

**CLÁUDIO MONTEIRO BAPTISTA**

**Diagnose de infecções pelo protozoário *Theileria equi*  
em cavalos nos Açores por cELISA e *nested-PCR***

Dissertação de Mestrado em Engenharia Zootécnica



UNIVERSIDADE DOS AÇORES

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ANGRA DO HEROÍSMO, 2010



**CLÁUDIO MONTEIRO BAPTISTA**

**Diagnose de infecções pelo protozoário *Theileria equi*  
em cavalos nos Açores por cELISA e *nested-PCR***

Dissertação de Mestrado em Engenharia Zootécnica

Orientador

Professor Doutor Artur da Câmara Machado



UNIVERSIDADE DOS AÇORES

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ANGRA DO HEROÍSMO, 2010

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de expressar o meu profundo agradecimento a algumas pessoas, que de uma forma ou outra, contribuíram para a realização deste trabalho:

Ao meu orientador, Professor Doutor Artur da Câmara Machado, por todos os seus ensinamentos, pela ideia que deu origem a este trabalho e pelo apoio incondicional para o seu desenvolvimento no Centro de Biotecnologia dos Açores.

À Engenheira Maria Susana Lopes, pela colheita de parte das amostras utilizadas, colaboração na realização dos testes moleculares e revisão deste trabalho.

Ao Doutor Duarte Mendonça, pela transmissão de conhecimentos, colaboração aquando da realização dos testes cELISA e pela revisão deste trabalho.

À Animal Disease Research Unit, Agricultural Research Service, US Department of Agriculture, nas pessoas do Doutor Donald Knowles e Lowell Kappmeyer, pela cedência dos controlos para a realização dos testes moleculares e pelas sugestões dadas durante a realização deste trabalho.

Aos criadores, pela cedência dos animais para colheita de sangue, pois sem a sua indispensável colaboração seria impossível a realização deste trabalho.

Aos colegas do Centro de Biotecnologia dos Açores, Lisandra, Reinaldo, Erica e Horst, por todo o apoio e amizade demonstrado ao longo deste tempo.

À minha família pelo constante apoio, incentivo e compreensão ao longo de todo este tempo.

À Carolina pelo constante apoio, especialmente nos momentos difíceis, pelo incentivo e pela revisão deste trabalho.

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	VI
<b>RESUMO</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>ABREVIATURAS UTILIZADAS</b> .....	3
<b>1. OBJECTIVOS</b> .....	5
<b>2. INTRODUÇÃO</b> .....	6
2.1. IMPORTÂNCIA ECONÓMICA DA PIROPLASMOSE EQUINA .....	7
2.2. ETIOLOGIA.....	8
2.2.1. Ciclo de vida de <i>T. equi</i> .....	10
2.3. EPIDEMIOLOGIA.....	14
2.4. TRANSMISSÃO .....	17
2.4.1. Vector biológico .....	17
2.4.2. Transmissão mecânica .....	17
2.4.3. Transmissão intra-uterina .....	17
2.5. PATOGÉNESE .....	19
2.6. SINTOMATOLOGIA.....	20
2.7. TRATAMENTO .....	21
2.8. CONTROLO E PREVENÇÃO .....	22
2.9. DIAGNÓSTICO .....	23
2.9.1. Esfregaço sanguíneo .....	24
2.9.2. Cultura <i>in vitro</i> .....	25
2.9.3. Xenodiagnóstico .....	26
2.9.4. Inoculação de sangue em animais susceptíveis .....	26

2.9.5. Métodos serológicos .....	27
2.9.5.1. Teste de Fixação do Complemento (FC) .....	27
2.9.5.2. Teste de Imunofluorescência Indirecta de Anticorpos (IFI) .....	28
2.9.5.3. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	28
2.9.6. Métodos moleculares.....	30
2.9.6.1. Sondas de ADN .....	30
2.9.6.2. Reacção em Cadeia da Polimerase – PCR .....	31
2.9.6.3. Reverse Line Blot Hybridization – RBL .....	33
2.9.6.4. PCR quantitativa em Tempo Real – PCR-qRT.....	33
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
3.1. AMOSTRAGEM .....	35
3.2. COLHEITA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	35
3.3. cELISA .....	37
3.4. <i>NESTED</i> -PCR.....	40
3.4.1. Sequenciação dos produtos de PCR .....	41
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>58</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** – Esfregaço sanguíneo de equino infectado com *Babesia caballi*..... 9
- Figura 2** – Esfregaço sanguíneo de equino infectado com *Theileria equi* ..... 9
- Figura 3** – Esfregaço sanguíneo com coloração de Giemsa, com a formação típica da “Cruz de Malta” (cabeça da seta) por *T. equi* nos eritrócitos ..... 12
- Figura 4** – Diagrama representativo do ciclo de vida de *T. equi*. 1: esporozoíto injectado junto com a saliva; 2: macrosquizonte; 3: microsquizonte; 4: merozoíto; 5: eritrócito mostrando a formação típica da “Cruz de Malta” e gametócito; 6: gametócito; 7-10: formação de “ray-bodies” a partir dos gametócitos; 11: fusão dos gâmetas; 12: zigoto; 13-16:desenvolvimento do ooquinete; 17: ooquinetes em crescimento originando esporontes multinucleados; 18: divisão dos esporontes multinucleados em pequenos esporoblastos, que posteriormente originam esporozoítos. G: gametócito; IV: vacúolo interno; M: merozoíto; N: núcleo; NH: núcleo da célula hospedeira; S: esporozoíto; SB: esporoblasto; SP: esporonte ST: esquizonte ..... 13
- Figura 5** – Sequência de eventos no teste cELISA em amostras positivas e negativas. (a) Antigénio imobilizado na placa. (b) Amostra positiva com ligação dos anticorpos do soro testado ao antigénio e amostra negativa sem ligação. (c) Inibição da ligação do anticorpo monoclonal primário ao antigénio pelo soro teste positivo e ligação do anticorpo monoclonal primário ao antigénio imobilizado na amostra negativa. (d) Não ocorre ligação do anticorpo secundário marcado com a enzima ao anticorpo do soro teste positivo, mas sim ao anticorpo monoclonal primário que não sofreu inibição e ligou-se ao antigénio imobilizado na amostra negativa. (e) A adição do substrato na amostra positiva não provoca alteração na coloração e a sua adição na amostra negativa apresenta consumo pela enzima, sinalizando a presença da ligação do anticorpo monoclonal primário e não de anticorpos presentes no soro teste caracterizando a amostra negativa. (f) Representação esquemática da escala de cor de acordo com a inibição ..... 39
- Figura 6** – Resultados da diagnose de *T. equi* nas 241 amostras pelos métodos *nested*-PCR e cELISA. (a) amostras positivas para pelo menos um método e negativas para ambos os métodos. (b) amostras positivas para ambos os métodos; amostras positivas apenas para *nested*-PCR; amostras positivas apenas para cELISA; amostras negativas para cELISA e amostras negativas para *nested*-PCR. .... 44
- Figura 7** – Resultados da diagnose de *T. equi* por cELISA e *nested*-PCR nas diferentes regiões geográficas. .... 45

<b>Figura 8</b> – Distribuição dos resultados da diagnose de <i>T. equi</i> por cELISA e <i>nested</i> -PCR no total das 162 amostras do continente português. ....	46
<b>Figura 9</b> – Distribuição dos resultados da diagnose de <i>T. equi</i> por cELISA e <i>nested</i> -PCR no total das 79 amostras dos Açores. ....	46
<b>Figura 10</b> – Distribuição dos resultados da diagnose de <i>T. equi</i> por cELISA e <i>nested</i> -PCR no total das 26 amostras da ilha Graciosa. ....	47
<b>Figura 11</b> – Distribuição dos resultados da diagnose de <i>T. equi</i> por cELISA e <i>nested</i> -PCR no total das 58 amostras da ilha Terceira. ....	48
<b>Figura 12</b> – Fragmento com 260 pb (seta branca) da primeira reacção de PCR e fragmento inespecífico com aproximadamente 390 pb (seta encarnada). MM: 1 Kb plus leader DNA (Fermentas); P: controlo positivo (cavalo experimentalmente infectado com <i>T. equi</i> ); Linhas 1-4 e 11: amostras negativas; linhas 5-10: amostras positivas; N: controlo negativo (cavalo não infectado); B: branco (todos os componentes da reacção sem ADN). ....	49
<b>Figura 13</b> – Fragmento do <i>nested</i> -PCR com 219 pb (seta). MM: 1 Kb plus leader DNA (Fermentas); P: controlo positivo (cavalo experimentalmente infectado com <i>T. equi</i> ); Linhas 1-4: amostras negativas; linhas 5-11: amostras positivas; N: controlo negativo (cavalo não infectado); B1: branco (todos os componentes da reacção mais 2 µl do branco da primeira reacção); B2: branco (todos os componentes da reacção sem ADN). ....	49
<b>Figura 14</b> – Alinhamento da sequência de nucleótidos de um fragmento de 219 pb de uma das amostras analisadas com um segmento da sequência do gene <i>EMA-1</i> do protozoário <i>T. equi</i> , depositada no GeneBank com a referência L13784. Neste alinhamento pode-se verificar que as sequências apresentam 100% de homologia. ....	50

## RESUMO

Este estudo teve como objectivo averiguar a presença de cavalos portadores de *T. equi* em duas ilhas do arquipélago dos Açores. Para tal foram utilizados o cELISA e o *nested*-PCR.

Foram colhidas 26 amostras na ilha Graciosa e 53 na ilha Terceira. Das amostras colhidas na ilha Terceira, 21 pertencem à população do Pónei da ilha Terceira, sendo que as restantes amostras colhidas nas duas ilhas são de cavalos importados do exterior do arquipélago ou descendentes destes. Foram ainda colhidas 162 amostras no continente português.

Analisando a totalidade das amostras colhidas nos Açores, 7,6% dos animais apresentaram resultado positivo unicamente para o cELISA e 15,2% foram apenas positivos para o *nested*-PCR, 3,8% foram positivas para ambos os testes e 73,4% foram negativas para ambos os testes. Verificou-se ainda que todos os animais da população do Pónei da Terceira apresentaram resultados negativos para ambos os testes. Das amostras colhidas no continente português, 7,4% foram positivas unicamente para cELISA e 11,7% positivas apenas para *nested*-PCR, 18,5% foram positivas para ambos os métodos e 62,4% foram negativas para ambos os métodos.

Este é o primeiro estudo a utilizar técnicas moleculares na diagnose de infecções por *T. equi* em cavalos nos Açores e o primeiro a registar cavalos portadores do parasita no arquipélago.

**Palavras chave:** *Theileria equi*; Açores; cELISA; *Nested*-PCR.

## **ABSTRACT**

The objective of this study was to investigate the presence of carrier horses with *T. equi* in two islands of the Azorean archipelago. For such, cELISA and nested-PCR were used.

Twenty six samples were collected in Graciosa island and 53 in Terceira island. From the samples collected in Terceira island, 21 belong to the Pónei da ilha Terceira population. The remaining samples, of both islands, are from horses that were imported from outside of the archipelago, or are descendant from them. There were also collected 162 samples from the Portugal mainland.

From the analysis of all the samples from the Azores, 7,6% of the animals were positive exclusively for cELISA and 15,2% were positive exclusively for *nested*-PCR. For both tests, 3,8% of the samples were positive and 73,4% were negative. It was also observed that all the animals from the Pónei da ilha Terceira population were negative for both tests. From the samples of the mainland, 7,4% were positive exclusively for cELISA and 11,7% were positive exclusively for *nested*-PCR. For both tests, 18,5% were positive and 62,4% were negative.

In Azores, this is the first study using molecular techniques on the diagnosis of infections by *T. equi* in horses in Azores and the first to report carrier horses with the parasite in the archipelago.

**Keywords:** *Theileria equi*; Azores; cELISA; *Nested*-PCR

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

ADN – ácido desoxirribonucleico

ARN – ácido ribonucleico

°C . – graus Celcius

cELISA – *competitive Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

dNTP – desoxinucleosídeos 5-trifosfato

EDTA – ácido etilenodiaminotetra-acético

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

EMA-1 – *Equine Merozoit Antigen-1*

FC – fixação do Complemento

IFI – imunofluorescência de Anticorpos

IgG(T) – imunoglobulinas G da subclasse T

g – aceleração

HCl – ácido clorídrico

Mab – anticorpo monoclonal

μl – microlitro

μm – micrómetro

mg – miligrama

MgCl<sub>2</sub> – cloreto de magnésio

ml – mililitro

mM – milimolar

nm – nanometro

pb – pares de base

PCI – Fenol:Cloróformio:Álcool Isoamílico (25:24:1)

PCR – *Polimerase Chain Reaction*

PCR-qRT – PCR quantitativa em Tempo Real

pmol – picomoles

RAP-1 – *Rhoptry-Associated Protein-1*

RBL – *Reverse Line Blot Hybridization*

rpm – rotações por minuto

SDS – dodecilo sulfato de sódio

TAE – solução Tris-acetato EDTA

TE – solução de Tris EDTA

Tris – tris(hidroximetil)-aminometano

UV – ultravioleta

## 1. OBJECTIVOS

Dado o impacto que infecções por *T. equi* têm no maneio, desempenho, movimentação e conseqüente comercialização de equinos, pretendeu-se neste estudo:

- Estabelecer e adaptar, às nossas condições laboratoriais, métodos de diagnose molecular.

- Averiguar a existência de animais portadores do protozoário *T. equi* no arquipélago dos Açores, nomeadamente nas ilhas Terceira e Graciosa.

- Fazer um estudo preliminar da prevalência do parasita nas ilhas Terceira e Graciosa.

## 2. INTRODUÇÃO

Desde há muito que os equinos são utilizados nas mais diversas actividades em todo o mundo, auxiliando o Homem no seu contexto social, trabalho e lazer, embora actualmente a sua utilização seja maioritariamente para a prática desportiva. Deste modo, um bom maneio alimentar, treino físico e estado sanitário dos animais revestem-se de grande importância (Piotto, 2009).

A piroplasmose equina, também conhecida como febre biliar, é uma doença causada por duas espécies diferentes de protozoários intra-eritrocitários, *Babesia caballi* (Nuttall e Strickland, 1910) e *Babesia equi* (Laveran, 1901). Recentemente, *Babesia equi* foi reclassificada em *Theileria equi* (Melhorn e Schein, 1998). Em concordância com estes factos, será utilizado neste trabalho a nomina *Theileria equi*. Estes parasitas são transmitidos principalmente pelas carraças, podendo também ser transmitidos através de sangue contaminado ou por infecções intra-uterinas, podendo infectar cavalos, mulas, burros e zebras (de Waal e van Heerden, 2004).

A infecção por estes protozoários pode evoluir de forma aguda, sub-aguda ou crónica, sendo caracterizada por sinais como febre, por vezes intermitente, anemia progressiva, icterícia, hepatomegália e esplenomegália. (Ali *et al.*, 1996). A infecção sem ocorrência de sinais clínicos também pode ocorrer (Phipps e Otter, 2004). Devido ao carácter persistente da infecção, o estado de portador da infecção por *T. equi* é considerado como sendo para toda a vida, enquanto, animais portadores de *B. caballi* podem sê-lo até quatro anos (de Waal e van Heerden, 2004). Cavalos que recuperem da forma aguda

da infecção podem permanecer como fonte de parasitas para a carraça, que irá transmitir a doença a outros animais susceptíveis (Heim *et al.*, 2007).

Esta doença tem grande impacto a nível económico, pois cavalos com anticorpos anti-*B. caballi* e *T. equi* estão impedidos de entrar em muitos países (Knowles, 1996), sendo que ambos os parasitas podem ser encontrados em áreas tropicais e sub-tropicais, assim como em zonas de clima temperado (Brüning, 1996), nomeadamente Portugal continental (de Waal e van Heerden, 2004). No Açores, não existem registos de casos de piroplasmose equina, como sublinhado pelo médico veterinário Miguel Balacó Amaral (Coelho, 2008). No entanto, a entrada de animais no arquipélago provenientes de áreas onde o parasita é endémico, nomeadamente Portugal continental, é significativa. Assim, a possibilidade da existência de animais portadores de *T. equi* no arquipélago não pode ser posta de parte, e deve ser seguida com a devida atenção. Para tal, a utilização de testes específicos e sensíveis para a detecção de *B. caballi* e *T. equi* é essencial para evitar a entrada de animais portadores em regiões livres destes parasitas (Jaffer *et al.*, 2009).

## **2.1. IMPORTÂNCIA ECONÓMICA DA PIROPLASMOSE EQUINA**

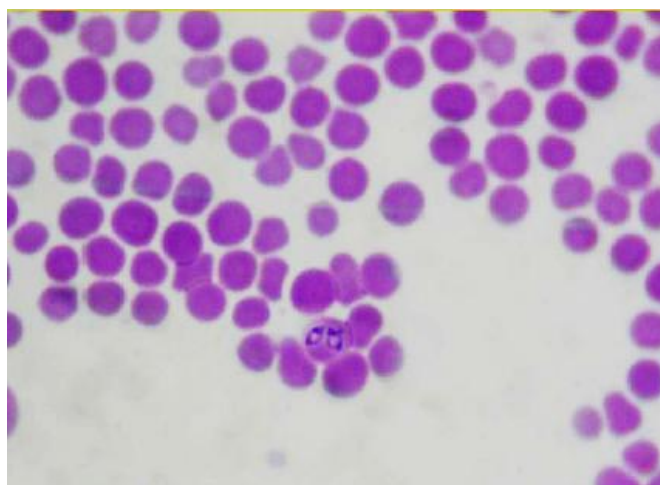
Os animais portadores dos parasitas *T. equi* e *B. caballi* assumem, a nível global, uma posição de destaque, pois a sua introdução em áreas livres destes parasitas representa um sério risco de infecção dos animais aí existentes. Deste modo, países livres de piroplasmose equina restringem a importação de animais provenientes de países endémicos (Rhalem *et al.*, 2001).

As implicações económicas relacionadas com a piroplasmose equina incluem restrições impostas à exportação ou participação em eventos desportivos internacionais, os custos do tratamento, especialmente de casos agudos, os abortos, a perda de performance e a taxa de mortalidade (Rego, 2008). No que se refere às limitações impostas ao comércio, estas reflectem-se sobretudo em países tradicionalmente produtores e exportadores de cavalos, como é o caso de Portugal. A piroplasmose equina é uma das principais razões pela qual é impedida a importação de equinos provenientes de Portugal para países indenes da doença, inviabilizando inúmeras oportunidades de negócio. Por este motivo, o controlo desta doença representaria um papel importante na abertura do mercado internacional para a indústria equina nacional (Rego, 2008).

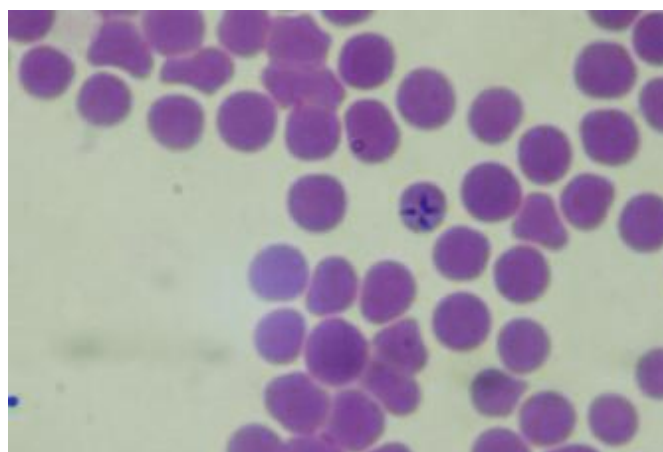
## **2.2. ETIOLOGIA**

Ambos os parasitas, *Babesia caballi* e *Babesia equi*, pertencem ao filo Apicomplexa (Ali *et al.*, 1996), tendo o protozoário *B. equi* sido recentemente reclassificado em *T. equi* (Melhorn e Schein, 1998). Características como esquizogonia pré-eritrocitária nos linfócitos do hospedeiro vertebrado, ocorrência de transmissão transtadial com esporogonia no vector, tal como em *Theileria* spp., ausência de desenvolvimento nos ovários da carraça e transmissão transovárica típica de *Babesia* spp., levaram a esta alteração taxonómica. Além disso, a análise molecular da pequena subunidade do ARN ribossomal indica que *T. equi* é filogeneticamente mais próxima da família *Theileriidae* do que da família *Babesiidae* (Donnellan, 2006).

O exame microscópico de esfregaços sanguíneos corados, de hospedeiros vertebrados infectados, mostra que algumas das espécies de *Babesia* (figura 1) e *Theileria* (figura 2) apresentam uma forma de pêra característica no interior dos eritrócitos. Esta observação conduziu ao uso do nome “piroplasma” para descrever ambos os gêneros (Rego, 2008).



**Figura 1** – Esfregaço sanguíneo de equino infectado com *Babesia caballi* (adaptado de Piotto, 2009).



**Figura 2** – Esfregaço sanguíneo de equino infectado com *Theileria equi* (adaptado de Piotto, 2009).

### 2.2.1. CICLO DE VIDA DE *T. EQUI*

O ciclo de vida típico dos Apicomplexa é caracterizado por três estádios de reprodução: (i) gamogonia – formação e fusão de gâmetas no intestino da carraça; (ii) esporogonia – reprodução assexuada nas glândulas salivares do hospedeiro invertebrado, e (iii) merogonia – reprodução assexuada no hospedeiro vertebrado (Homer *et al.*, 2000).

Os parasitas do género *Theileria* possuem um ciclo de vida complexo, envolvendo estádios de desenvolvimento morfológicamente distintos no hospedeiro vector e no mamífero hospedeiro (Rolão, 2004).

O parasita *T. equi* está presente nos linfócitos e nos eritrócitos do hospedeiro vertebrado e é transmitido pela picada da carraça (i.e. o seu vector de transmissão) (Melhorn e Schein, 1998).

O esporozoítio constitui o estádio final do desenvolvimento dos parasitas de *Theileria* spp. dentro das células das glândulas salivares da carraça, e é transmitido ao hospedeiro vertebrado quando o referido vector se alimenta. Quando uma carraça adulta infectada se liga ao hospedeiro, são necessários três a quatro dias de alimentação para que se complete a maturação dos parasitas dentro das glândulas salivares da carraça e os esporozoítios maduros sejam libertados (Rolão, 2004).

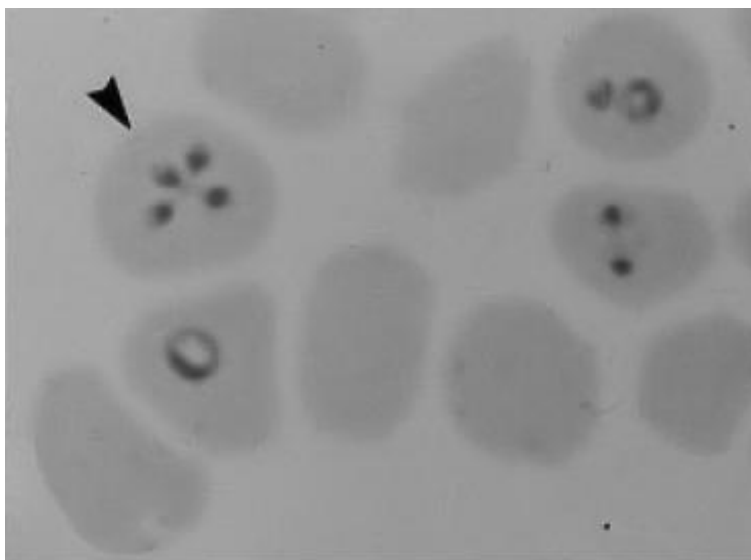
Em contraste com *B. caballi*, *T. equi* multiplica-se inicialmente nos linfócitos e só depois nos eritrócitos. Após inoculação dos esporozoítios pela carraça, estes invadem inicialmente os linfócitos. Nestes, desenvolvem-se inicialmente esquizontes característicos, na forma de macrosquizontes, que mais tarde se diferenciam em microsquizontes. Os microsquizontes contêm

grande número de merozoítos que são libertados depois da destruição da célula hospedeira, penetrando os eritrócitos (Ali *et al.*, 1996).

*T. equi* invade os linfócitos *in vitro* e *in vivo*. Os esporozoítos alojam-se directamente no citoplasma da célula hospedeira, juntando-se para formar um meronte. Os merontes passam por repetidas divisões nucleares mitóticas, e a diferenciação dos merozoítos inicia-se em vários locais pelo aparecimento de uma dupla membrana sob a membrana celular. O desenvolvimento dos merozoítos de *T. equi* está completo ao nono dia após a sua inoculação *in vitro*, ou nos 12 a 15 dias após a fixação das carraças ao hospedeiro (i.e. *in vivo*). Os merozoítos maduros ocupam a maior parte da célula hospedeira, que pode romper-se, libertando-os (Ali *et al.*, 1996). Estes merozoítos têm um tamanho que varia entre 1,5 a 2  $\mu\text{m}$  e vão invadir os eritrócitos do hospedeiro, iniciando a sua reprodução por fissão binária. Os estádios intra-eritrocitários do parasita provavelmente incluem trofozoítos, formas em divisão e merozoítos (de Waal e van Heerden, 2004; Melhorn e Schein, 1998).

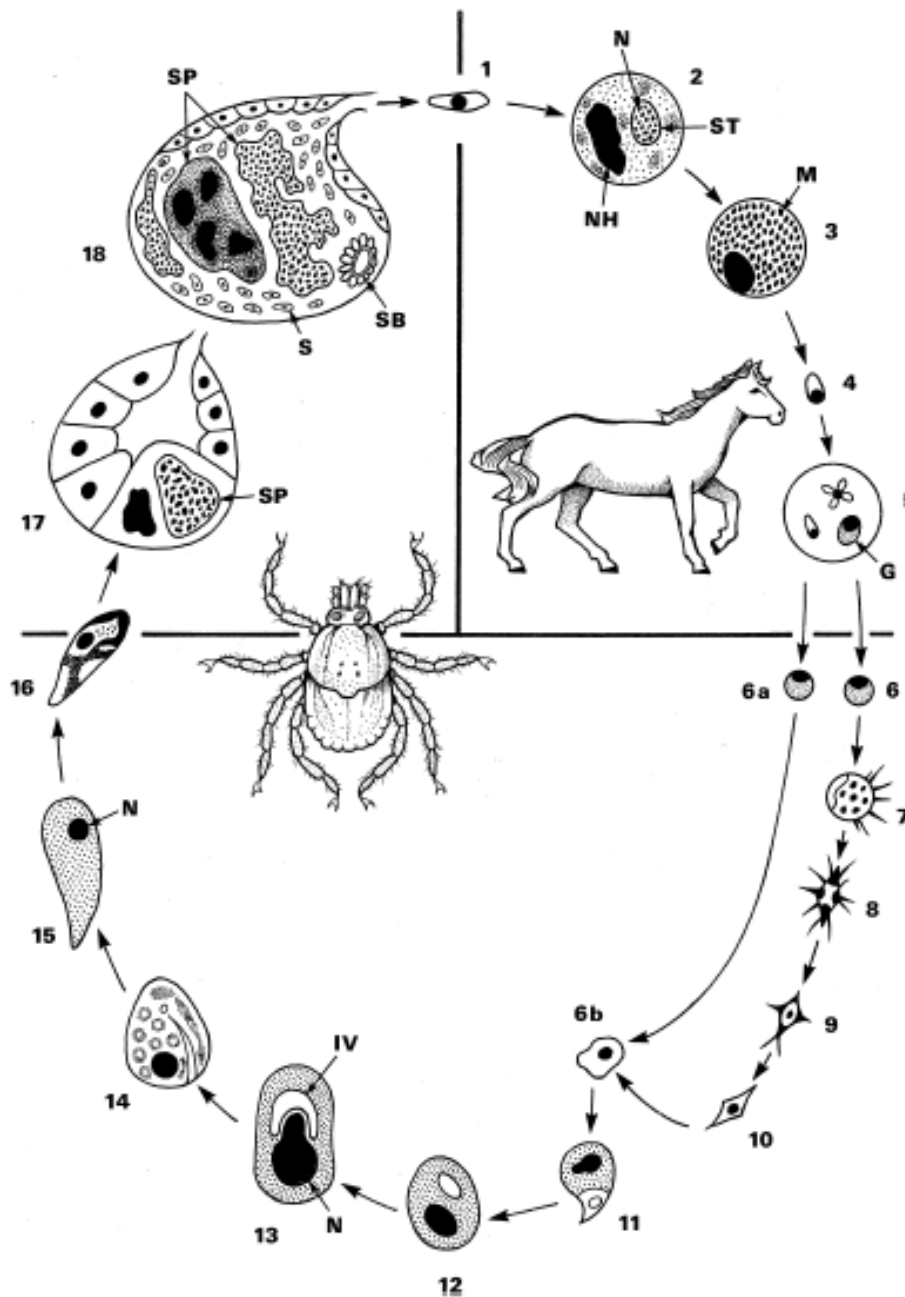
Os trofozoítos de *T. equi* assumem várias formas, entre as quais arredondada, oval, elíptica ou fusiforme, podendo ter um diâmetro de até 3  $\mu\text{m}$ . Os merozoítos podem apresentar-se nos eritrócitos na forma de dois ou quatro parasitas piriformes. Nos casos de quatro parasitas, estes formam um arranjo conhecido como “Cruz de Malta” (figura 3), formação típica de *T. equi* nos eritrócitos (de Waal e van Heerden, 2004). A parasitémia varia normalmente entre 1 e 5%, podendo atingir 80% dos eritrócitos (Melhorn e Schein, 1998).

Após a ruptura dos eritrócitos, os merozoítos eritrocitários invadem outros eritrócitos, onde outra fase de reprodução assexuada tem início (Melhorn e Schein, 1998).



**Figura 3** – Esfregaço sanguíneo com coloração de Giemsa, com a formação típica da “Cruz de Malta” (cabeça da seta) por *T. equi* nos eritrócitos (adaptado de Melhorn e Schein, 1998).

A carraça torna-se infectada quando ingere sangue com células contendo piroplasmas, que devem ser considerados como gametócitos, dando-se início ao processo de gametogénese no vector (Bhoora, 2009; Uilenberg, 2006). Os gametócitos sofrem alterações morfológicas no intestino da carraça e desenvolvem-se em “ray bodies”. Dois “ray bodies” (i.e. gâmetas) fundem-se formando zigotos móveis (Bhoora, 2009; Melhorn e Schein, 1998). Os zigotos imaturos de *Theileria* spp. não se multiplicam, evoluindo no intestino da carraça de onde se libertam como ooquinetes. Estes invadem a hemolinfa da carraça, dirigindo-se para as glândulas salivares (Uilenberg, 2006) (figura 4).



**Figura 4** – Diagrama representativo do ciclo de vida de *T. equi*. 1: esporozoíto injectado junto com a saliva; 2: macróscizonte; 3: micróscizonte; 4: merozoíto; 5: eritrócito mostrando a formação típica da “Cruz de Malta” e gametócito; 6: gametócito; 7-10: formação de “ray-bodies” a partir dos gametócitos; 11: fusão dos gametas; 12: zigoto; 13-16: desenvolvimento do oocineta; 17: oocinetas em crescimento originando esporontes multinucleados; 18: divisão dos esporontes multinucleados em pequenos esporoblastos, que posteriormente originam esporozoítos. G: gametócito; IV: vacúolo interno; M: merozoíto; N: núcleo; NH: núcleo da célula hospedeira; S: esporozoíto; SB: esporoblasto; SP: esporonte ST: esquizonte (adaptado de Melhorn e Schein, 1998).

Quando o próximo estágio do vector se fixa num novo hospedeiro, ocorre a esporogonia e maturação dos esporozoítos nas glândulas salivares, e a transmissão ocorre através da injeção de saliva infectada. Este processo denomina-se transmissão transestadial. Quando a larva se infecta, a ninfa é infecciosa e, quando a ninfa é infectada, a carraça adulta é infecciosa. Larvas recém eclodidas não têm capacidade infecciosa (Uilenberg, 2006).

### 2.3. EPIDEMIOLOGIA

A piroplasmose equina está disseminada por grande parte da Europa, América Central e do Sul, Ásia e África (Bashiruddin *et al.*, 1999; Bhoora *et al.*, 2010a; Boldbaatar, *et al.*, 2005; Camacho, *et al.*, 2005; Heim, *et al.*, 2007; Heuchert *et al.*, 1999; Jaffer *et al.*, 2009; Kouam *et al.*, 2010; Moretti *et al.*, 2009; Öncel *et al.*, 2007; Rampersad *et al.*, 2003; Salim *et al.*, 2008; Shkap *et al.*, 1998; Sigg *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2003), estando o seu estabelecimento fortemente dependente da distribuição do vector. O parasita *T. equi* é o mais comum a nível mundial enquanto *B. caballi*, se presente, é normalmente diagnosticado como uma infecção mista com *T. equi* (Battsetseg *et al.*, 2002; Bhoora, 2009).

Alguns países encontram-se livres da doença, nomeadamente Canadá, Nova Zelândia, Japão, Reino Unido, Irlanda e Holanda (Bhoora, 2009). Contudo, o vector existe em muitos destes países e, por conseguinte, a introdução de animais portadores nestas áreas pode conduzir à propagação epizootica da doença, justificando-se assim todas as restrições à importação de equídeos impostas internacionalmente (Rego, 2008). Em alguns casos (e.g.

Austrália e EUA) houve a introdução do parasita *T. equi* através de cavalos infectados, mas por falta de vector apropriado ou por acção de campanhas agressivas de erradicação e controlo dos vectores, a infecção permaneceu localizada (de Waal e van Heerden, 2004).

Em Portugal é conhecida a presença dos parasitas responsáveis pela piroplasmose equina (de Waal e van Heerden, 2004; Phipps e Otter, 2004). Em Portugal continental foram feitos alguns levantamentos epidemiológicos na região do Ribatejo, através do teste de Fixação do Complemento (FC), onde se verificou que os valores de prevalência para *T. equi* se situam nos 45,3% (Serra *et al.*, 1993, citado por Rego, 2008) na região do Alentejo, através do teste de imunofluorescência indirecta de anticorpos (IFI) observou-se uma percentagem de infecção de 85,1% para *T. equi* (Malta, 2001, citado por Rego, 2008), nos Açores não são conhecidos registos de animais infectados com *B. caballi* e *T. equi*.

Poldros nascidos em áreas endémicas normalmente recebem anticorpos maternos contra *T. equi* e *B. caballi* através do colostro, decaindo para níveis indetectáveis por volta dos quatro a cinco meses de idade (Donnelly *et al.*, 1982). Tal como acontece com os vitelos, os poldros encontram-se protegidos de infecções por *Babesia* spp., através de imunidade passiva, durante os primeiros seis a nove meses de vida. As infecções que ocorram durante este período irão causar imunidade, sem ocorrência de sinais de desenvolvimento da doença, sendo criada uma situação de estabilidade endémica. Por outro lado, uma situação de instabilidade endémica desenvolve-se quando, devido a exposições pouco frequentes, alguns animais não são

infectados por um período considerável (provavelmente mais de 12 meses) após o nascimento, estando posteriormente totalmente susceptíveis (de Waal e van Heerden, 2004).

A ocorrência de piroplasmose equina coincide com a actividade sazonal do estágio adulto da carraça e, por conseguinte, os casos clínicos são encontrados com maior frequência durante os meses de Verão (de Waal e van Heerden, 2004).

As reagudizações de situações crónicas ocorrem principalmente em animais mantidos sob regime de estabulação, raramente atingindo animais criados a campo. Nas áreas endémicas, o retorno à fase aguda de animais que apresentem infecção latente, particularmente entre os animais adultos, está normalmente associada a alguma forma de stress, tal como esforço físico, parto, restrição alimentar ou a presença de uma outra doença, bem como quando sujeitos a imunossupressão por fármacos ou processo patológico imunossupressor (Rego, 2008).

Os cavalos parecem ser mais susceptíveis a infecção do que as mulas e os burros, e os animais adultos são mais susceptíveis que os animais mais jovens (Rhalem *et al.*, 2001). A taxa de mortalidade é elevada em cavalos susceptíveis quando estes são introduzidos em áreas endémicas (Knowles *et al.*, 1991a; Rhalem *et al.*, 2001).

## 2.4. TRANSMISSÃO

### 2.4.1. VECTOR BIOLÓGICO

As infecções por *T. equi* são transmitidas principalmente pela acção de carraças (Phipps e Otter, 2004), estando descritas como vectores de transmissão espécies dos géneros *Boophilus*, *Dermacentor*, *Hyalomma* e *Rhipicephalus* (Ikadai *et al.*, 2007).

Em Portugal continental, e em particular nos Açores, é conhecida a presença de espécies potencialmente transmissoras da infecção, nomeadamente *Dermacentor marginatus*, *Hyalomma marginatum marginatum*, *Hyalomma lusitanicum*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus bursa* e *Rhipicephalus turanicus* (Borges *et al.*, 2010).

### 2.4.2. TRANSMISSÃO MECÂNICA

Uma característica da infecção por *T. equi* é que pode ser transmitida a animais susceptíveis por sangue contaminado, quando injectado por via intravenosa, intramuscular ou subcutânea (de Waal e van Heerden, 2004), tendo já sido documentada a transmissão de piroplasmose equina através do uso de agulhas hipodérmicas em equinos no Reino Unido (Gerstenberg *et al.*, 1999, citado por Phipps e Otter, 2004).

### 2.4.3. TRANSMISSÃO INTRA-UTERINA

Em éguas prenhas, a infecção do feto em qualquer período da gestação, particularmente com *T. equi*, bem como a falha reprodutiva devido a

infecções intra-uterinas, é bastante comum. Normalmente a infecção resulta em aborto, com o feto a demonstrar lesões características de piroplasmose equina. No entanto podem nascer poldros infectados, apresentando sinais da doença ou desenvolvendo esses sinais apenas após alguns dias. Devido à natureza persistente da infecção por *T. equi*, uma égua portadora pode produzir, aleatoriamente, mais de um feto infectado durante toda a sua vida reprodutiva. Os fetos também podem ser infectados por *T. equi* sem desenvolverem a doença, nascendo como portadores do parasita (de Waal e van Heerden, 2004).

Phipps e Otter (2004) descreveram a infecção por *T. equi* em dois animais nascidos no Reino Unido, descendentes de uma égua portadora da infecção importada de Portugal, onde o parasita é endeme. Ambos os animais, com idades de dois e cinco anos, apresentaram resultados positivos para *T. equi* pelos testes FC e IFI, tendo sido também demonstrada a presença do parasita através de esfregaço sanguíneo nos dois animais. No entanto, os animais eram saudáveis. Os autores concluíram que a via mais provável de transmissão da infecção parece ter sido por via transplacentária.

A transmissão transplacentária tem sido sugerida como resultado de uma placentação anormal, permitindo a mistura de sangue materno e fetal (Erbsloh, 1975; du Plessis e Basson, 1966, citados por Allsopp *et al.*, 2007). No entanto, Allsopp *et al.* (2007), através da utilização de sondas de ADN, sugerem que a transmissão de *T. equi* surge em gestações com placentação normal, pelo que a hipótese de transferência de parasitas durante a quebra natural da placenta, que ocorre como resultado de um parto normal, também

não pode ser deixada de parte. Os mesmos autores referem que, se o mecanismo de transmissão estiver correcto, será impossível impedir a infecção dos fetos no útero, sugerindo que a infecção congénita por *T. equi* em poldros descendentes de éguas portadoras é uma ocorrência relativamente normal.

## 2.5. PATOGÉNESE

Embora se conheça pouco sobre a patogénese das infecções por *B. caballi* e *T. equi*, acredita-se que estes parasitas têm uma patogénese semelhante à de outras espécies de *Babesia* e *Theileria* (de Waal e van Heerden, 2004).

O desenvolvimento progressivo de anemia é típico de infecções por *T. equi*. Os picos de parasitémia são acompanhados por diversos graus de trombocitopenia, hipofosfatemia, hipossideremia, bem como bilirrubinemia. Embora a patogénese da anemia não esteja completamente elucidada, a hipofosfatemia pode desempenhar um papel importante. Os parasitas dos géneros *Babesia* e *Theileria* dependem dos eritrócitos para o seu fornecimento de energia e o aumento da utilização de fósforo por parte dos glóbulos vermelhos pode ser responsável pelo desenvolvimento de um estado hipofosfatémico. Esta situação pode contribuir para a maior fragilidade dos eritrócitos parasitados (Bhoora, 2009; de Waal e van Heerden, 2004; Rego, 2008).

## 2.6. SINTOMATOLOGIA

A maioria dos casos clínicos é causada por *T. equi*, enquanto as infecções por *B. caballi* tendem a ser clinicamente inaparentes e raramente são responsáveis por anemia grave ou por outros sinais típicos de Babesiose (Ali *et al.*, 1996).

O período de incubação da infecção pelo parasita *T. equi* varia entre 12 e 19 dias, enquanto para *B. caballi* varia entre 10 a 30 dias (Ali *et al.*, 1996).

Os casos agudos são caracterizados por febre, normalmente acima de 40 °C, graus variáveis de anorexia e frequências respiratória e cardíaca elevadas. A febre é normalmente acompanhada de sudação, congestão das membranas mucosas e taquicardia. As fezes apresentam-se usualmente menores e mais secas que o normal, com uma coloração verde-amarelada (de Waal e van Heerden, 2004).

Os casos sub-agudos demonstram graus variáveis de anorexia, perda de peso, temperatura rectal elevada ou normal e frequências respiratória e cardíaca elevadas. As membranas mucosas podem apresentar petéquias ou equimoses. Os animais infectados podem apresentar situações de impactação, que poderão ser seguidas de diarreia. A urina apresenta-se geralmente descolorada como resultado dos pigmentos de hemoglobina e biliar, e o baço aumentado (de Waal e van Heerden, 2004).

Apesar da gravidade da forma aguda, a maioria dos animais desenvolve a forma crónica da doença, podendo apresentar reagudizações em circunstâncias que determinem uma diminuição na taxa de anticorpos, como situações associadas a stress (Rego, 2008). A forma crónica da infecção

geralmente apresenta sinais clínicos inespecíficos, como inapetência moderada, perda de peso e queda na performance dos animais. O baço encontra-se normalmente aumentado (de Waal e van Heerden, 2004).

Na sequência da infecção por piroplasmose equina podem surgir complicações secundárias, tais como falha renal aguda, pneumonia, cólica, enterites, laminites, infertilidade e abortos. Raramente, podem ocorrer formas super agudas da doença conduzindo à morte dos animais 24 a 48 horas após o início da sintomatologia (Bhoora, 2009).

## **2.7. TRATAMENTO**

O tratamento da piroplasmose equina baseia-se no uso de drogas que combatam a fase aguda da doença, mas sabe-se que as drogas utilizadas causam vários graus de toxicidade ao hospedeiro, dependendo principalmente das doses administradas (Rego, 2008). Os parasitas *T. equi* são geralmente mais resistentes ao tratamento do que os parasitas *B. caballii* (Kutscha, 2008).

Um grande número de fármacos tem sido utilizado no tratamento de *T. equi*. É conhecida a eficácia de derivados de acridina (e.g. euflavina) contra este protozoário, enquanto as tetraciclinas e seus derivados são menos eficientes (Kutscha, 2008). Resultados preliminares indicam que parvaquone, uma droga anti-*Theileria*, pode ser eficaz no tratamento da infecção por *T. equi* em cavalos, embora não elimine as infecções (de Waal e van Heerden, 2004). Diamidinas aromáticas e compostos relacionados, incluindo diaceturato de diminazeno, diisetionato de amicarbalide e dipropionato de imidocarb, mostram ser das drogas mais eficazes no tratamento de piroplasmose equina (Kutscha,

2008). No entanto, nenhuma das drogas disponíveis é 100% eficaz na erradicação da infecção por *T. equi*, sendo que normalmente as dosagens necessárias são tóxicas para os animais.

A gravidade da doença e o sucesso do tratamento podem também depender da estirpe do protozoário e da susceptibilidade do animal infectado (Brüning, 1996).

Dependendo da gravidade do caso, é por vezes necessária terapia de suporte, podendo incluir infusões de fluidos e/ou sangue, bem como administração de vitaminas, antibióticos, fosfolípidos essenciais e laxantes. Infusões de soluções electrolíticas podem também ser indicadas (Kutscha, 2008).

A erradicação química é raramente recomendada em zonas endémicas, contudo pode ser indicada para cavalos que estão para ser transportados de um país endémico para outro, livre da doença (Kutscha, 2008). Actualmente não estão disponíveis vacinas, por isso todos os animais susceptíveis introduzidos em áreas endémicas devem ser observados cuidadosamente e tratados, se necessário (de Waal e van Heerden, 2004).

## **2.8. CONTROLO E PREVENÇÃO**

Pelo facto dos agentes responsáveis pela piroplasmose equina serem transmitidos por carraças, o seu controlo é uma medida preventiva vital. O número de carraças pode ser reduzido com aplicações regulares de sprays ou banhos acaricidas aos animais, bem como a aplicação de sprays em áreas de erva e arbustos que tenham sido cortados (Rego, 2008).

O corte de áreas de arbusto e ervas longas, utilizadas pelo vector biológico em busca de hospedeiro, ao remover a vegetação em excesso vai auxiliar o programa de controlo global, reduzindo o potencial reprodutivo das carraças, bem como aumentando a eficácia da aplicação de um spray químico (Rego, 2008).

O controlo da entrada de animais domésticos e selvagens, incluindo roedores, nas cavalariças, é também um aspecto importante no controlo das carraças, pois estes animais podem transportar consigo vectores com capacidade de transmissão dos agentes da piroplasmose equina (Rego, 2008).

Assim sendo, o método mais fiável no controlo da piroplasmose equina continua a ser a prevenção da entrada de animais infectados, assegurando que os equinos provenientes de países endémicos sejam sujeitos a uma verificação cuidada e que se encontram livres de carraças (Rego, 2008).

## **2.9. DIAGNÓSTICO**

Várias técnicas têm sido desenvolvidas para o diagnóstico da piroplasmose equina. Estas incluem detecção e diferenciação de protozoários com base nos sinais clínicos, observação de esfregaços sanguíneos, métodos serológicos e moleculares, técnicas baseadas na cultura de células *in vitro*, xenodiagnóstico e inoculação de sangue em animais susceptíveis.

Um diagnóstico correcto do parasita específico envolvido na piroplasmose equina é essencial, pois o protozoário *T. equi* induz infecções de maior severidade e é mais resistente aos tratamentos do que *B. caballi* (Moretti *et al.*, 2009).

Os sinais clínicos de piroplasmose equina, especialmente em áreas endémicas, são inespecíficos e facilmente confundidos com outras doenças, sendo também possível a ocorrência de infecções mistas de *T. equi* e *B. caballi*. Desta forma, torna-se impossível a diferenciação da doença causada por estes dois protozoários tendo por base apenas os sinais clínicos (de Waal, 1992; Bhoora, 2009; Moretti *et al.*, 2009).

### 2.9.1. ESFREGAÇO SANGUÍNEO

A identificação de parasitas (e.g. *T. equi* e *B. caballi*) em esfregaços sanguíneos constitui o diagnóstico definitivo em equinos, embora esta técnica apresente certas limitações, particularmente durante a fase crónica da infecção, devido às baixas parasitémias (Alhassan *et al.*, 2007a).

A detecção de piroplasmose equina por esfregaço fino, corado com solução de Giemsa, é o melhor método de diagnóstico *in loco*, pois é um método relativamente barato e transportável/móvel, sendo uma boa escolha em casos agudos da doença (Böse *et al.*, 1995). A precisão do diagnóstico baseia-se na formação e qualificação do operador, sendo por vezes difícil a identificação de *B. caballi* e *T. equi* em infecções mistas. Um bom operador consegue examinar, no máximo, 100 a 150 esfregaços por dia (Böse *et al.*, 1995), sendo por isso numa técnica relativamente laboriosa quando é necessário analisar um grande número de amostras (Kim *et al.*, 2008).

Contudo, mesmo em casos clínicos agudos de *B. caballi* e *T. equi*, a parasitémia é muito baixa. Para *B. caballi*, a parasitémia varia entre 0,1 e 10%,

enquanto para *T. equi* pode exceder os 20%, situando-se normalmente entre 1 e 5% (Ali *et al.*, 1996).

A vantagem dos esfregaços finos é proporcionar uma boa imagem dos detalhes morfológicos dos parasitas e ser a única técnica microscópica que permite a identificação das espécies (Böse *et al.*, 1995). A identificação de animais portadores, através da análise microscópica de esfregaços sanguíneos, torna-se não só difícil como também pouco precisa (de Waal e van Heerden, 2004). Assim sendo, um resultado negativo obtido pelo exame microscópico não exclui a presença da infecção (Ali *et al.*, 1996).

### 2.9.2. CULTURA *IN VITRO*

Os avanços registados nas técnicas de cultura *in vitro* dos agentes responsáveis pela piroplasmose equina permitiram aos investigadores identificar *T. equi* e *B. caballi* em animais com resultados negativos por análise microscópica e serológica (de Waal e van Heerden, 2004).

A técnica de cultura *in vitro* tem maior sensibilidade para *T. equi* que para *B. caballi*. Este facto deve-se provavelmente aos parasitas de *T. equi* se propagarem mais rapidamente que os parasitas de *B. caballi*, o que também explica a maior prevalência e patogenicidade do protozoário *T. equi* em áreas endémicas (Alhassan *et al.*, 2007b).

Esta metodologia exige um nível tecnológico elevado e pessoal qualificado, podendo apenas ser testadas amostras de sangue fresco. O tempo necessário para a obtenção de resultados é longo e o número de amostras analisadas é baixo, limitando a sua aplicação como teste de diagnóstico.

Contudo, esta técnica pode ser aplicada para a certificação de animais de alto valor, quando estes se destinam à exportação, validação de soros para controlo de testes serológicos e para a avaliação de testes em que se detecta directamente o parasita (Bhoora, 2009; Böse *et al.*, 1995). A cultura *in vitro* é um dos métodos mais específicos para a detecção directa dos protozoários *T. equi* e *B. caballi*, especialmente em infecções sub-clínicas e crónicas (Alhassan *et al.*, 2007b).

### 2.9.3.XENODIAGNÓSTICO

Nesta técnica, uma carraça específica, livre de doença, é alimentada num animal suspeito, podendo o parasita ser seguidamente identificado na própria carraça ou num animal susceptível, após ter sido permitido que a carraça se alimente no mesmo (de Waal e van Heerden, 2004).

### 2.9.4. INOCULAÇÃO DE SANGUE EM ANIMAIS SUSCEPTÍVEIS

Embora se trate de um procedimento incómodo e dispendioso, a inoculação de sangue infectado (500 ml) em animais susceptíveis, de preferência esplectomizados, foi um método muito utilizado no passado, e serviu para identificar infecções latentes. Posteriormente, é essencial que o animal seja mantido sob observação constante na procura de sinais clínicos da doença, sendo o diagnóstico confirmado pela presença de parasitas nos eritrócitos do mesmo (de Waal e van Heerden, 2004; Böse *et al.*, 1995).

## 2.9.5. MÉTODOS SEROLÓGICOS

### 2.9.5.1. Teste de Fixação do Complemento (FC)

O teste de FC foi desenvolvido por Hirato *et al.* (1945), e aceite como teste oficial para a piroplasmose equina pelo Departamento Americano de Agricultura em 1969 (Brüning, 1996).

O princípio de funcionamento do teste baseia-se na fixação do complemento durante a reacção entre o antigénio específico e o anticorpo. Se a reacção é realizada na presença de uma quantidade conhecida de complemento e a quantidade não fixada é detectada, através de uma reacção antigénio-anticorpo em separado, é possível obter uma medida de actividade de fixação do complemento no soro original (Brüning, 1996).

Esta técnica possui algumas limitações, como não detectar infecções latentes (Ikadai *et al.*, 2000). Além disso, esta metodologia não permite testar soros com actividade anti-complementar ou soros que produzam reacções com proteínas eritrocitárias normais. Também, soros com anticorpos da subclasse IgG(T) de resposta secundária, que não fixam o complemento pela via clássica, podem resultar em falsos negativos (Kappmeyer *et al.*, 1999; Katz *et al.*, 2000). Outra lacuna é a produção do antigénio, pois este é produzido em cavalos infectados experimentalmente e esplectomizados (Brüning, 1996; Ikadai *et al.*, 2000).

### **2.9.5.2. Teste de Imunofluorescência Indirecta de Anticorpos (IFI)**

Neste teste, os antígenos do parasita são imobilizados numa lâmina onde irão reagir com o soro teste. Os anticorpos são visualizados sob luz UV, depois da adição e ligação de um anticorpo secundário marcado com fluoresceína (Brüning, 1996).

Em vários estudos, o teste FC tem sido substituído pelo IFI (Rhalem *et al.*, 2001), tendo sido demonstrada a maior sensibilidade deste em relação ao teste FC (Brüning, 1996; Huang *et al.*, 2006; Ogunremi *et al.*, 2008). Por outro lado, o soro mantém-se positivo mais tempo para o teste IFI do que para o teste FC (Brüning, 1996; Huang *et al.*, 2006).

Os problemas associados ao teste IFI incluem reacções cruzadas, alto custo do antígeno e impraticabilidade da análise de um grande número de amostras. Além disso, a avaliação da fluorescência é subjectiva, sendo fácil reconhecer resultados positivos fortes, enquanto a diferenciação entre reacções positivas fracas e reacções negativas pode ser difícil, o que torna a padronização do teste difícil (Bhoora, 2009; Böse *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 2006; Moretti *et al.*, 2009).

### **2.9.5.3. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Os primeiros ELISAs a serem desenvolvidos para diagnose de piroplasmose equina mostraram ter maior sensibilidade em comparação com o teste FC, mas reacções cruzadas entre *B. caballi* e *T. equi* impediram a utilização deste teste para diagnóstico diferencial (Bhoora, 2009; Brüning, 1996).

Com o objectivo de ultrapassar as deficiências dos vários testes serológicos, foi desenvolvido um ELISA de competição (cELISA) para *T. equi* e *B. caballi*. Este teste detecta anticorpos contra *T. equi* e *B. caballi* em soros de equinos utilizando antigénios recombinantes derivados das proteínas – *Equine Merozoit Antigen-1* (EMA-1) para *T. equi*, e *Rhoptry-Associated Protein-1* (RAP-1) para *B. caballi* – e anticorpos monoclonais específicos – MAb 36/133.47 para *T. equi* e MAb 79/17.18.5 para *B. caballi* (Knowles *et al.*, 1991b; Kappmeyer *et al.*, 1999; Knowles *et al.*, 1992). Os anticorpos do soro a ser testado competem com os anticorpos monoclonais para o epítipo da proteína recombinante do parasita, sendo que uma fraca produção de cor indica uma amostra positiva (Kutscha, 2008).

A performance do cELISA depende da imunodominância, estrutura e conservação do epítipo reconhecido, quer pelo anticorpo monoclonal 36/133.97, quer pelos anticorpos equinos anti-EMA-1. EMA-1 é uma proteína imunodominante expressa durante o estágio intra-eritrocitário do parasita *T. equi* (Cunha *et al.*, 2002). As proteínas de superfície do merozoíto participam no reconhecimento, ligação e penetração do parasita nos eritrócitos (Knowles *et al.*, 1991a), tendo já sido demonstrada a eficácia do cELISA na detecção de anticorpos em cavalos de diferentes regiões geográficas (Knowles *et al.*, 1991b). Xuan *et al.* (2001) reportaram um alto grau de homologia entre as sequências de aminoácidos do gene *EMA-1* de 19 estirpes de *T. equi* oriundas de vários países.

O formato do cELISA permite superar os problemas inerentes ao teste FC. Em contraste com este e com o teste IFI, o cELISA permite a testagem de

soros sem diluição, maximizando assim a sensibilidade do teste (Kappmeyer *et al.*, 1999). O teste cELISA provou ser superior ao teste FC na detecção de animais infectados a longo termo com *T. equi* e *B. caballi*. Além disso, este teste mostrou ter maior especificidade para os dois parasitas quando comparado com ELISAs indirectos (Kappmeyer *et al.*, 1999; Shkap *et al.*, 1998).

A utilização de antigénios recombinantes evita a necessidade de se infectarem cavalos e facilita a padronização do teste (Brüning, 1996; Kappmeyer *et al.*, 1999). Por outro lado, o cELISA permite uma leitura objectiva e automática dos resultados (Katz *et al.*, 2000).

Actualmente, o teste FC tem sido substituído pelo teste IFI e cELISA para a detecção de piroplasmose equina (Ogunremi *et al.*, 2008; Jaffer *et al.*, 2009), tendo o cELISA sido utilizado em vários países na detecção de anticorpos específicos anti-*T. equi* (Jaffer *et al.*, 2009; Knowles *et al.*, 1991b; Piotto, 2009; Sevinc *et al.*, 2008).

## 2.9.6. MÉTODOS MOLECULARES

### 2.9.6.1. Sondas de ADN

As sondas de ADN podem ser usadas na detecção de ADN de parasitas em sangue, tecidos e em carraças. O ADN é extraído de uma amostra sanguínea sendo hibridado com uma sonda de ADN marcada, específica para o parasita (Posnett *et al.*, 1991).

Foram descritas sondas de ADN para a detecção de *B. caballi* e *T. equi* (Posnett e Ambrosio, 1989; Posnett e Ambrosio, 1991). Embora estas sondas

fossem capazes de detectar parasitas em animais portadores, a sua sensibilidade teria de ser aumentada para poderem ser utilizadas para certificação de animais livres de parasitas (Bhoora, 2009). Aumentos de sensibilidade na detecção de *B. caballi*, através de sondas de ADN, foram conseguidos com a conjugação de sondas de ADN marcadas com biotina com a Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR) seguida de Southern Blot (Sahagun-Ruiz *et al.*, 1997).

Comparando com as técnicas microscópicas, as sondas de ADN são caras, requerem equipamento especial e o seu processamento é lento. A sensibilidade deste método está limitada pela quantidade de ADN alvo presente na amostra (Böse *et al.*, 1995).

#### **2.9.6.2. Reacção em Cadeia da Polimerase – PCR**

A Reacção em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction – PCR*), tem sido aplicada na detecção de várias espécies de *Babesia* e *Theileria*, tendo sido atribuída maior sensibilidade e especificidade quando comparada com os métodos serológicos (Bhoora *et al.*, 2009).

Esta técnica é usada para amplificar sequências de ADN específicas do parasita. Inicialmente, ADN total, do hospedeiro e do parasita é extraído, sendo o ADN do parasita usado como molde para a reacção de PCR. *Primers* específicos para *B. caballi* e *T. equi* são necessários para testar a presença de ADN destes parasitas. Em seguida, a confirmação da presença de ADN amplificado é feita através de uma electroforese em gel de agarose (Kutscha, 2008).

Um teste baseado na PCR, tendo como gene alvo o 16S ARN ribossomal, foi desenvolvido para a detecção específica de *B. caballi* e *T. equi*, com uma parasitemia detectada de aproximadamente 0,000083% para *T. equi* (Bashiruddin *et al.*, 1999).

Em comparação com as sondas de ADN, a PCR demonstra maior sensibilidade e especificidade na detecção de parasitas sanguíneos. Testes baseados na PCR para a detecção de *Babesia* spp. apresentam uma sensibilidade 100 a 1000 vezes superior aos limites de detecção por microscopia (Nicolaiewsky *et al.*, 2001).

Várias variações da técnica base da PCR têm sido descritas, entre elas o *nested*-PCR. Esta modificação veio aumentar a sensibilidade e especificidade da reacção de PCR convencional, pois utiliza dois pares de *primers*. Um par externo, que gera um produto de PCR normal, e um par que híbrida no interior do produto do par externo, gerando um produto de PCR mais pequeno (Niccholl, 2008; Rampersad *et al.*, 2003). A detecção de *T. equi* por *nested*-PCR tem-se baseado na ampliação de regiões dos genes *EMA-1* (Battsetseg *et al.*, 2002; Nicolaiewsky *et al.*, 2001) e 18S ARN ribossomal (Rampersad *et al.*, 2003).

Nicolaewisky *et al.* (2001) descreveram um limite de detecção, num *nested*-PCR, de seis células infectadas com *T. equi* em  $10^8$  eritrócitos equinos, o equivalente a uma parasitemia de 0.000006%. A capacidade do *nested*-PCR em diagnosticar infecções sub-clínicas é significativa e pode contribuir para o controlo da exportação de animais infectados, bem como para a determinação da eficiência dos tratamentos médicos (Rampersad *et al.*, 2003).

Devido à sensibilidade dos testes baseados na PCR, e particularmente o *nested*-PCR, a ocorrência de falsos positivos devido a contaminações é possível (Böse *et al.*, 1995; Rampersad *et al.*, 2003).

Quando se pretende detectar infecções mistas ou identificar novos genótipos, a reacção de PCR apresenta algumas limitações, pois é necessário realizar várias reacções em separado (Gubbels *et al.*, 1999). Mais recentemente, um *multiplex* PCR foi desenvolvido para simultaneamente detectar *B. caballi* e *T. equi* em cavalos infectados (Alhassan *et al.*, 2005).

#### **2.9.6.3. Reverse Line Blot Hybridization – RBL**

O *Reverse Line Blot Hybridization* (RBL) baseia-se na hibridação entre produtos de PCR e sondas específicas imobilizadas numa membrana (Gubbels *et al.*, 1999).

Esta técnica provou ser altamente sensível e específica quando aplicada no diagnóstico de piroplasmose equina em cavalos, sendo um poderoso método na detecção de infecções sub-clínicas. Além disso, permite o diagnóstico de infecções mistas e a identificação de novos genótipos de *Theileria* e *Babesia* (Nagore *et al.*, 2004).

#### **2.9.6.4. PCR quantitativa em Tempo Real – PCR-qRT**

A técnica da PCR quantitativa em Tempo Real (*quantitative Real-time* PCR – PCR-qRT), é uma alternativa à PCR convencional, que utiliza um sistema de detecção de fluorescência para a medição em tempo real dos produtos amplificados durante toda a reacção, o que possibilita a quantificação

da carga infecciosa de uma amostra (Kim *et al.*, 2008). A detecção e quantificação do produto de PCR ocorrem num único processo, eliminando a necessidade de manipulação de produtos de PCR, reduzindo o risco de contaminação (Bhoora, 2009).

Tanto o gene 18S ARN ribossomal como o *EMA-1* têm sido utilizados como genes alvo de testes baseados na PCR-qRT para detecção de *T. equi* em cavalos (Bhoora *et al.*, 2010b; Heim *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008). Um *multiplex* PCR-qRT foi já descrito para detectar infecções mistas de *B. caballi* e *T. equi* em cavalos (Heim *et al.*, 2007).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. AMOSTRAGEM**

Foram colhidas amostras de sangue da veia jugular de 241 equinos, 98 machos e 143 fêmeas, de várias idades. Destas amostras, 162 foram colhidas no continente português e 79 no arquipélago dos Açores, sendo 26 da ilha Graciosa e 53 da ilha Terceira. As amostras dos Açores provêm de animais directamente importados ou descendente destes, à excepção de um grupo de 21 animais da ilha Terceira, pertencentes à população do Pónei da ilha Terceira. Os animais apresentavam-se aparentemente saudáveis, não se conhecendo dados sobre o seu historial clínico ou de qualquer tratamento prévio.

#### **3.2. COLHEITA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS**

As amostras de sangue, com volume de cerca de 5 ml, foram colhidas após assepsia local (álcool a 96%), por punção da veia jugular. Foram colhidos dois tubos (BD Vacutainer®) de sangue por animal, um tubo com anti-coagulante (EDTA) e um tubo sem anti-coagulante. Após a colheita sanguínea as amostras foram acondicionadas a 4 °C, sendo transportadas para o Centro de Biotecnologia dos Açores, na Universidade dos Açores, no mais curto espaço de tempo possível.

No laboratório, e após a retracção do coágulo, as amostras de sangue em tubos sem anti-coagulante foram centrifugadas a 4000 rpm durante 15 minutos para uma melhor separação do soro. O soro foi transferido, com o

auxílio de pipetas de Pasteur, para tubos de 2 ml e imediatamente armazenado a -20 °C. O soro foi utilizado na realização do cELISA.

O sangue colhido em tubos com anticoagulante foi sujeito a extracção de ADN a fim de se proceder ao diagnóstico de *T. equi* por *nested*-PCR. A extracção de ADN foi adaptada da metodologia proposta por Bashiruddin *et al.* (1999). De cada amostra, 200 µl de sangue foram colocados num microtubo de 1,5 ml, adicionando-se cinco volumes de solução TE (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA) e seguidamente centrifugado a 14000 *g* durante dois minutos. O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento resultante foi lavado por mais três vezes com solução TE, removendo-se o sobrenadante a cada lavagem. Ao fim das lavagens o sedimento foi ressuspendido em 200 µl de água ultrapura estéril. As amostras foram incubadas a 37 °C durante uma hora com 5 µl de proteinase K (20 mg/ml), 20 µl de SDS a 10% e 20 µl de N-lauryl-sarcosine a 10%. Após este período, foram adicionados 250 µl de Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamilico (PCI) na proporção de 25:24:1. As amostras foram agitadas durante aproximadamente três minutos e seguidamente centrifugadas a 13000 rpm durante 15 minutos. Para a precipitação de ADN, a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo e adicionados dois volumes de etanol absoluto. O ADN ficou a precipitar durante a noite a -20 °C. O precipitado de ADN foi centrifugado a 13000 rpm durante dois minutos e o sobrenadante rejeitado. O sedimento foi lavado com álcool a 70% durante 15 minutos, seguindo-se uma centrifugação a 13000 rpm durante dois minutos. O sobrenadante foi retirado e o sedimento deixado a secar ao ar durante uma hora. Por fim o sedimento foi

ressuspendido em 20 µl de água ultrapura esterilizada e armazenado a 4 °C para posterior utilização.

### **3.3. cELISA**

Todos os 241 soros armazenados foram testados para detecção de anticorpos anti-*T. equi* por cELISA, tendo para o efeito sido utilizado o teste comercial “*Babesia Equi* Antibody Test Kit” (VMRD Inc), de acordo com as instruções do fabricante.

Todas as amostras de soro foram testadas em duplicado e em cada microplaca de 96 alvéolos foram utilizados, em triplicado, controlos positivos e negativos fornecidos com o *Kit*.

Resumidamente, os antigénios recombinantes estão imobilizados em cada poço da placa (figura 5a). Os anticorpos presentes no soro a ser testado ligam-se aos antigénios recombinantes imobilizados na placa (figura 5b) e inibem a ligação do anticorpo monoclonal primário ao antigénio recombinante (figura 5c). A ligação do anticorpo monoclonal primário ao antigénio recombinante imobilizado na placa é detectada pela ligação do anticorpo secundário marcado com uma peroxidase (figura 5d). A presença do anticorpo secundário marcado é quantificada pela adição de um substrato e subsequente produção de cor (figura 5e). Uma cor forte (azul escuro) indica pouca ou nenhuma inibição na ligação do anticorpo monoclonal primário e consequentemente ausência de anticorpos no soro testado. Uma cor fraca (azul claro), produzida pela inibição da ligação do anticorpo monoclonal

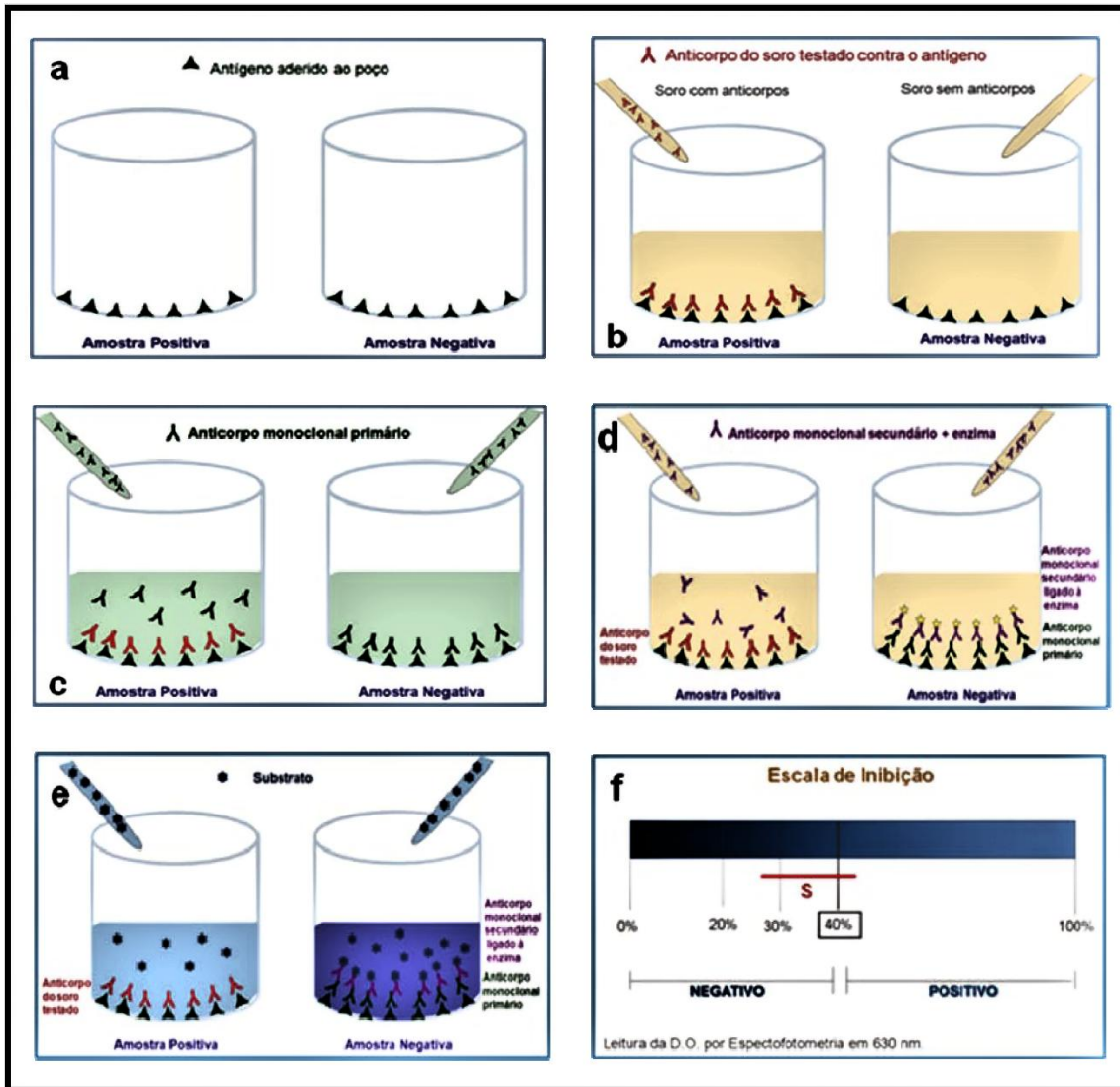
primário ao antigénio recombinante imobilizado na placa, indica a presença de anticorpos anti-*T. equi*, sendo o animal considerado positivo. Assim, o resultado do teste cELISA é sinalizado pela produção de cor após a adição de um substrato e a sua medição é feita através da leitura da densidade óptica no comprimento de onda 630 nm.

Após a leitura, a densidade óptica obtida é usada no cálculo da percentagem de inibição através da seguinte fórmula matemática:

$$\% \text{ de Inibição} = 100 - [(Densidade \text{ óptica da amostra} \times 100) \div (Média \text{ da densidade óptica dos controlos negativos})]$$

A intensidade da coloração obtida é inversamente proporcional à presença de anticorpos, ou seja, quanto mais anticorpos o soro a testar tiver, menor será a densidade óptica produzida. Os soros são considerados positivos se a percentagem de inibição for igual ou superior a 40%, e negativos se a percentagem de inibição for inferior a 40% (figura 5f). Os controlos positivos deverão produzir uma percentagem de inibição superior a 40% para que o teste seja válido.

Cada microplaca, contendo as amostras e os respectivos controlos negativos e positivos, foi submetida à leitura da densidade óptica utilizando o leitor de microplacas (Thermo, Multiskan EX).



**Figura 5** – Sequência de eventos no teste cELISA em amostras positivas e negativas. (a) Antígeno imobilizado na placa. (b) Amostra positiva com ligação dos anticorpos do soro testado ao antígeno e amostra negativa sem ligação. (c) Inibição da ligação do anticorpo monoclonal primário ao antígeno pelo soro teste positivo e ligação do anticorpo monoclonal primário ao antígeno imobilizado na amostra negativa. (d) Não ocorre ligação do anticorpo secundário marcado com a enzima ao anticorpo do soro teste positivo, mas sim ao anticorpo monoclonal primário que não sofreu inibição e ligou-se ao antígeno imobilizado na amostra negativa. (e) A adição do substrato na amostra positiva não provoca alteração na coloração e a sua adição na amostra negativa apresenta consumo pela enzima, sinalizando a presença da ligação do anticorpo monoclonal primário e não de anticorpos presentes no soro teste caracterizando a amostra negativa. (f) Representação esquemática da escala de cor de acordo com a inibição (adaptado de Piotto, 2009).

### 3.4. NESTED-PCR

Em todas as 241 amostras de ADN obtidas testou-se a presença do parasita *T. equi* por *nested*-PCR. A metodologia seguida foi baseada no descrito por Battsetseg *et al.* (2002), com algumas modificações resultantes de um processo de optimização prévio. Para a detecção de ADN de *T. equi* utilizaram-se dois pares de *primers*, um externo e outro interno, tendo como alvo o gene *EMA-1*. Na primeira reacção foi utilizado o *primer* senso EMA-5 (5'-TCGACTTCCAGTTGGAGTCC-3'), e o *primer* anti-senso EMA-6 (5'-AGCTCGACCCACTTATCACC-3'), que amplificam um fragmento de 260 pb, na segunda ampliação (*nested*-PCR), foi utilizado o *primer* senso EMA-7 (5'-ATTGACCACGTCACCATCGA-3'), e o *primer* anti-senso EMA-8 (5'-GTCCTTCTTGAGAACGAGGT-3'), produzindo um fragmento de 219 pb. Para um volume final de 25 µl, foram adicionados 13,5 µl de água ultrapura esterilizada, 2,5 µl de 10x PCR Gold Buffer, 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> a 25 mM, 0,5 µl de dNTPs a 10 mM cada, 2,5 µl de cada um dos *primers* EMA-5 e EMA-6 a 10 pmol/µl, 0,25 µl de Amplitaq Gold® (Applied Biosystems) e 2 µl de ADN. Na segunda reacção (*nested*), utilizaram-se 2 µl dos produtos da primeira reacção de PCR e 2,5 µl de cada um dos *primers* EMA-7 e EMA-8 a 10 pmol/ul, sendo que os restantes componentes e as suas quantidades foram iguais. As amostras foram amplificadas no termociclador (UNO II, Biometra®) com as seguintes condições: activação inicial da enzima a 95°C durante 10 minutos, seguidos de 40 ciclos, de 94 °C durante um minuto para desnaturação, 64 °C durante um minuto para hibridação dos *primers*, 72 °C durante um minuto para amplificação, seguindo-se 72 °C durante 5 minutos para extensão final, no final

os produtos foram mantidos a 4 °C. Em todas as reacções foi utilizado ADN de um controlo positivo (cavalo infectado experimentalmente com *T. equi*) e de um controlo negativo (cavalo negativo) gentilmente cedidos pelo Doutor Donald Knowles (Animal Disease Research Unit, Agricultural Research Service, US Department of Agriculture). Simultaneamente, foram feitas reacções em branco para monitorização de possíveis contaminações.

Os produtos das reacções de PCR, foram submetidos a uma electroforese em gel de agarose a 2% em tampão TAE (40 mM Tris-base; 1 mM EDTA, pH 8,0; 20 mM ácido acético glacial) durante 70 minutos a 100 Volts. O gel foi corado com brometo de etídio e os produtos foram visualizados sobre luz ultravioleta e fotografados.

#### 3.4.1. SEQUENCIAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

Para confirmar a especificidade dos fragmentos obtidos nas reacções de PCR, foram sequenciados os fragmentos com o tamanho esperado resultantes da primeira reacção (260 pb) e da segunda reacção (219 pb). Para as reacções onde só houve amplificação do fragmento com o tamanho esperado, procedeu-se à precipitação dos produtos de PCR com três volumes de etanol a 100% e estes foram ressuspensos em 10 µl de água ultrapura esterilizada. Nas reacções onde foram visualizadas bandas inespecíficas, estas foram extraídas directamente do gel pelo “QIAEX II Gel Extraction Kit” (Quiagen®), de acordo com as instruções do fabricante. Em ambos os casos, a quantidade de ADN foi estimada por electroforese em gel de agarose a 2%. Foi

também sequenciado um fragmento, com aproximadamente 390 pb, amplificado no controlo negativo e em algumas amostras.

Para sequenciação dos fragmentos foi utilizado o “dRhodamine Terminator Cycle sequencing Kit” (Applied Biosystems®). Para um volume final de 10 µl utilizou-se água ultrapura esterilizada, 4 µl de premix, 2 µl de *primer* a 10 pmol/µl e 0,5 µl de produto de PCR. Cada fragmento foi sequenciado nos dois sentidos com os *primers* senso e anti-senso respectivos.

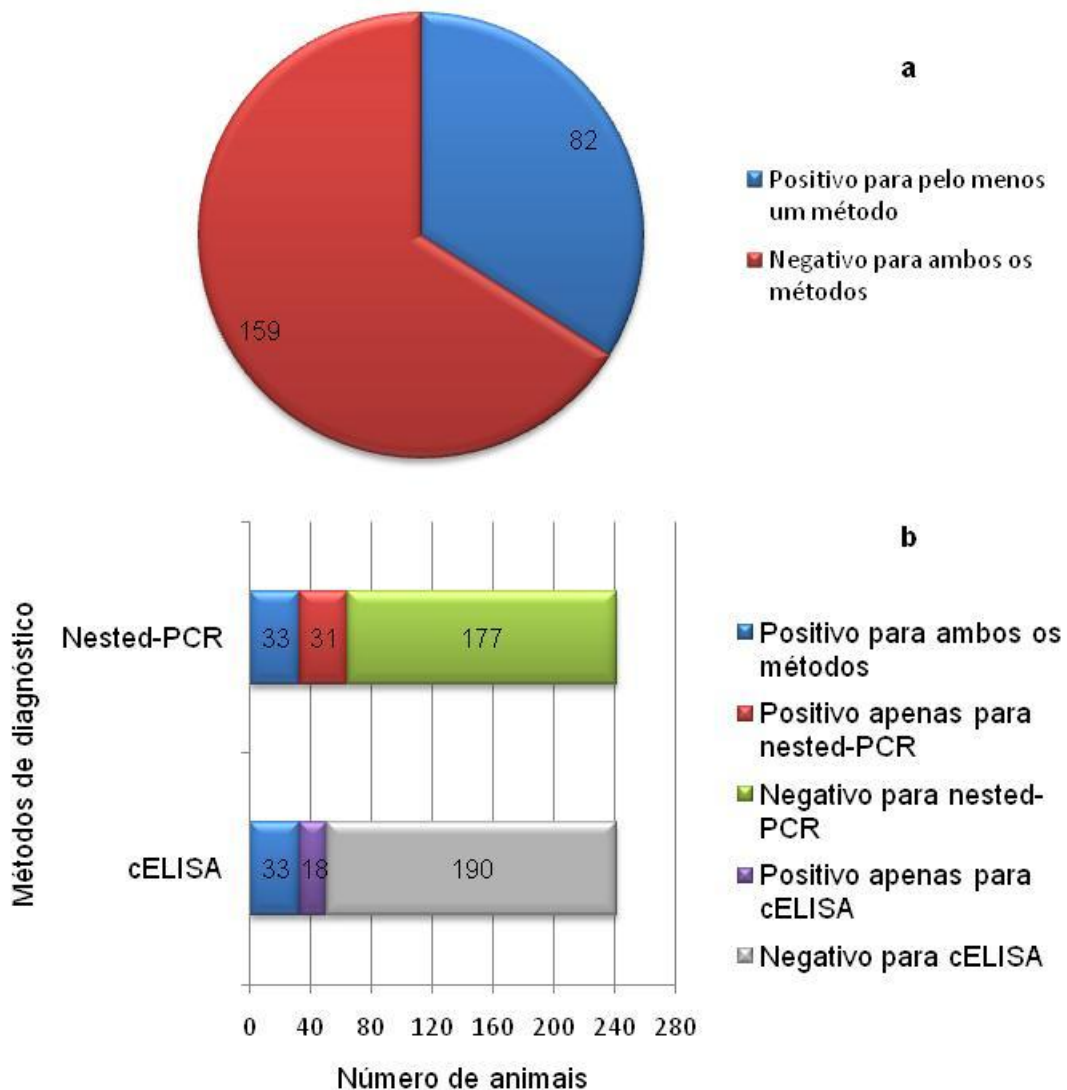
Os produtos finais foram analisados em sequenciador automático (ABI Prism™ 310 Genetic Analyser; PE Applied Biosystems), tendo sido feita a procura de homologias em sequências depositadas no GeneBank com o programa BLASTn.

## 4. RESULTADOS

Na totalidade das 241 amostras analisadas, 82 (34%) amostras apresentaram resultado positivo para pelo menos um dos métodos, enquanto 159 (66%) foram negativas para ambos os métodos (figura 6a). Trinta e três (13,7%) amostras apresentaram resultado positivo para ambos os métodos, tendo 31 (12,9%) registado resultado positivo apenas para o *nested*-PCR e 18 (7,4%) unicamente para o cELISA (figura 6b).

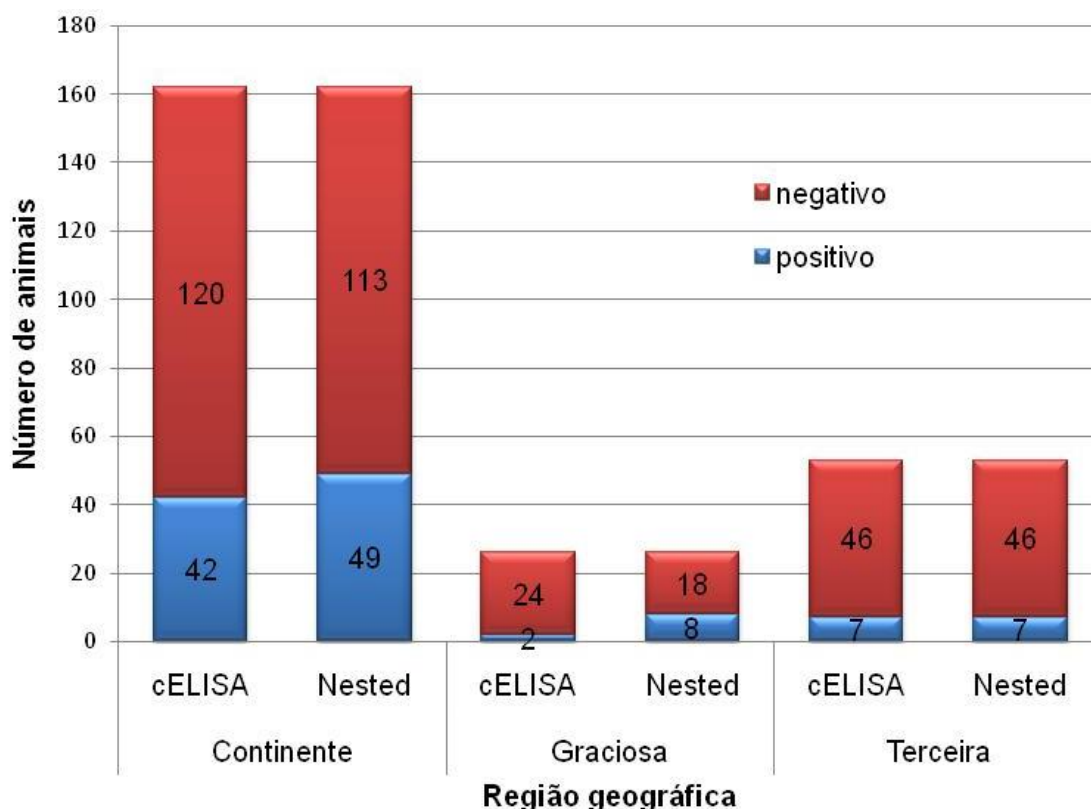
Do total das amostras analisadas pelo teste cELISA obteve-se uma inibição igual ou superior a 40% em 51 (21,2%) amostras, inferido-se daqui que 190 (78,8%) amostras não apresentaram anticorpos anti-*T. equi* (figura 6b). Nas amostras colhidas no continente português, 42 (25,9%) amostras foram positivas, enquanto 120 (74,1%) foram negativas. Dos animais da ilha Graciosa, 2 (7,7%) foram positivos e 24 (92,3%) negativos, enquanto para a ilha Terceira, 7 (13,2%) dos animais apresentaram resultado positivo e 46 (86,8%) resultado negativo (figura 7).

Pelo teste molecular (*nested*-PCR), foi detectada a presença de ADN de *T. equi* em 64 (26,6%) dos 241 animais analisados, sendo os restantes 177 (73,4%) negativos (figura 6b). Das amostras colhidas no continente português, 49 (30,2%) foram positivas sendo as restantes 113 (69,8%) negativas. Em 8 (30,8%) das amostras colhidas na ilha Graciosa foi detectado ADN do parasita, não tendo sido amplificado ADN nas restantes 18 (69,2%) amostras. Na ilha Terceira, 7 (13,2%) das amostras apresentaram resultado positivo, enquanto as restantes 46 (86,8%) foram consideradas negativas (Figura 7).



**Figura 6** – Resultados da diagnose de *T. equi* nas 241 amostras pelos métodos *nested-PCR* e cELISA. (a) amostras positivas para pelo menos um método e negativas para ambos os métodos. (b) amostras positivas para ambos os métodos; amostras positivas apenas para *nested-PCR*; amostras positivas apenas para cELISA; amostras negativas para cELISA e amostras negativas para *nested-PCR*.

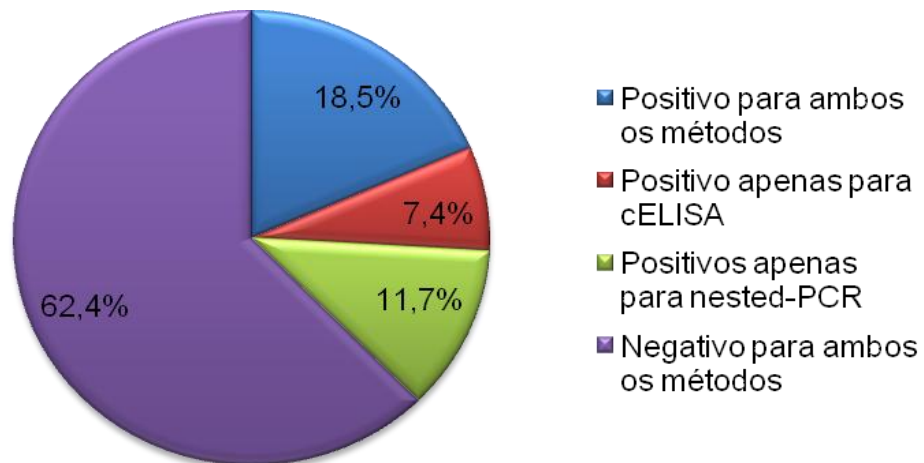
Na amostragem feita na ilha Terceira, 21 das 53 amostras pertencem a animais da população do Pónei da ilha Terceira, tendo-se obtido um resultado negativo simultaneamente para o cELISA e para o *nested-PCR*, para a totalidade destes animais.



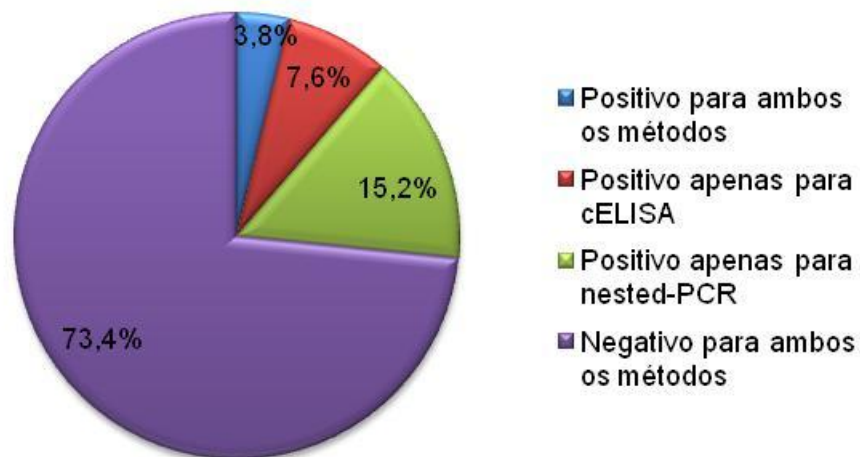
**Figura 7** – Resultados da diagnose de *T. equi* por cELISA e *nested*-PCR nas diferentes regiões geográficas.

Das amostras colhidas no continente português, 12 (7,4%) foram positivas unicamente para o cELISA e 19 (11,7%) positivas apenas para o *nested*-PCR, 30 (18,5%) foram positivas para ambos os métodos e 101 (62,4%) foram negativas para ambos os métodos (figura 8).

No conjunto das amostras colhidas nos Açores, 6 (7,6%) foram positivas apenas para o cELISA e 12 (15,2%) positivas unicamente para o *nested*-PCR, 3 (3,8%) foram positivas para ambos os métodos e 58 (73,4%) foram negativas em simultâneo para ambos os métodos (figura 9).



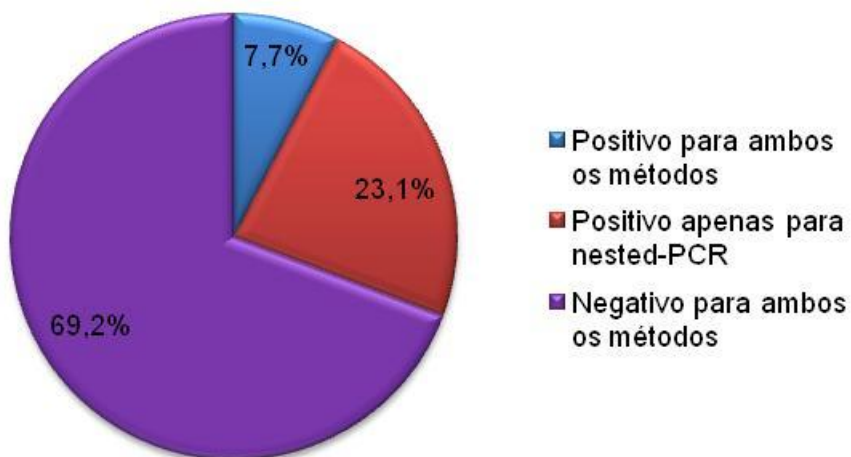
**Figura 8** – Distribuição dos resultados da diagnose de *T. equi* por cELISA e *nested*-PCR no total das 162 amostras do continente português.



**Figura 9** – Distribuição dos resultados da diagnose de *T. equi* por cELISA e *nested*-PCR no total das 79 amostras dos Açores.

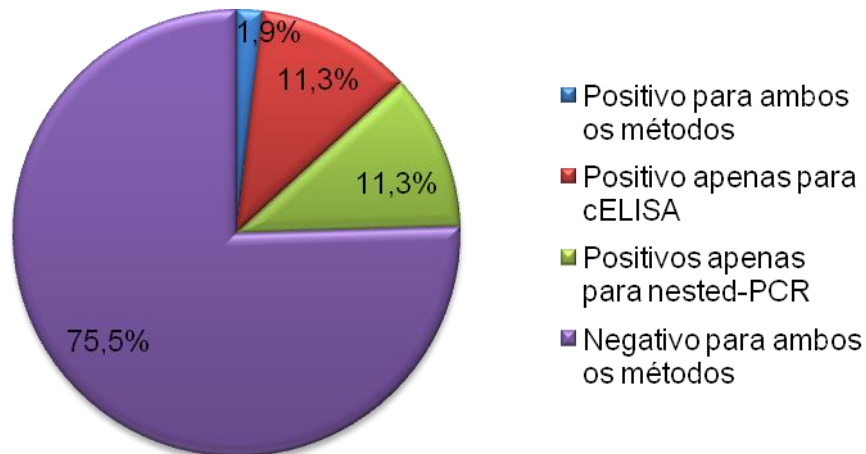
Das amostras colhidas na ilha Graciosa, 18 (69,2%) apresentaram resultado negativo para ambos os métodos, 2 (7,7%) foram positivas para os

dois métodos e 6 (23,1%) foram positivas unicamente para o *nested*-PCR. Nenhuma amostra foi positiva apenas para o cELISA (figura 10).



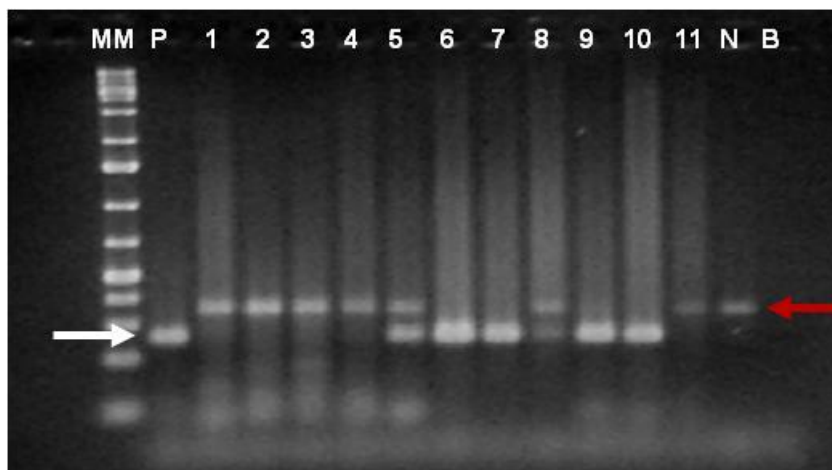
**Figura 10** – Distribuição dos resultados da diagnose de *T. equi* por cELISA e *nested*-PCR no total das 26 amostras da ilha Graciosa.

Relativamente às amostras provenientes da ilha Terceira, 40 (75,5%) foram negativas para ambos os métodos, enquanto apenas uma amostra (1,9%) foi positiva para ambos os métodos, 6 (11,3%) apresentaram resultado positivo apenas para o *nested*-PCR e 6 (11,3%) foram positivas unicamente para o cELISA (figura 11).

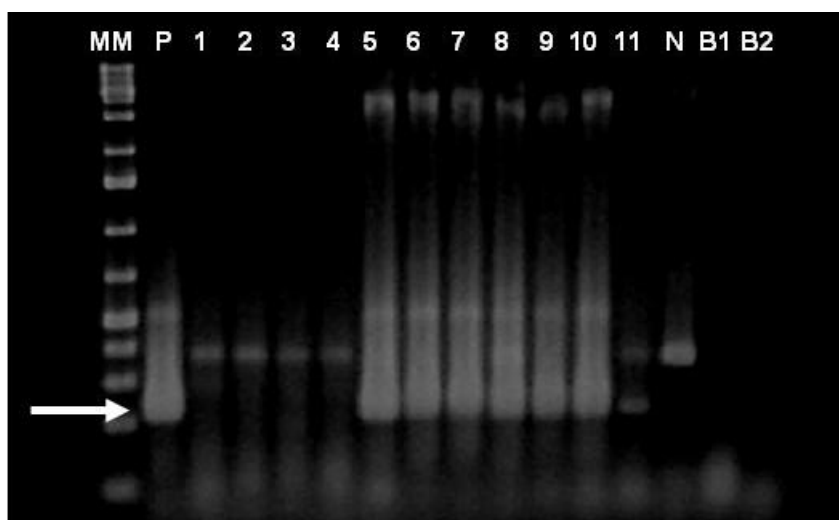


**Figura 11** – Distribuição dos resultados da diagnose de *T. equi* por cELISA e *nested*-PCR no total das 58 amostras da ilha Terceira.

Alguns dos fragmentos, com o tamanho esperado de 260 pb para a primeira reacção (figura 12) e 219 pb para o *nested*-PCR (figura 13), foram sequenciados e comparados com a sequência GeneBank L13784 (figura 14). Todos os fragmentos sequenciados apresentaram 100% de homologia com a sequência referência. Foi também sequenciado o fragmento com o tamanho aproximado de 390 pb (figura 12), amplificado no controlo negativo (cavalo não infectado) e em algumas amostras. Este fragmento mostrou possuir homologia com a sequência depositada no GeneBank: XM\_001916336.1, “Predicted: *Equus caballus* similar to ral guanine nucleotide dissociation stimulator (LOC100068547), mRNA”.



**Figura 12** – Fragmento com 260 pb (seta branca) da primeira reacção de PCR e fragmento inespecífico com aproximadamente 390 pb (seta encarnada). MM: 1 Kb plus leader DNA (Fermentas); P: controlo positivo (cavalo experimentalmente infectado com *T. equi*); Linhas 1-4 e 11: amostras negativas; linhas 5-10: amostras positivas; N: controlo negativo (cavalo não infectado); B: branco (todos os componentes da reacção sem ADN).



**Figura 13** – Fragmento do *nested*-PCR com 219 pb (seta). MM: 1 Kb plus leader DNA (Fermentas); P: controlo positivo (cavalo experimentalmente infectado com *T. equi*); Linhas 1-4: amostras negativas; linhas 5-11: amostras positivas; N: controlo negativo (cavalo não infectado); B1: branco (todos os componentes da reacção mais 2  $\mu$ l do branco da primeira reacção); B2: branco (todos os componentes da reacção sem ADN).

L13784	121	attgaccacg tcaccatcga caagcagtcc gaggagcaca tcgtctacac tgctcatgag
Amostra 187	121	attgaccacg tcaccatcga caagcagtcc gaggagcaca tcgtctacac tgctcatgag
L13784	181	ggctatgcag ttgagaaggt caaggaaggc gactccgtca tcaagacctt tgactgaag
Amostra 187	181	ggctatgcag ttgagaaggt caaggaaggc gactccgtca tcaagacctt tgactgaag
L13784	241	gaacaaaccc caaagactgt cgtcaggcac atcaaggaca acaagccata cgtcgtcatc
Amostra 187	241	gaacaaaccc caaagactgt cgtcaggcac atcaaggaca acaagccata cgtcgtcatc
L13784	301	gccgttgagt ccgcccttca cctcgttctc aagaaggac
Amostra 187	301	gccgttgagt ccgcccttca cctcgttctc aagaaggac

**Figura 14** – Alinhamento da sequência de nucleótidos de um fragmento de 219 pb de uma das amostras analisadas com um segmento da sequência do gene *EMA-1* do protozoário *T. equi*, depositada no GeneBank com a referência L13784. Neste alinhamento pode-se verificar que as sequências apresentam 100% de homologia.

## 5. DISCUSSÃO

Devido ao movimento internacional de equinos ligado a competições desportivas, a piroplasmose equina assume uma posição de destaque a nível mundial, sendo que alguns países impõem fortes restrições à importação, a fim de impedirem a entrada de cavalos portadores da doença. Através deste intenso trânsito de equinos a nível global, a doença disseminou-se a partir de regiões tropicais e sub-tropicais, onde é endémica, para regiões de clima mais temperado. Por esta razão, testes específicos e sensíveis para a detecção de *T. equi* são de grande importância (Bhoora *et al.*, 2010b; Jaffer *et al.*, 2009).

Os sinais clínicos são, frequentemente, variáveis e inespecíficos, sendo a doença facilmente confundida com outras doenças, tornando o diagnóstico difícil. Cavalos que recuperem da fase aguda da infecção por *T. equi* permanecem portadores do parasita, tornando-se potenciais focos de disseminação da doença para áreas indemnes, se não forem detectados aquando da sua importação (Alhassan *et al.*, 2005; Brüning *et al.*, 1999).

Vários testes serológicos têm sido desenvolvidos para detecção de anticorpos específicos contra *T. equi*, nomeadamente, teste FC, IFI e cELISA, sendo que actualmente estes são os testes adoptados internacionalmente para certificação de equinos (Brüning *et al.*, 1996). O cELISA, utilizando proteínas recombinantes, mostrou possuir maior especificidade quando comparado com os testes FC e IFI (Sevinic *et al.*, 2008).

O valor do diagnóstico pelos métodos serológicos é, no entanto, limitado pela impossibilidade de diagnosticar infecções pré-patentes, pela persistência de títulos de anticorpos após a recuperação maternal ou

quimioterapia, bem como a dificuldade na interpretação de baixos títulos. Resultados altamente positivos fornecem um diagnóstico definitivo, enquanto resultados serológicos negativos não excluem a infecção, e os títulos de anticorpos não têm relação directa com a parasitémia (Ali, 1996). Actualmente o teste FC tem sido substituído pelos testes IFI e cELISA (Ogunremi *et al.*, 2008).

Testes baseados em técnicas moleculares têm sido aplicados na detecção de *T. equi*, apresentando maior especificidade e sensibilidade em relação aos testes serológicos, detectando ADN dos parasitas em amostras com uma parasitémia muito baixa (Bhoora *et al.*, 2010a).

Assim, em muitas situações, a combinação de testes serológicos e moleculares apresenta-se como uma ferramenta mais objectiva na detecção de cavalos infectados com *T. equi* (Moretti *et al.*, 2009; Salim *et al.*, 2008).

Neste estudo utilizou-se a conjugação de dois métodos para detecção de *T. equi* em cavalos presentes em duas ilhas açorianas (ilhas Terceira e Graciosa) e em Portugal continental. Para tal, utilizou-se a combinação de um teste molecular (*nested*-PCR), para detecção de ADN do parasita e um serológico (cELISA), para detecção de anticorpos anti-*Theileria*.

Os controlos positivos utilizados no cELISA produziram uma inibição na ligação do anticorpo monoclonal primário superior a 40%, enquanto os controlos negativos produziram inibição inferior a 40%. O cELISA foi capaz de detectar a presença de anticorpos em amostras do continente português e das ilhas Graciosa e Terceira.

Devido à sensibilidade da PCR, em particular o *nested*-PCR, existe sempre a possibilidade da ocorrência de falsos positivos devido a contaminações. Em todos os casos, quer os controlos em branco quer os controlos negativos (cavalo não infectado), apresentaram-se negativos, indicando que as reacções positivas não resultaram de contaminações. Para além disso, todos os produtos positivos (fragmentos com 219 pb e 260 pb) sequenciados apresentaram 100% homologia com a sequência referência, demonstrando a especificidade dos produtos obtidos. Foi amplificado ADN de *T. equi* no controlo positivo, em amostras do continente português e das ilhas Graciosa e Terceira.

Todas as amostras pertencentes aos animais da população do Pónei da ilha Terceira apresentaram resultado negativo para ambos os métodos. Estes animais são descendentes de um pequeno número de indivíduos, que vivem há vários séculos em regime não estabulado na ilha Terceira, sujeitos às condições edafo-climáticas da ilha bem como a possíveis vectores de transmissão do parasita. Assim, das amostras colhidas nos Açores, os casos de animais portadores do protozoário *T. equi* concentraram-se nos animais vindos do exterior dos Açores ou descendentes destes. O facto de estes animais apresentarem resultado negativo para os dois testes utilizados poderá dever-se a uma reduzida exposição destes animais ao parasita, ou a eventuais resistências dos indivíduos desta população.

Num estudo realizado na Turquia, foi detectada uma taxa de infecção por piroplasmose equina pelo teste cELISA em cavalos Árabes superior à encontrada em cavalos Puro Sangue Inglês. Os resultados tornam-se difíceis

de interpretar pois o número de animais analisados da raça Árabe foi reduzido, e no conhecimento dos autores não é conhecida qualquer predisposição dos animais desta raça para a infecção por estes parasitas (Sevinc *et al.*, 2008).

*T. equi* tem como vector biológico a carraça, estando descritas como vectores de transmissão espécies dos géneros *Boophilus*, *Dermacentor*, *Hyalomma* e *Rhipicephalus* (Ikadai *et al.*, 2007). No presente estudo, aparentemente não foram observados carraças a parasitar os cavalos na altura da colheita sanguínea, contudo, é conhecida a presença de espécies potencialmente transmissoras da infecção, nomeadamente na ilha Terceira (Borges *et al.*, 2010). Tornam-se assim necessários estudos tendo em vista uma melhor compreensão da dinâmica dos vectores envolvidos na piroplasmose equina no arquipélago dos Açores. Alterações climáticas e ecológicas em potenciais habitats da carraça, o aumento das populações do vector e do hospedeiro e a frequente mobilidade dos equinos pode, com o tempo, levar a um aumento no número de infecções por *Theileria* spp. na população equina (Sigg *et al.*, 2010).

A suspeita de transmissão transplacentar de *T. equi* em equinos foi recentemente confirmada por Allsopp *et al.* (2007) com recurso a sondas de ADN, pelo que existe a possibilidade de nascimento de animais nos Açores portadores da infecção, quando filhos de éguas portadoras.

Será importante salientar que este estudo poderá não reflectir a situação epidemiológica real, quer no arquipélago dos Açores quer no continente português. Nos Açores, seria pertinente levar a cabo um levantamento

epidemiológico, envolvendo um maior número de animais e abrangendo todas as ilhas do arquipélago.

Da observação dos resultados (241 amostras), verifica-se que o *nested*-PCR detectou um maior número de amostras positivas (64 amostras) quando comparado com o cELISA (51 amostras). É de salientar que os *primers* do *nested*-PCR utilizados neste trabalho não são completamente específicos, como ficou demonstrado pela ampliação de fragmentos inespecíficos, o que poderá originar situações de competição entre o ADN do parasita e o ADN genómico, originando falsos negativos. Deste modo, será importante repensar a sequência dos *primers* de modo a conferir-lhes maior especificidade.

O período pré-patente para infecções por *T. equi* varia entre 12 e 14 dias (Melhorn e Schein, 1998), sendo que o momento da colheita da amostra sanguínea é crítico na detecção de parasitas em circulação na corrente sanguínea. A ocorrência de amostras negativas para cELISA e positivas para *nested*-PCR pode ser explicada pela detecção de ADN do parasita em animais recentemente infectados, antes do desenvolvimento de anticorpos (Bhoora *et al.*, 2010b; Jaffer *et al.*, 2009). Allsopp *et al.* (2007) reportaram a detecção de ADN de *T. equi* em fetos com menos de quatro meses de gestação, indicando que a transmissão transplacentária ocorreu antes do suficiente desenvolvimento do sistema imunitário, não permitindo o reconhecimento destes parasitas como estranhos. Assim sendo, os parasitas, já presentes no organismo, serão reconhecidos como parte integrante deste pelo neonato. Diferenças antigénicas nos parasitas transmitidos na subsequente infecção natural irão induzir, então, uma resposta imunitária em animais infectados

congenitamente. Poldros nascidos de éguas portadoras de *T. equi* em áreas endémicas normalmente adquirem anticorpos maternos via colostro, que podem ser detectados até aos cinco meses de vida (Donnelly *et al.*, 1982).

Cavalos infectados por *T. equi*, permanecerão portadores da infecção para toda a vida (de Waal e van Heerden, 2004). Assim, cavalos que sejam positivos pelo teste cELISA deveriam sê-lo também para o *nested*-PCR, a menos que a parasitemia esteja abaixo do limite de detecção do teste em específico. A ocorrência de variações na sequência do gene alvo, neste caso no gene *EMA-1*, ou existência de inibidores da reacção de PCR, podem também inviabilizar a detecção do ADN do parasita por *nested*-PCR (Allsopp *et al.*, 2007; Bhoora, 2009; Bhoora, *et al.*, 2010b).

Num estudo de campo realizado na África do Sul, foi detectada uma taxa de infecção por *T. equi* em 83% das amostras pelo teste IFI, enquanto pelo teste RBL, foi detectado ADN do parasita em 73% das amostras (Bhoora, *et al.*, 2010b). A RBL é uma técnica altamente específica e sensível, com uma sensibilidade comparável ao *nested*-PCR (Nagore *et al.*, 2004).

Analisando a totalidade das amostras colhidas nos Açores, 6 (7,6%) animais apresentaram resultado positivo exclusivamente para o cELISA, enquanto 12 (15,2%) foram apenas positivas para o *nested*-PCR. Para ambos os testes, 3 (3,8%) animais apresentaram resultado positivo.

Este estudo, no conhecimento do autor, é o primeiro a utilizar técnicas moleculares para a detecção de *T. equi* em equinos nos Açores, sendo também a primeira vez que são detectados cavalos portadores do parasita no arquipélago.

Com base nos resultados deste estudo, torna-se evidente a necessidade de repensar a gestão do movimento de equinos no arquipélago, não só a nível da entrada de animais exteriores à região, mas também no trânsito inter-ilhas. O recurso a períodos de quarentena, verificação cuidada da presença de carraças e utilização em simultâneo do cELISA e *nested-PCR* são medidas a ter em conta, numa estratégia de condicionamento da entrada de animais portadores de *T. equi* nos Açores, bem como no controlo da doença a nível interno.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Alhassan, A., Pumidonming, W., Okamura, M., Hirata, H., Battsetseg, B., Fujisaki, K., Yokoyama, N., Igarashi, I. 2005. Development of a single-round and multiplex PCR method for the simultaneous detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in horse blood. *Veterinary Parasitology*. 129: 43-49.
- Alhassan, A., Thekisoe, O.M.M., Yokoyama, N., Inoue, N., Motloang, M.Y., Mbatia, P.A., Yin, H., Katayama, Y., Anzai, T., Sugimoto, C., Igarashi, I. 2007a. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for diagnosis of equine piroplasmiasis. *Veterinary Parasitology*. 143: 155-160.
- Alhassan, A., Govind, Y., Tam, N.T., Thekisoe, O.M.M., Yokoyama, N., Inoue, N., Igarashi, I. 2007b. Comparative evaluation of the sensitivity of LAMP, PCR and in vitro culture methods for the diagnosis of equine piroplasmiasis. *Parasitology Research*. 100: 1165-1168.
- Ali, S., Sugimoto, C., Onuma, M. 1996. Equine Piroplasmiasis. *Journal of Equine Sciences*. 7: 67-77.
- Allsopp, M.T.E.P., Lewis, B.D., Penzhorn, B.L. 2007. Molecular evidence for transplacental transmission of *Theileria equi* from carrier mares to their apparently healthy foals. *Veterinary Parasitology*. 148: 130-136.
- Bashiruddin, J.B., Cammà, C., Rebêlo, E. 1999. Molecular detection of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horse blood by PCR amplification of part of the 16S rRNA gene. *Veterinary Parasitology*. 84: 75-83.

- Battsetseg, B., Lucero, S., Xuan, X., Claveria, F., Byambaa, B., Battur, B., Boldbaatar, D., Batsukh, Z., Khaliunaa, T., Battsetseg, G., Igarashi, I., Nagasawa, H., Fujisaki, K. 2002. Detection of equine *Babesia* spp. gene fragments in *Dermacentor nuttalli* Olenev 1929 infesting Mongolian horses, and their amplification in egg and larval progenies. *Journal of Veterinary Medical Science*. 64: 727-730.
- Bhoora, R. 2009. Molecular characterization of *Babesia caballi* and *Theileria equi*, the aetiological agents of equine piroplasmiasis, in South Africa. Tese de Doutorado. Pretoria: University of Pretoria, Faculty of Veterinary Science. pp. 175.
- Bhoora, R., Franssen, L., Oosthuizen, M.C., Guthrie, A.J., Zwegarth, E., Penzhorn, B.L., Jongejan, F., Collins, N.E. 2009. Sequence heterogeneity in the 18S rRNA gene within *Theileria equi* and *Babesia caballi* from horses in South Africa. *Veterinary Parasitology*. 159: 112-120.
- Bhoora, R., Quan, M., Matjila, P.T., Zwegarth, E., Guthrie, A.J., Collins, N.E. 2010a. Sequence heterogeneity in the equi merozoite antigen gene (*ema-1*) of *Theileria equi* and development of an *ema-1*-specific TaqMan MGB™ assay for the detection of *T. equi*. *Veterinary Parasitology*. 172: 33-45.
- Bhoora, R., Quan, M., Franssen, L., Butler, C.M., Van der Kolk, J.H., Guthrie, A.J., Zwegarth, E., Jongejan, F., Collins, N.E. 2010b. Development and evaluation of real-time PCR assays for the quantitative detection of *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses from South Africa. *Veterinary Parasitology*. 168: 201-211.

- Boldbaatar, D., Xuan, X., Battsetseg, B., Igarashi, I., Battur, B., Batsukh, Z., Bayambaa, B., Fujisaki, K. 2005. Epidemiological study of equine piroplasmosis in Mongolia. *Veterinary Parasitology*. 127: 29-32.
- Borges, P.A., Costa, A., Cunha, R., Gabriel, R., Gonçalves, V., Martins, A.F., Melo, I., Parente, M., Raposeiro, P., Rodrigues, P., Santos, R.S., Silva, L., Vieiras, P., Vieira, V. (Ed.). 2010. A list of the terrestrial and marine biota from the Azores. Cascais, Portugal: Príncipeia. pp. 432.
- Böse, R., Jorgensen, W.K., Dalgliesh, R.J., Friedhoff, K.T., de Vos, A.J. 1995. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Veterinary Parasitology*. 57: 61-74.
- Brüning, A. 1996. Equine piroplasmosis an update on diagnosis, treatment and prevention. *British Veterinary Journal*. 152: 139-151.
- Brüning, A., Phipps, P., Posnett, E., Canning, E.U. 1997. Monoclonal antibodies against *Babesia caballi* and *Babesia equi* and their application in serodiagnosis. *Veterinary Parasitology*. 68: 11-26.
- Camacho, A.T., Guitian, F.J., Pallas, E., Gestal, J.J., Olmeda, A.S., Habela, M.A., Telford, S.R., Spielman, A. 2005. *Theileria (Babesia) equi* and *Babesia caballi* infections in horses in Galicia, Spain. *Tropical Animal Health and Production*. 37: 293-302.
- Coelho, I.A. (20 de Março de 2008). Região poderá exportar cavalos. Acedido em 10 de Julho de 2010, de [expressodasnove.pt](http://www.expressodasnove.pt): <http://www.expressodasnove.pt/interiores.php?id=1888>

- Cunha, C.W., Kappmeyer, L.S., McGuire, T.C., Dellagostin, O.A., Knowles, D.P. 2002. Conformational dependence and conservation of an immunodominant epitope within the *Babesia equi* erythrocyte-stage surface protein Equi Merozoite Antigen 1. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 9: 1301-1306.
- de Waal, D.T. 1992. Equine piroplasmiasis: a review. *British Veterinary Journal*. 148: 6-14.
- de Waal, D.T., van Heerden, J. 2004. Equine piroplasmiasis. In J.A. Coetzer, R.C. Tustin (Ed.), *Infectious Diseases of Livestock* (2<sup>a</sup> ed.). USA: Oxford University Press. pp. 425-432.
- Donnellan, C.M.B. 2006. Effect of atropine and glycopyrrolate in ameliorating the clinical signs associated with the inhibition of cholinesterase activity by imidocarb dipropionate in horses. *Dissertação de Mestrado*. Pretoria: University of Pretoria, Faculty of Veterinary Science. pp. 88.
- Donnelly, J., Phipps, L.P., Watkins, K.L. 1982. Evidence of maternal antibodies to *Babesia equi* and *B. caballi* in foals of seropositive mares. *Equine Veterinary Journal*. 14: 126-128.
- du Plessis, J.L., Basson, P.A. 1966. Babesiosis in aborted equine foetuses: a report on two cases in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*. 37: 267-269.
- Erbsloh, J.K.E. 1975. Babesiosis in the newborn foal. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*. 23: 725-726.

- Gerstenberg, C., Allen, W.R., Phipps, L.P. 1999. Mechanical transmission of *Babesia equi* infection in a British herd of horses. In U. Wernery, J.F. Wade, J.A. Mumford, O.R. Kaaden (Ed.), Proceedings of the Eight International Conference on Equine Infectious Diseases. Dubai: Newmarket, R. & W. Publications. pp. 217-222.
- Gubbels, J.M., de Vos, A.P., van der Weide, M., Viseras, J., Schouls, L.M., de Vries, E., Jongejan, F. 1999. Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by Reverse Line Blot Hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*. 37: 1782-1789.
- Heim, A., Passos, L.M.F., Ribeiro, M.F.B., Costa-Júnior, L.M., Bastos, C.V., Cabral, D.D., Hirzmann J., Pfister, K. 2007. Detection and molecular characterization of *Babesia caballi* and *Theileria equi* isolates from endemic areas of Brazil. *Parasitology Research*. 102: 63-68.
- Heuchert, C.M.S., de Giulli, V., de Athaide, D.F., Böse, R., Friedhoff, K.T. 1999. Seroepidemiologic studies on *Babesia equi* and *Babesia caballi* infections in Brazil. *Veterinary Parasitology*. 85: 1-11.
- Hirato, K., Ninomiya, M., Uwano, Y., Kuth, T. 1945. Studies on the complement fixation reaction for equine piroplasmiasis. *Japanese Journal of Veterinary Sciences*. 77: 204-205.
- Homer, M.J., Aguilar-Delfin, I., Telford, S.R., Krause, P.J., Persing, D.H. 2000. Babesiosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 13: 451-469.

- Huang, X., Xuan, X., Yokoyama, N., Katayama, Y., Anzai, T., Igarashi, I. 2006. Evaluation of enzyme-linked immunoborbenent assays with recombinant antigens for the serodiagnosis of equine *Babesia* infections. *Veterinary Parasitology*. 140: 158-161.
- Ikadai, H., Osorio, C. R., Xuan, X., Igarashi, I., Kanemaru, T., Nagasawa, H., Fujisaki, K., Suzuki, N., Mikami, T. 2000. Detection of *Babesia caballi* infection by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant 48-kDa merozoite rhoptry protein. *International Journal for Parasitology*. 30: 633-635.
- Ikadai, H., Sasaki, M., Ishida, H., Matsuu, A., Igarashi, I., Fujisaki, K., Oyamada, T. 2007. Molecular evidence of *Babesia equi* transmission in *Haemaphysalis longicornis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 76: 694-697.
- Jaffer, O., Abdishakur, F., Hakimuddin, F., Riya, A., Wernery, U., Schuster, R.K. 2009. A comparative study of serological tests and PCR for the diagnosis of equine piroplasmosis. *Parasitology Research*. 106: 709-713.
- Kappmeyer, L.S., Perryman, L.E., Hines, S.A., Baszler, T.V., Katz, J.B., Hennager, S.G., Knowles, D.P. 1999. Detection of equine antibodies to *Babesia caballi* by recombinant *B. caballi* Rhoptry-Associated Protein 1 in a Competitive Inhibition Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 37: 2285-2290.

- Katz, J., Dewald, R., Nicholson, J. 2000. Procedurally similar competitive immunoassay systems for the serodiagnosis of *Babesia equi*, *Babesia caballi*, *Trypanosoma equiperdum*, and *Burkholderia mallei* infection in horses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 12: 46-50.
- Kim, C., Blanco, L.B.C., Alhassan, A., Iseki, H., Yokoyama, N., Xuan, X., Igarashi, I. 2008. Diagnostic real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria equi* from equine blood samples. *Veterinary Parasitology*. 151: 158-163.
- Knowles, D.P., Perryman, L.E., Goff, W.L., Miller, C.D., Harrington, R.D., Gorham, J.R. 1991a. A monoclonal antibody defines a geographically conserved surface protein epitope of *Babesia equi* merozoites. *Infection and Immunity*. 59: 2412-2417.
- Knowles, D.P., Perryman, L.E., Kappmeyer, L.S., Hennager, S.G. 1991b. Detection of equine antibody to *Babesia equi* merozoite proteins by a monoclonal antibody-based Competitive Inhibition Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 29: 2056-2058.
- Knowles, D.P., Kappmeyer, L.S., Stiller, D., Hennager, S.G., Perryman, L.E. 1992. Antibody to a recombinant merozoite protein epitope identifies horses infected with *Babesia equi*. *Journal of Clinical Microbiology*. 30: 3122-3126.
- Knowles, D.P. 1996. Equine Babesiosis (piroplasmiasis): A problem in the international movement of horses. *British Veterinary Journal*. 152: 123-126.

- Kouam, M., Kantzoura, V., Masuoka, P.M., Gajadhar, A.A., Theodoropoulos, G. 2010. Genetic diversity of equine piroplasms in Greece with a note on speciation within *Theileria* genotypes (*T. equi* and *T. equi*-like). *Infection, Genetics and Evolution*. 10: 963-968.
- Kutscha, J. 2008. Effects of specific equine Babesiosis treatments on equine oro-caecal transit time as measured by the Lactose <sup>13</sup>C-Ureide Breath Test. Tese de Doutoramento. Munich: Ludwig-Maximilians-University, Faculty of Veterinary Medicine.
- Laveran, A. 1901. Contribution à l'étude du Piroplasma equi. *Comptes rendus dès séances. Société de Biologie et de ses Filiales*. 53: 385-388.
- Malta, M.J.P.V. 2001. Diagnóstico de *Babesiose* e *Theileriose* Equinas no Alentejo. Dissertação de Mestrado. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária.
- Melhorn, H., Schein, E. 1998. Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Melhorn, Schein 1998. *Parasitology Research*. 84: 467-475.
- Moretti, A., Mangili, V., Salvatori, R., Maresca, C., Scoccia, E., Torina, A., Moretta, I., Gabrielli, S., Tampieri, M.P., Pietrobelli, M. 2009. Prevalence and diagnosis of *Babesia* and *Theileria* infections in horses in Italy: A preliminary study. *The Veterinary Journal*. 184: 346-350.
- Nagore, D., García-Sanmartín, J., García-Pérez, A.L., Juste, R.A., Hurtado, A. 2004. Detection and identification of equine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blotting: epidemiological survey and phylogenetic analysis. *Veterinary Parasitology*. 123: 41-54.

- Niccholl, D.S. 2008. An introduction to genetic engineering. New York: Cambridge University Press. pp. 336.
- Nicolaiewsky, T.B., Richter, M.F., Lunge, V.R., Cunha, C.W., Delagostin, O., Ikuta, N., Fonseca, A.S., da Silva, S.S., Ozaki, L.S. 2001. Detection of *Babesia equi* (Laveran, 1901) by nested polymerase reaction. *Veterinary Parasitology*. 101: 9-21.
- Nuttall, G.H., Strickland, C. 1910. Die Parasiten des Pferdepiroplasmose resp. der 'Biliary fever'. *Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten Abteilung*. 56: 524-525.
- Ogunremi, O., Halbert, G., Mainar-Jaime, R., Benjamin, J., Pfister, K., Lopes-Rebollar, L., Georgiadis, M.P. 2008. Accuracy of an indirect fluorescent antibody test and of a complement-fixation test for the diagnosis of *Babesia caballi* in field samples from horses. *Preventive Veterinary Medicine*. 83: 41-51.
- Öncel, T., Vural, G., Gıcık, Y., Arslam, M.Ö. 2007. Detection of *Babesia (Theileria) equi* (Laveran, 1901) in horses in the Kars Province of Turkey. *Türkiye Parazitoloji Gergisi*. 31: 170-172.
- Phipps, L.P., Otter, A. 2004. Transplacental transmission of *Theileria equi* in two foals born and reared in the United Kingdom. *Veterinarian Record*. 154: 406-408.

- Piotto, M.A. 2009. Determinação da infecção por *Theileria equi* e *Babesia caballi* em equinos alojados no Jockey Clube de São Paulo por meio da técnica de C-ELISA (Competitive Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Dissertação de Mestrado. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. pp. 63.
- Posnett, E.S., Ambrosio, R.E. 1989. Repetitive DNA probes for the detection of *Babesia equi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 34: 75-78.
- Posnett, E.S., Ambrosio, R.E. 1991. DNA probes for the detection of *Babesia caballi*. *Parasitology*. 102: 357-365.
- Posnett, E.S., Fehrsen, J., de Waal, D.T., Ambrosio, R.E. 1991. Detection of *Babesia equi* in infected horses and carrier animals using a DNA probe. *Veterinary Pathology*. 39: 19-32.
- Rampersad, J., Cesar, E., Campbell, M.D., Samlal, M., Ammons, D. 2003. A field evaluation of PCR for the routine detection of *Babesia equi* in horses. *Veterinary Parasitology*. 114: 81-87.
- Rego, B.M.C.D. 2008. Estudo da infecção natural por protozoários dos géneros *Babesia* e *Theileria* numa exploração coudélica do Ribatejo. Dissertação de Mestrado. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária. pp. 69.
- Rhalem, A., Sahibi, H., Lasri, S., Johnson, W.C., Kappmeyer, L.S., Hamidouch, A., Knowles, L.P., Goff, W.L. 2001. Validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosing *Babesia equi* infections of Moroccan origin and its use in determining the seroprevalence of *B. equi* in Morocco. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 13: 249-251.

- Rolão, N.M.C.J. 2004. Mecanismos de transformação celular em *Theileria* sp. Tese de Doutoramento. Lisboa: Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Higiene e Medicina Tropical. pp. 65.
- Sahagun-Ruiz, A., Waghela, S.D., Holman, P.J., Chieves, L.P., Wagner, G.G. 1997. Biotin-labeled DNA probe in a PCR-based assay increases detection sensitivity for the equine hemoparasite *Babesia caballi*. *Veterinary Parasitology*. 73: 53-63.
- Salim, B.O.M., Hassan, S.M., Bakheit, M.A., Alhassan, A., Igarashi, I., Karanis, P., Abdelrahman, M.B. 2008. Diagnosis of *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses in Sudan using ELISA and PCR. *Parasitology Research*. 103: 1145-1150.
- Serra, J.M.S., Fonseca, I.M.P., Carvalho, L.M.M., Varela, M.C. 1993. Estudo das parasitoses dos equídeos do Ribatejo: II Babesioses. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 1.
- Sevinc, F., Maden, M., Kumas, C., Sevinc, M., Ekici, O.D. 2008. A comparative study on the prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in horse sub-populations in Turkey. *Veterinary Parasitology*. 156: 173-177.
- Shkap, V., Cohen, I., Leibovitz, B., Savitsky, Pipano, E., Avni, G., Shofer, S., Giger, U., Kappmeyer, L., Knowles, D. 1998. Seroprevalence of *Babesia equi* among horses in Israel using competitive inhibition ELISA and IFA assays. *Veterinary Parasitology*. 76: 251-259.
- Sigg, L., Gerber, V., Gottstein, B., Doherr, M.G., Frey, C.F. 2010. Seroprevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in the Swiss horse population. *Parasitology International*. 59: 313-317.

Uilenberg, G. 2006. Babesia - A historical overview. *Veterinary Parasitology*. 138: 3-10.

Xu, Y., Zhang, S., Huang, X., Bayin, C., Xuan, X., Igarashi, I., Fujisaki, K., Kabeya, H., Maruyama, S., Mikami, T. 2003. Seroepidemiologic studies on *Babesia equi* and *Babesia caballi* infections in horses in Jilin Province of China. *Journal of Veterinary Medical Science*. 65: 1015-1017.

