos de incubação a temperatura ambiente utilizando um leitor de ELISA (Dynex Technologies).

O cut-off ou ponto de corte para *B. caballi* foi 0,303 e para *T. equi* foi 0,313, baseados nos controles negativos (n = 2) e positivos (n = 2), nas quais foram utilizadas em todas as placas (total de 4 controles por placa) (Tabela 1).

Tabela 1 - Soros de referência usados em todas as placas do ELISA-teste.

<i>Babesia caballi</i>	PC = 0,303
Eq. Narciso (Controle negativo 1)	0,124
Eq. Jauá (Controle negativo 2)	0,119
Eq. 59 (Controle positivo 1)	0,893
Eq. 101 (Controle positivo 2)	0,872
<i>Theileria equi</i>	PC = 0,313
Eq. Narciso (Controle negativo 1)	0,116
Eq. 611 - Acre (Controle negativo 2)	0,135
Eq. 27 - Acre (Controle positivo 1)	0,996
Eq. 112 – Acre (Controle positivo 2)	1,063

5.5. Diagnóstico molecular

O diagnóstico molecular foi realizado no Laboratório de Imunoparasitologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da Universidade Estadual Paulista (FCAV-Unesp), *campus* Jaboticabal, com a colaboração do prof. Dr. Marcos Rogério André.

5.5.1. Extração de DNA de amostras de sangue de equinos

A extração de DNA de amostras de sangue total de equinos foi realizada com o QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen[®], Valência, Califórnia, Estados Unidos), de acordo com as recomendações do fabricante.

5.5.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para verificar a confiabilidade da extração do DNA e a presença de inibidores da PCR foi realizado primeiro o protocolo com um fragmento do gene de mamíferos gliceraldeído-3-fosfato-hidrogenase (GAPDH) como controle interno (Tabela 1) (BIRKENHEUER et al., 2003).

Para a pesquisa genérica para *Babesia/Theileria* foram utilizados oligonucleotídeos baseados no gene da pequena subunidade do RNA ribossômico (18S rRNA) descritos por Bhoora et al. (2009) e apenas amostras positivas no ELISA-teste foram testadas por essa técnica (Tabela 2).

Tabela 2 - Sequências de oligonucleotídeos do gene endógeno de mamíferos, do gene para *Babesia*, condições de ciclagem e tamanhos de produtos de PCR.

Sequência de oligonucleotídeos (5'-3')	Condições de ciclagem	Produto
GAPDH-F (CCTTCATTGACCTCAACTACAT)	1 ciclo: 95°C/5 min; 35 ciclos: 95°C/15 seg, 50°C/0 seg e 72°C/30 seg; Extensão final: 72°C/5min	400 pb
GAPDH-R (CCAAAGTTGTCATGGATGACC)		
NBabesia1F (AAGCCATGCATGTCTAAGTATAAGCTTTT)	1 ciclo: 94°C/2 min; 40 ciclos: 94°C/30 seg; 60°C/45 seg, e 72°C/1 min; Extensão final: 72°C/7min.	1600 pb
18SRev-TB (GAATAATTCACCGGATCACTCG)		

6. RESULTADOS

Foram avaliados animais de cinco propriedades, sendo coletadas amostras de 80 animais.

6.1. Exame clínico

Na avaliação do tempo de preenchimento capilar (TPC), os animais 16 animais apresentaram graus 3 e 4. Em relação à temperatura retal (°C) todos os animais demonstraram normotermia (37°C e 38°C), assim como o nível de consciência normal (alerta).

Na avaliação da condição corporal um dos animais foi considerado obeso, os demais em condição normal de escore corporal. Um animal apresentou pelos quebradiços.

Quanto a presença de carrapatos nos 27/80 (33,75%) equinos foram constatados presença do artrópode, sendo que orelha 14/27 (51,85%) e cauda 12/27 (44,44%) foram os locais com maior presença. Os carrapatos foram identificados os gêneros *Dermacentor* e *Amblyomma*. Observou-se maior ocorrência em animais criados a campo (n = 19) em relação aqueles em regime de confinamento (n = 08).

6.2. Diagnóstico parasitológico

Foram preparadas 160 lâminas, sendo 80 de esfregaço sanguíneo e 80 de gota espessa. Nessas, foram observadas formas sugestivas de piroplasma em 10 (12,5%) lâminas de esfregaço sanguíneo.

Amostras sugestivas de piroplasma ao esfregaço sanguíneo também foram observados na gota espessa, mas a confirmação foi realizada através da no esfregaço sanguíneo.

6.3. Diagnóstico sorológico: ELISA-teste

Foram soropositivos no ELISA-teste 36 amostras, sendo 15 (18,75%) para *B. caballi* (Tabela 3) e 29 (36,25%) para *T. equi* (Tabela 4).

Dessas, ocorreu coinfeção de *B. caballi* e *T. equi* em oito (22,22%) animais. É digno de nota que a amostra 06, além de *B. caballi* e *T. equi* ainda apresentou soropositividade para *Trypanosoma evansi*, que não foi o foco desse trabalho, mas foi pesquisado em todas as amostras de soro.

Tabela 3 - Amostras positivas no ELISA-teste para *Babesia caballi*, o pontos de corte e a absorbância de cada soro.

Soros equinos	<i>Babesia caballi</i>
PC	0,303
38	0,355
62	0,377
61	0,391
69	0,391
67	0,400
08	0,415
23	0,446
05	0,455
44	0,465
96	0,473
52	0,512
35	0,546
103	0,575
06	0,587
60	0,909

PC: ponto de corte

Tabela 4 - Amostras positivas no ELISA-teste para *Theileria equi*, o pontos de corte e a absorbância de cada soro.

Soros equinos	<i>Theileria equi</i>
PC	0,313
68	0,345
11	0,346
64	0,349
49	0,355
67	0,361
47	0,363
48	0,370
14	0,381
97	0,383
65	0,389
70	0,392
95	0,416
08	0,431
22	0,433
58	0,436
05	0,437
16	0,437
25	0,437
63	0,455
46	0,471
17	0,495
71	0,498
56	0,520
44	0,539
27	0,548
96	0,557
06	0,712
52	0,730
60	1,221

PC: ponto de corte

6.4. Diagnóstico molecular

Na PCR para verificação da qualidade da extração do DNA, todas as amostras apresentaram-se positivas para o gene endógeno (Figura 8).

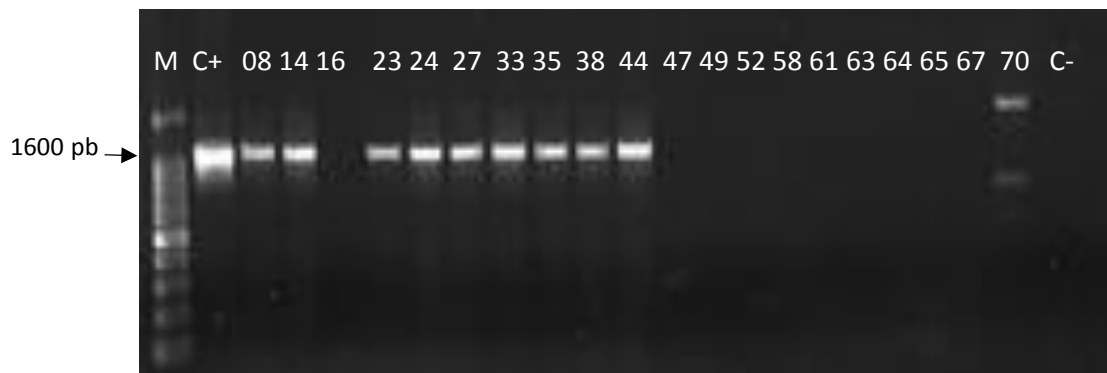
Usando gene 18S na PCR para identificação de *Babesia/Theileria*, 11/33 ($\pm 33,3\%$) amostras de DNA foram positivas (Figura 9).

Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose dos DNA testados para gene endógeno de mamífero.



M: marcador de 100 pb; C+: controle positivo; C-: controle negativo (água ultra pura).

Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose dos DNA testados para gene 18S rRNA para *Babesia/Theileria*.



M: marcador de 1.600 pb; C+: controle positivo; C-: controle negativo (água ultra pura).

6.5. Concordância entre os testes testes de ELISA e PCR

Das 33 amostras testadas na PCR e positivas no ELISA somente em 11 amostras apresentaram concordância dos resultados em ambas as técnicas.

7. DISCUSSÃO

Foi identificada maior presença de carrapatos em animais criados a campo em relação aqueles em regime de confinamento, o que pode ser justificado pelo fato destes serem criados livremente tendo maior contato com a pastagem e assim com o vetor.

Ao exame clínico 27 animais foram identificados com presença de carrapatos, sendo orelha e cauda os locais de maior ocorrência no animal. Morfologicamente identificados do gênero *Dermacentor* spp, considerado por Roncati et al. (2011) o principal vetor da *Babesia caballi*.

Não foi objetivo do presente estudo identificar as espécies de carrapatos em fase de parasitismo nos animais, no entanto os gêneros *Dermacentor* e *Amblyomma* foram os mais encontrados nos animais avaliados.

Das cinco propriedades avaliadas, onde 4/5 (80%) apresentaram pelo menos um animal positivo para um dos patógenos pesquisado. Em 10/80 (12,5%) animais foram observadas formas sugestivas de piroplasma no esfregaço sanguíneo, o que pode justificar o fato de 16 animais terem apresentado tempo de preenchimento capilar (TPC) entre 3 e 4 segundos, demonstrando ineficiência no sistema circulatório, podendo estar associado algum grau de anemia (FEITOSA, 2004).

Botteon et al. (2005) realizaram hemograma completo em 8/11 animais diagnosticados com a presença de piroplasmas ao esfregaço sanguíneo, em sete foram confirmados com anemia. Estes animais apresentaram diminuição na contagem de eritrócitos, volume globular, e concentração de hemoglobina.

A diminuição do número de eritrócitos circulantes, levando a anemia hemolítica, é a principal característica da piroplasmose em equinos mencionada por Roncati (2006), onde enfatiza que animais que sobrevivem a fase aguda tornam-se portadores assintomáticos tornando-os carreadores do protozoário.

O exame de esfregaço sanguíneo direto ao microscópio de luz utilizado como diagnóstico é bastante útil em casos agudos da doença com alta parasitemia, sendo de fácil visualização do protozoário no interior do eritrócito (RONCATI, 2006). Contudo, *Theileria equi* é classificada como um pequeno piroplasma, e isto pode prejudicar a detecção na microscopia luz, dependendo do nível de parasitemia (RODRIGUES, 2018).

A taxa de positivos através de identificação em esfregaço sanguíneo foi muito abaixo em relação ao ELISA-teste. Baldani et al. (2010) explicam ser um exame direto, possui baixa sensibilidade, principalmente em infecções subclínicas onde a parasitemia é baixa.

Este resultado assemelha-se ao de Baldani et al. (2010) que ao analisarem amostras de 170 equinos através de esfregaços de sangue coradas com Giemsa, detectou seis amostras (3,52%) com a presença de trofozoítos de *Theileria equi*. Em contrapartida, obteve 100% de positivos no exame sorológico.

Neste estudo, o exame sorológico (ELISA-teste) obteve maior número de amostras positivas para *Theileria equi*, 29 (36%), enquanto 15/80 amostras foram positivas para *Babesia caballi* (18,75%), corroborando com os dados descritos na literatura que afirmam que a casuística de *T. equi* na América do Sul é superior a de *B. caballi*. A menor densidade óptica dos soros negativos foi de 0,119 para *B. caballi* e 0,103 para *T. equi*.

Friedhoff et al (1990) referem que o elevado número de amostras positivas para *Theileria equi* pode ser justificado pela ausência de tratamento eficaz, e o animal permanece como portador do parasito.

Nos animais positivos na sorologia 08 (22,2%) apresentaram copositividade no ELISA-teste para *Theileria equi* e *Babesia caballi*, demonstrando que os parasitos podem atuar concomitantemente. Este fato foi comentado por Flores (2017) e comprovado por Campos (2017), que ao testar 170 equinos sorologicamente, 84 (49,4%) dos animais foram positivos para ambos os piroplasmas.

Verificou-se que a grande maioria dos animais positivos para piroplasmas são criados confinados (n = 25), sugere-se que são portadores de infecção subclínica, ao qual foram infectados quando mais jovens, já que permanecem o período de amamentação e recria em piquetes ou pastos livremente em contato com os vetores. Isto pode justificar o fato de que o maior titulação no ELISA-teste (1.221) ser de uma égua confinada. Botteon et al. (2002) referem que no Brasil a grande maioria dos animais convive com o parasito desde os primeiros dias de vida.

Feijó et al. (2013) ratificam que a prevalência da infecção por *Theileria equi* é maior em equinos a campo, no entanto a forma aguda da doença tem ocorrência mais frequente em animais confinados devido à baixa de imunidade proporcionada nesse tipo de regime de criação.

Vale destacar que 22 animais deste estudo possuem contato com bovinos, mesmo que esporadicamente. Torres et al. (2012) avaliaram 47 equinos em duas propriedades, sendo 25

em propriedade sem a presença de bovinos, e 22 em propriedade com criação concomitante aos bovinos. Na propriedade em que os equinos não convivem diretamente com bovinos foi constatada a sorologia positiva para theileriose equina em 10 animais (40%). Enquanto na propriedade em que há convívio direto com bovinos observou-se sorologia positiva em 20 animais (90,9%). Guimarães (1998) relatou que o carrapato da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* vem sendo considerado um importante transmissor da *Theileria equi* em equinos criados juntamente com bovinos.

Após 110 dias da coleta de sangue, proprietário relatou que um animal esteve doente sendo diagnosticado e medicado por um profissional médico veterinário como babesiose equina, através de sinais clínicos e realização de hemograma completo. O proprietário informou que o animal apresentou tristeza, fraqueza muscular, olho amarelado, urina escurecida, e permanecia muito tempo deitado (SIC). De posse dos resultados deste trabalho, o referido animal foi detectado positivo para *Babesia caballi* ao teste sorológico ELISA-teste (0,546).

Rodrigues (2018) refere que na fase aguda ocorre anemia intensa e hemólise intravascular, devido à destruição dos eritrócitos com liberação de hemoglobina e depósito da bilirrubina nos tecidos, o que produz a icterícia. A hemoglobinúria ocorre pela hemoglobina eliminada na urina.

O animal mencionado é atleta em atividade e possui vários títulos na modalidade *Team Roping*. Botteon et al. (2005) referem que fatores estressantes, como atividades desportivas, cansaço, podem desencadear manifestações clínicas em animais portadores que até então não manifestavam a doença. Enfatizando que o período de incubação da babesiose é de 8 a 10 dias podendo chegar a 30 dias (PIOTTO, 2009).

Conforme mencionado por Phipps e Otter (2004) a piroplasmose é considerada a afecção parasitária mais importante para os equinos, visto que, podem se tornar portadores subclínicos. E o fato que comprova esta afirmação é o número de animais 11/33 (33,3%) que apresentaram positividade no teste PCR para os protozoários *Babesia caballi* e *Theileria equi*, ainda que estes animais não apresentassem qualquer manifestação clínica.

Torres et al. (2012) afirmam que durante a fase crônica não há alteração significativa entre o hematócrito de equinos não infectados e de portadores de *T. equi*, devido a baixa quantidade de parasitas circulantes.

Roncati (2006) declarou que devido à escassez de DNA do protozoário disponível no sangue, refletindo na amostra coletada, pode resultar em falsos negativos mesmo com a alta

sensibilidade do teste de PCR, sendo justificado pela diminuição de parasitos circulantes. Somado a esse fato, existe uma zona “cinza” na técnica que é a limiar de detecção, ou seja, existe a presença de DNA do parasito, no entanto ele é insuficiente para ser detectado. Existem várias limitações que podem afetar a precisão do método. Seleção de iniciadores adequados, métodos utilizados para a coleta e armazenamento de amostras de sangue, e métodos de extração de DNA podem afetar o desempenho da técnica (COLEMAN et al., 2006). Devido ao custo elevado, o emprego desta técnica não é a opção da maioria dos médicos veterinários clínicos de equinos.

Discordância de resultados entre técnicas moleculares, sorológicas e de microscopia são comuns e são relatados por vários autores para diversos hemoparasitos (AKKAN et al., 2003; DE LA FUENTE et al., 2005; ZINORA et al., 2007; FIGUEIREDO et al., 2017).

Desde agosto de 2005 o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) por meio do Serviço de Inspeção de Saúde Animal e Vegetal (APHIS) considera o ELISA-teste como teste oficial para piroplasmose equina, sendo permitida a importação e exportação de cavalos somente se forem considerados livres de infecção pelo teste (USDA, 2009). Dessa forma, em concordância com essa normativa o teste considerado padrão ouro neste trabalho foi o ELISA-teste, pois este se apresentou como mais sensível frente aos outros testes de diagnóstico utilizado.

Neste trabalho, considerando as amostras e os métodos diagnósticos empregados, comprova-se maior sensibilidade do ELISA, detectando infecções subclínicas ou crônicas com maior eficácia em relação aos exames diretos, já que muitos animais apresentaram esfregaço sanguíneo e PCR negativos. Isto justifica o método sorológico ser considerado o exame oficial para emissão de autorização de transporte internacional de equinos pela Organização Mundial Para Saúde Animal (NANTES, 2008).

8. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

1. No município de Rolim de Moura-RO há circulação de *Babesia caballi* e *Theileria equi* entre hospedeiros definitivos, os carrapatos, e os hospedeiros intermediários, os cavalos;
2. Os equinos apresentaram baixas parasitemias dificultando o diagnóstico baseado na morfologia (esfregaço sanguíneo e gota espessa);
3. Nas amostras sanguíneas de equinos com infecções naturais com baixa parasitemia dificulta a detecção do DNA pela PCR, devido à carga parasitária está próxima do limiar de detecção da técnica;
4. O ELISA-teste mostrou-se mais sensível para a realização de estudos epidemiológicos.

Dessa forma, os resultados do presente trabalho demonstra a necessidade de se ampliar os estudos dos hemoparasitos em equino, inclusive de *T. evansi*, no estado de Rondônia.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKKAN, H.A.; et al. Serologic and microscopic studies on babesiosis in horses in the eastern border of Turkey. **Journal of Equine Veterinary Science**. V. 23. p. 181–183. 2003.

BALDANI, C.D.; et al. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of IgG antibodies against *Babesia equi* in horses. **Ciência Rural**. V. 34, N. 5, p. 1525-1529, 2004.

BALDANI, C. D.; NAKAGHI, A. C. H.; MACHADO, R. Z. Ocorrência de *Theileria equi* em equinos criados na microrregião de Jaboticabal, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. V.19. Nº4. Jaboticabal. 2010.

BHOORA, R.; et al. Sequence heterogeneity in the 18S rRNA gene within *Theileria equi* and *Babesia caballi* from horses in South Africa. **Vet. Parasitol.** 159. 2009. p. 112-120. 2009.

BIRKENHEUER, A.J.; LEVY, M.G.; BREITSCHWERDT, E.B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal of Clinical Microbiology**. 41, p. 4172–4177. 2003.

BOTTEON, P. T. L.; et al. Soroprevalência de *Babesia equi* em três diferentes sistemas de criação de equinos. Rio de Janeiro-Brasil. **Parasitologia Latinoamericana**. V.57. N.3-4, p.14-145, 2002.

BOTTEON, P. T. L.; et al. Babesiose em cavalos atletas portadores. **Ciência Rural**, V. 35, N.5, p.1136-1140, 2005.

CAMPOS, J. B. V. Fatores **Determinantes para a ocorrência de piroplasmose equina no Pantanal Sul Matogrossense**. Dissertação (Mestrado em Ciências ambientais e sustentabilidade Agropecuária). 102 f. Universidade Católica Dom Bosco. Campo Grande/MS. Jan 2017.

COLEMAN, R.E.; et al. Comparison of PCR and microscopy for the detection of asymptomatic malaria in a *Plasmodium falciparum/vivax* endemic area in Thailand. **Malaria Journal**. V. 5, n. 121, p. 2006.

CUNHA, C. W. et al. Alterações hematológicas e sorológicas em equinos experimentalmente infectados com *Babesia equi*. **Ciência Rural**. V. 28. N. 2. p. 283-286. 1998.

DE LA FUENTE, J.; et al. Serologic and molecular characterization of *Anaplasma* species infection in farm animals and ticks from Sicily. **Veterinary Parasitology**. V. 133. P. 357–362. 2005.

FEIJÓ, L. S.; et al. Piroplasmose equina. Parte 1: Etiologia e aspectos epidemiológicos (artigo de revisão). **Revista Brasileira de Medicina Equina**. V. 48. p. 26-29, 2013.

FEIJÓ, L. S.; et al. Piroplasmose equina. Parte 2: Métodos de diagnóstico, tratamento, controle e profilaxia (artigo de revisão). **Revista Brasileira de Medicina Equina**. V. 49. p. 10-16, 2013.

FEITOSA, F. L. F. **Semiologia Veterinária: A arte de Diagnóstico**. São Paulo: Roca. 807 p. 2004.

FIGUEIREDO, M. A. P.; et al. Identification of *Plasmodium* spp. in Neotropical primates of Maranhense Amazon in Northeast Brazil. **PLOS One**. 2017. V. 12(8): e0182905. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0182905>. PMID:28796820. 2017.

FLORES, I. V. C. **Situação epidemiológica e fatores associados à presença de *Theileria equi* e *Babesia caballi* em equinos: Revisão de literatura**. Dissertação (Graduação). Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul Faculdade De Medicina Veterinária. Porto Alegre. 2017.

FRIEDHOFF, K. T.; TENTER, A. M.; MULLER, I. Haemoparasites of equines: impact in international trade of horses. **Revue Scientifique et Technique**, v. 9, n. 4, p. 1187-1194, 1990.

GUIMARÃES, A. M.; LIMA, J. D.; RIBEIRO, M. F. B. Sporogony and experimental transmission of *Babesia equi* by *Boophilus microplus*. **Parasitology Research**. 1998. 84: 323±327. 1998

GUERRA, N. R. **Prevalência e fatores de risco associados à infecção por *Leishmania* spp, *Babesia caballi* (Nuttal & Strickland, 1910), *Theileria equi* (Mehlorm & Schein, 1998), *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909), *Neospora* spp. em Equídeos submetidos a diferentes regimes de criação**. Tese (Doutorado em Biociência Animal). 133 f. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife. 2017.

HOMER, M. J.; et al. Babesiosis. **Clinical Microbiology Reviews**. V. 13, N. 3, p. 451-469, jul. 2000.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa da Pecuária Municipal – PPM**. 2017. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=resultados>. Acesso em 22 de maio de 2019.

LEVINE, P. A. WARDLAW, S., C.; PATTON, C. I. Detection of haemoparasites using quantitative buffly coat analysis tubes. **Parasitology Today**. V.5. p.132 –134. 1989.

LIMA, T. F.. **Métodos de Diagnóstico Parasitológico: Como Saber se seu Cavalo está Parasitado**. São José do Rio Preto/SP. Rural Agropecuária, 2016. Disponível em: <<http://ruralpecuaria.com.br/tecnologia-e-manejo/equinos-muares/metodos-de-diagnostico-parasitologico-como-saber-se-seu-cavalo-esta-parasitado.html>>. Acesso em: 27 ago. 2018.

LIMA, R. A. S.; SHIROTA, R.; BARROS, G.S.C. (Ed). **Estudo do complexo do agronegócio do cavalo**. Piracicaba: CEPEA/ESALQ/USP. 251 f. 2006.

LIMA. R. A. S. **Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, 2016.

MAIA, L.; SOUZA, M. V.; SALCEDO, J. H. P. Babesiose equina em potro neonato. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, V. 13. p. 63-64, jan./abr. 2006.

MONTEIRO, S.G. **Parasitologia Veterinária - UFSM**. 2ª ed. Rio Grande do Sul, 2007.

NANTES, J. H.; ZAPPA, G.. Nutaliose – Revisão de Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ISSN: 1679-7353, Ano VI, N. 10. Jan de 2008.

NOVATO, T. P. L. **Avaliação da combinação entre timol, carvacrol e (E)-cinamaldeído sobre larvas de *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) e *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae)**. Dissertação (Mestrado). 43 f. Universidade Federal de Juiz de Fora. Minas Gerais. 2014.

OLIVEIRA, R. C. **Estudo da casuística de babesiose equina no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande/CSTR/UFCG, Patos –PB**. Monografia. 60 f. Universidade Federal de Campina Grande, 2016.

PACIEVITCH. T. Geografia de Rondônia. Disponível em: <<https://www.infoescola.com/geografia/geografia-de-rondonia/>> Acesso em: maio de 2019.

PHIPPS, L. P.; OTTER, A. Transplacental transmission of *Theileria equi* in two foals born and reared in the United Kingdom. **Veterinary Record**. V. 154. N. 17, p. 406-408, 2004.

PIOTTO, M. A. **Determinação da infecção por *Theileria equi* e *Babesia equi* em equinos alojados no Jóquei Clube de São Paulo por meio da técnica de C-ELISA (Competitive Enzyme Lynked Immunosorbent Assay)**. Dissertação: (Mestrado em Ciência Animal). 63 f. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. São Paulo, 2009.

PROCHNO, C. H. Seroprevalence rates of antibodies against *Theileria equi* in team roping horses from central-western region of Paraná. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**. V. 23, N. 1, p. 85-89. Jan-mar 2014.

RADOSTITS, O. M.; et al. **Veterinary Medicine**. 10 ed. Edinbrgh: Saunders Elsevier. V. 2. cap. 26, p. 1483-1497. 2006.

REGO, B. M. C. D. **Estudo Da Infecção Natural Por Protozoários Dos Gêneros *Babesia* E *Theileria* Numa Exploração Coudélica Do Ribatejo**. Dissertação (Graduação). 79 f. Lisboa: Universidade Técnica De Lisboa. 2008.

RICCIARDI, V. A.; VASHIST, U. Estudos Hemoparasitológicos Em Equinos, Ovinos E Caninos Do Ifsuldeminas – Câmpus Muzambinho. In: **6ª Jornada Científica e Tecnológica e 3º Simpósio de Pós-Graduação**. Minas Gerais: Instituto Federal do Sul de Minas. Novembro 2014.

RODRIGUES, D. **Detecção De *Theileria Equi* Por Reação Em Cadeia Da Polimerase Em Amostras De Sangue De Equinos No Rio Grande Do Sul**. Monografia. 46 f. Universidade Federal De Santa Maria. Santa Maria, 2018.

RONCATI, N. V. Ocorrência de *Theileria equi* congênita em potros Puro Sangue Lusitano diagnosticada por RT-PCR. 2006. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). 71 f. Universidade de São Paulo. 2006.

RONCATI, N.V.; et al. Ocorrência de *Theileria equi* congênita em potros Puro Sangue Lusitano diagnosticada por RT-PCR. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**. São Paulo: Conselho Regional de Medicina Veterinária, V. 9, N. 1, p. 46–52, 2011.

SANTOS. T. M. et al. Estudo comparativo de três métodos de diagnóstico para detecção de Anticorpos anti-*Theileria equi* em equinos de áreas endêmicas do Estado do Rio de Janeiro.

Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science. V. 46. N. 6. p. 484-490. 2009.

SCHNITTGER, L.; et al. *BABESIA*: a world emerging. **Infection, Genetics and Evolution.** (2012) 12(8):1788–809. doi:10.1016/j.meegid.2012.07.004. 2012.

SCOLES, G. A; UETI, M. W. *Amblyomma cajennense* is an intrastadial biological vector of *Theileria equi*. **Parasites & Vectors.** 6:306. Washington State University. USA. 2013.

SHKAP, V.; et al. Seroprevalence of *Babesia equi* among horses in Israel using competitive inhibition ELISA and IFA assays. **Veterinary Parasitology**, V.76. p. 251-259, 1998.

TAYLOR, M. A.; COOP, L. A.; WALL, R. L. **Veterinary Parasitology.** 3 rd ed. Wiley-Blackwell, 2007.

TORRES, Al. J.; et al. Aspectos epidemiológicos da Theileriose equina e sua relação com o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em duas propriedades na região da campanha do Rio Grande do Sul – Brasil. **Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitologia.** 2012; Vol. 71. Pág. 70-77. 2012.

UETI, M.W. et al. 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.

URQUHART, G. M.; et al. **Parasitologia Veterinária.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990.

USDA. Seroprevalence of Equine Piroplasmosis Disease Agents in the United States. **Veterinary Services Centers for Epidemiology and Animal Health.** October. 2009

WISE, L. N. et al. Review of Equine Piroplasmosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine.** V. 27. p. 1334–1346. 2013.

ZINORA, A.; et al. A serological study of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in Thoroughbreds in Trinidad. **Veterinary Parasitology.** V. 144. p. 167–171. 2007.

10. APÊNDICE I

Questionário Epidemiológico	
IDENTIFICAÇÃO DA PROPRIEDADE	
2. Nome da Propriedade:	
3. Localização:	
IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL	
1. Nome ou código do animal:	
Pelagem: Alazão () Baio () Baio Amarelo () Tordilho () Preto () Castanho ()	
2. Sexo: Macho () Fêmea ()	
3. Idade: 0-1 ano () 2-3 anos () 4-5 anos () 6-7 anos () 7-8 anos () 8-9 anos () 0-11 anos () 12-13 anos () 14-15 anos ()	
4. Raça: Quarto de Milha () Crioulo () Mangalarga () S.R.D. ()	
5. Tipo de criação: Confinado () Campo ()	
8. Contato com outros animais: Sim () Não () Se <u>sim</u> , quais? Bovinos () Cães () Gatos () Outros equinos () Caprinos () Suínos () Ovinos ()	
EXAME CLÍNICO	
1. Consciência: Alerta: () Apático: () Excitado: ()	
2. Temperatura Retal (°C): 36 () 37 () 38 () 39 () 40 ()	
3. Tempo de perfusão cardíaca (Segundos): 1 () 2 () 3 () 4 () 5 ()	
5. Condição física: Obeso () Normal () Magro () Caquético ()	
6. Pelame: Normal: () Eriçados: () Quebradiços: ()	
7. Presença de carrapatos: Sim () Não () Se <u>sim</u> , onde: Orelha: () Dorso: () Cauda: ()	
MANEJO REPRODUTIVO	
2. Problemas reprodutivos: Sim () Não () Se <u>sim</u> , quais? Aborto () Natimorto ()	
Informações complementares:	