

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

TESE

Avaliação experimental e estudos a campo relacionados
a *Theileria equi* (Laveran, 1901) Mehlhorn & Schein,
1998 em *Canis familiaris* no Município de Seropédica,
Rio de Janeiro, Brasil.

Gil Vicente Oliveira da Silva

2006



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

**AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL E ESTUDOS A CAMPO
RELACIONADOS A *Theileria equi* (LAVERAN, 1901) MEHLHORN &
SCHEIN, 1998 EM *Canis familiaris* NO MUNICÍPIO DE SEROPÉDICA,
RIO DE JANEIRO, BRASIL.**

GIL VICENTE OLIVEIRA DA SILVA

Sob a Orientação do Professor
Carlos Luiz Massard
e Co-orientação do Professores
Fernando Queiroz Almeida & Jairo Dias Barreira

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em**
ciências, no Curso de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias, Área de
Concentração em Parasitologia
Veterinária

Seropédica, RJ
Abril de 2006

636.089696

S586a

T

Silva, Gil Vicente Oliveira da, 1975-

Avaliação experimental e estudos a campo relacionados a *Theileria equi* (Laveran, 1901) Mehlhorn & Schein, 1998 em *Canis familiaris* no município de Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil / Gil Vicente Oliveira da Silva. – 2006.

49f. : il.

Orientador: Carlos Luiz Massard.

Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária.

Bibliografia: f. 39-49.

1. Babesiose – Seropédica(RJ) – Teses. 2. Babesiose em cavalo – Seropédica(RJ) – Teses. 3. Cão – Infecções – Seropédica(RJ) – Teses. 4. Protozoologia veterinária – Teses. I. Massard. Carlos Luiz, 1947- . II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.Instituto de Veterinária. III. Título.

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

GIL VICENTE OLIVEIRA DA SILVA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

TESE APROVADA EM 19/04/2006

Carlos Luiz Massard, Ph.D. UFRRJ
(Orientador)

Jairo Dias Barreira, Ph.D. FIOCRUZ

Nádia Regina Pereira Almosny, Ph.D. UFF

Guido Fontgalland Coelho Linhares, Ph.D. UFG

Assinatura
Romário Cerqueira Leite, Ph.D. UFMG

DEDICATÓRIA

“In memoriam: Ao meu Pai, VICENTE JOÃO DA SILVA, que sempre se orgulhou e vibrou com cada avanço e entristeceu-se com cada queda na minha vida. Devo-lhe: O Dom de ser quem sou, com todas as alegrias e agruras inerentes a isso; meu senso de honestidade, trabalho e respeito ao próximo. Sinto-me extremamente honrado por ser seu filho! Não receba um adeus, mas um até breve de minha parte! E de onde o senhor estiver, Pai me conceda sempre sua Benção...”

“As minhas Menininhas: GIULIA, EMANUELLE & MARIANA DE JESUS DA SILVA, que tenho a honra de Deus ter me concedido à incumbência de exercer a Paternidade. Vocês são, minhas filhas, uma grande, senão, a maior motivação para que Eu siga em frente nos meus objetivos e proposições.”

“ A minha Super Mãezona, JORGINA FRANCISCA OLIVEIRA DA SILVA, que desde a minha mais tenra idade, foi coruja, mas não omissa e permissiva! Esta vitória, Mãe, também, é sua! Sou Grato a Deus por ter me concedido a senhora com Anjo-da-Guarda.” “Obrigado por sempre acreditar em Seu Filho.”

“ A minha Amada, Confidente & Companheira, EDNA SANTOS DE JESUS DA SILVA, que sempre com seu equilíbrio, bom senso e principalmente Amor & Carinho, ajudou-me a galgar mais um de meus objetivos. Edna nós estamos de parabéns! Obrigado por você fazer parte de minha história e ter me concedido a privilégio de fazer parte da Sua.”

“ Ao meu Tio-Padrinho, JORGE MATIAS DE OLIVEIRA, que desde sempre foi um forte pilar e exemplo em meu desenvolvimento quanto pessoa! E que certamente me tem e sempre terá como um Filho.”

AGRADECIMENTOS

Ao Professor CARLOS LUIZ MASSARD, do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), pela orientação, amizade e estímulo não somente na vida acadêmica, mas sobre tudo me prestigiou diversas vezes com sua Sabedoria de vida. Causa-me profundo orgulho ser contado com um de seus discípulos e amigos, desde a ocasião da Iniciação Científica.

Ao colega, incansável, paciente e organizado, HUARRISSON AZEVEDO SANTOS, que me emprestou grande parte de seus dons e tempo e me concedeu o prazer do convívio a amizade. Ao não menos dedicado, e parceiro JULIO TOMOMI TAJIRI parafraseando meu orientador: Estes rapazes são “de ouro”.

Ao Dr. JAIRO DIAS BARREIRA, pelas suas sempre pertinentes considerações com respeito à metodologia científica e, principalmente, por sua sincera amizade.

Ao Dr. GUIDO FONTGALLAND COELHO LINHARES, Departamento de Doenças Parasitárias da Escola de Veterinária da Universidade Federal do Goiás por sua preciosa orientação no tocante à logística e a execução dos exames de Biologia Molecular, bem como nas estratégias para seu melhor aproveitamento e resultados, e por sempre estar disposto a abrir as portas de seu Departamento, sem nenhum tipo de reserva ou ressalva.

A Doutoranda, CRISTIANE DIVAN BALDANI, Curso de Pós-Graduação em Patologia Animal / UNESP / Jaboticabal pela sua disponibilidade, competência e boa vontade, quanto à ajuda, necessária e relevante nos exames sorológicos, em mais uma etapa.

A minha “Mãe-científica”, Dr.^a NÁDIA REGINA PEREIRA ALMOSNY, do Departamento de Patologia e Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense (UFF), por suas considerações sempre pertinentes, sua amizade, confiança e sempre bom exemplo de caráter, que tenho o privilégio de dispor desde a iniciação científica.

A Dr.^a ROSANGELA ZACARIAS MACHADO, Departamento de Patologia Animal / UNESP / Jaboticabal, por estar sempre disponível a esclarecimentos concernentes a este e outros trabalhos, bem como ter subsidiado a confecção dos exames sorológicos, nos cedendo substrato necessário para confecção dos mesmos.

Ao Professor FERNANDO QUEIROZ DE ALMEIDA, por suas considerações sempre pertinentes a respeito da organização e metodologia deste trabalho, bem como seu competente apoio nos momentos em que o solicitei.

Aos Colegas ANSELMO AFONSO GOLINSKY & KÁTIA ROBERTA FERNANDES, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias / Parasitologia Veterinária / UFRRJ, por haverem cedido gentilmente as lâminas positivas para *Babesia equi* provenientes de animais de seus próprios experimentos, para utilização nos testes sorológicos.

A todos os Professores do Departamento de Parasitologia Animal da UFRRJ, que contribuíram decisivamente para a minha maturidade profissional com seus exemplos de austeridade e bom senso que lhes é peculiar.

Aos senhores funcionários: OSVALDO, JORGE, ANTÔNIO, ARCANJO, GILMAR MONTEIRO, JOÃO BENTO E GILMAR SACRAMENTO, dentre outros do Departamento de Parasitologia Animal, pela presteza e apoio constante, durante o Curso de Doutorado.

A CAPES, que atuante quanto agente financiador e mantenedor ao longo de meu curso proporcionou os subsídios indispensáveis para confecção e elaboração deste trabalho.

“Meu filho, se aceitares as minhas palavras e guardares contigo meus mandamentos dando ouvido atento à Sabedoria e inclinando teu coração para conheceres a prudência; se invocares a Sabedoria e clamares a prudência; se a procurares como ao dinheiro, e a esquadrinhares como a um tesouro, então compreenderás o TEMOR DO SENHOR e alcançarás o conhecimento de Deus. Porque é o Senhor quem dá a Sabedoria, e de sua boca procedem Conhecimento e Prudência. Ele reserva habilidade aos retos e será um escudo para os que caminham com integridade; protegerá as veredas de quem anda na justiça e os caminhos dos Santos guardará. Então conhecerás a Justiça e o Direito, a Equidade e todo bom caminho, porque a Sabedoria entrará no teu coração e o Conhecimento será o teu Prazer.”

Provérbios 2, 1-10.

BIOGRAFIA DO AUTOR

GIL VICENTE OLIVEIRA DA SILVA, filho de VICENTE JOÃO DA SILVA e JORGINA FRANCISCA OLIVEIRA DA SILVA, nascido a 20 de Abril de 1975, no bairro de Campo Grande, na cidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Cursou o primeiro Grau no Colégio Delta, Santa Cruz, Rio de Janeiro, do período de 1979 a 1986, de onde saiu com o 6º ano concluído e na Escola Municipal João Proença, Campo Grande, Rio de Janeiro, onde concluiu o 8º ano em 1988. Posteriormente ingressou no Colégio Estadual Professor Fernando de Almeida Raja Gabaglia, Campo Grande, Rio de Janeiro, onde cursou e concluiu o segundo grau em 1991.

Em Agosto de 1992, ingressou no Curso de Graduação em Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, município de Seropédica, Rio de Janeiro. Foi durante a graduação Bolsista de Iniciação Científica – PIBIC/CNPq do Instituto de Biologia, Departamento de Parasitologia Animal, no período de Julho de 1996 à Julho de 1997, sob a orientação do Professor DR. CARLOS LUIZ MASSARD, desenvolvendo o projeto de título: Ocorrência de Ehrlichia spp. em animais silvestres no Estado do Rio de Janeiro, auxiliando também a coleta de material e dados para a tese de Doutorado da DR.^a NÁDIA REGINA PEREIRA ALMOSNY, e sob orientação da mesma, estagiou no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Faculdade de Veterinária, Departamento de Clínica Veterinária, na Universidade Federal Fluminense, Vital Brasil, Niterói, Rio de Janeiro, no período de 1996 a 1997.

Ingressou no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária – Parasitologia Veterinária, em Março de 2000, no qual defende a dissertação de Mestrado, versando sobre o tema: *Caracterização de uma área enzoótica peri-urbana no Estado do Rio de Janeiro com avaliação de aspectos hematológicos e bioquímicos séricos e revisão bibliográfica sobre Babesiose Equina no Continente Americano*, defendido em Fevereiro de 2002.

Prestou concurso e ingressou no então Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Parasitologia Veterinária. Foi alocado no Programa de cooperação interconstitucional (PROCAD / CAPES), ao qual tinha como responsável o DR. CARLOS LUIZ MASSARD.

Participou como um dos consultores para testes de eficácia de produto babesicida e anaplasmicida, solicitados a FAPUR pelo grupo Akzo Nobel – Divisão Intervet / saúde animal

Participou ainda, de convênio interinstitucional envolvendo três instituições: Universidade Estadual Norte-Fluminense / UFRRJ; Universidade Federal do Espírito Santo / UFRRJ, a primeira participação deu-se como palestrante para a pós-graduação da primeira instituição; a segunda participando como docente em aulas de parasitologia para o curso de graduação em Medicina Veterinária, no *Campus* Alegre.

Durante a pós-graduação participou de vários eventos científicos institucionais e nacionais, apresentando temas de sua especialidade. Em revistas científicas publicou três artigos em protozoologia e acarologia, todos relacionados à área da Medicina Veterinária Preventiva, versando sobre carrapatos e doenças transmissíveis.

RESUMO

SILVA, Gil Vicente Oliveira da. **Avaliação experimental e estudos a campo relacionados a *Theileria equi* (Laveran, 1901) Mehlhorn & Schein, 1998 em *Canis familiaris* no Município de Seropédica – Estado do Rio de Janeiro – Brasil.** Seropédica: UFRRJ, 2006, 49 p. (Tese–Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2006.

As piroplasmoses eqüinas são doenças que variam de progressão debilitante a fatal, tendo como agentes causais às espécies *Theileria equi* e *Babesia caballi*. A manutenção dessas espécies na natureza, bem como a habilidade de dispersão das mesmas, são fatores limitantes quanto ao melhoramento genético dos plantéis eqüinos tendo em vista as restrições internacionais referentes ao trânsito de animais acometidos com estes patógenos. No Brasil, em termos econômicos estas parasitoses assumem grande vulto tendo em vista que o plantel nacional de eqüinos é estimado em 5.800.000 de cabeças que somado aos asininos chega-se ao total de 8.300.000. A elucidação dos elos referentes à história natural da doença, sobretudo os que propiciam a perpetuação da mesma em nossos plantéis, torna-se urgente e necessário. Nota-se que algumas espécies mantêm um convívio estreito com eqüídeos dentre as quais a *Canis familiaris*. Com o propósito de avaliar a possibilidade da espécie *C. familiaris* estar envolvida na cadeia epizootiológica da espécie *T. equi*, utilizamos duas abordagens: experimental e epizootiológica. Para a primeira, utilizando materiais procedentes de dezessete cães adultos e filhotes os quais foram divididos em três grupos: G₁ – Cães filhotes; G₂ – Cães adultos; G₃ – Cães adultos e filhotes imunossuprimidos, mantidos livres de ixodídeos, desde a ocasião do nascimento até o término das avaliações experimentais referentes à possibilidade da espécie *C. familiaris* ser hospedeira viável de *T. equi*. Para avaliar o estabelecimento da *T. equi* nestes animais, foram utilizadas para isto as seguintes ferramentas diagnósticas: aspecto parasitológico - esfregaços sanguíneos à microscopia óptica de imersão; sorológico - por meio de pesquisa de anticorpos anti-*T. equi*, utilizando a reação de imunofluorescência indireta (RIFI); e molecular, utilizando quatro diferentes protocolos de reação de polimerização em cadeia (PCR), nos seguintes materiais: sangue total com EDTA; fragmentos de diversos órgãos; ninfas de *Boophilus microplus* e adultos de *Rhipicephalus sanguineus*. No segundo momento, Avaliou-se, por três vezes, doze cães provenientes de área de estabilidade enzoótica para *T. equi* com estreita convivência com cavalos desde a ocasião de seus nascimentos, utilizou-se para isto a MOI e RIFI, formando o grupo G₄. Os resultados foram negativos em todas as observações. Conclui-se que a espécie *T. equi* não se mostrou hábil quanto ao estabelecimento e desenvolvimento em *C. familiaris*, e que esta espécie não está envolvida na cadeia epizootiológica natural da *T. equi*, no Município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Palavras chave: epizootiologia; equino; piroplasmose.

ABSTRACT

SILVA, Gil Vicente Oliveira da. **Experimental Assessment and Field studies about *Theileria equi* (Laveran, 1901) Mehlhorn & Schein, 1998 in *Canis familiaris* in municipality of Seropédica – State of Rio de Janeiro – Brazil.** Seropédica: UFRRJ, 2006, 49 p. (Thesis Doctor Science in Veterinaries Sciences). Veterinary Institute, Animal Parasitology Department, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2006.

The equines piroplasmosis are diseases that may cause debilitating progress or fatal episodes, its etiologic agents are the species *Theileria equi* and *Babesia caballi*. The maintenance of these species in nature, as well as the widespread ability, are limitants factor to genetic improvement of equines herds in view of the international restrictions referring the accomited animals transit with these patogens. In Brazil, in economic terms these patogens have a great importance because the national erd is stimated in 5,800,000 of animals, that dropped with the asinines, arrive in 8,300,000 of animals. The eluciding of links to the natural disease history, overall the ones that propitiate the perpetuation of it in our herds, becomes urgent and necessary. Note that some species have a sight convivence with equines, among it is the *Canis familiaris*. With purpose to evaluate the possibility of *C. familiaris* to be involved on epizootiologic natural chain of *T. equi*, we used two boarding: experimental and epizootiologic. For the first, using material from seventeen dogs and puppies that were divided in three groups: G1 – Puppies; G2 – Dogs; G3 – immunossuprimitted dogs and puppies, both ixodids-free since birth until end of experimental evaluations referring the possibility to *C. Familiaris* to be a able host to *T. equi*. to evaluate the occurrence of *T. equi* in these animals, were used some diagnostic tools, as follow: parasitologic aspect – blood smears in immersion optical microscopy (IOM); sorology: using research of antibodies against *T. equi*, with immunofluorescence indirect test (IFT); and molecular – using four differents protocols of polimerase chain reaction (PCR), in follow material: blood with EDTA; fragment of tissues; *Boophilus microplus* nymphs and *Rhipicephalus sanguineus* in adult stage. In the second moment, evaluated, for three times, twelve dogs from enzootic stability area to *T. equi* with a sight convivence with horses since birth occasions, using for it IMO and IFT, forming G4 group. The results were negatives in all observations. Concluding that the *T. equi* specie did not show the ability to establishment and development in *C. Familiaris*; and that specie do not involved in epizootiologic natural chain of *T. equi*, in municipality of Seropedica, State of Rio de Janeiro, Brazil.

Key words: epizootiology; equine, piroplasmosis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Histórico dos Agentes Etiológicos de Piroplasmoses em Eqüinos e Cães	3
2.2 Posição Taxonômica	5
2.3 Vetores das Piroplasmoses Eqüinas no Mundo	6
2.4 Sinais Clínicos e Patologia Clínica das Piroplasmoses Eqüina	6
2.5 Epidemiologia das Piroplasmoses Eqüinas no Mundo	8
2.5.1 Epidemiologia nos continentes asiático, africano e europeu	8
2.5.2 Epidemiologia na América do norte e central	10
2.5.3 Epidemiologia na América do sul	10
2.5.4 Epidemiologia no Brasil	11
2.6 Piroplasmoses Canina no Mundo	12
2.6.1 <i>Babesia canis</i> (PIANA & GALLI-VALÉRIO 1895)	12
2.6.2 <i>Babesia gibsoni</i> (PATTON, 1910)	14
2.6.3 <i>Rangelia vitalii</i> (PESTANA, 1910)	17
2.6.4 <i>Theileria annae</i> ZÄHLER, RINDER, SCHEIN & GOTHE, 2000.	18
2.6.5 <i>Theileria equi</i> (LAVERAN, 1901) MEHLHORN & SCHEIN, 1998.	19
2.7 Diagnóstico	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Local de Execução	22
3.2 Origem do inoculo, cálculo da parasitemia e inoculação experimental de <i>T. equi</i> em <i>Canis familiaris</i>	22
3.3 Origem, formação dos grupos e manutenção de <i>C. familiaris</i>	22
3.3.1 Avaliação dos aspectos clínicos dos cães	23
3.3.2 Protocolo de imunossupressão	23
3.4 Origem, obtenção e manutenção de carrapatos	24
3.4.1 Larvas de <i>Boophilus microplus</i> livres de <i>Babesia</i> spp	24
3.4.2 Obtenção ninfas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> livres de parasitos do gênero <i>Babesia</i>	24
3.4.3 Procedimento de infestação nos espécimes <i>C. familiaris</i> adultos	25
3.5 Coleta de Amostras de Sangue	25
3.5.1 Parasitologia	25

3.5.2 Hematologia, sorologia e biologia molecular	26
3.6 Coleta de amostras de outros tecidos	26
3.6.1 Biopsia de linfonodos	26
3.6.2 Fragmentos de outros órgãos <i>Post-mortem</i>	26
3.7 Hematologia:	27
3.8 Sorologia:	27
3.8.1 Origem do extrato antigênico	27
3.8.2 Confeção da reação de imunofluorescência indireta	27
3.9 Biologia Molecular	28
3.9.1 Escolha dos protocolos	28
3.9.2 Extração de DNA	28
3.9.3 Reações em cadeia de polimerase	29
3.9.4 Controle positivo para PCR	29
3.9.5 Confeção da eletroforese	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Grupos G1 e G2	30
4.1.1 Aspectos clínico-parasitológicos	30
4.1.2 Aspectos sorológicos	30
4.1.3 Aspectos moleculares	30
4.2 Grupo G3	34
4.2.1 Aspectos clínico-parasitológicos	34
4.2.2 Aspectos moleculares	34
4.2.3 Aspectos biológicos	35
4.3 Grupo G4	37
4.3.1 Aspectos parasitológicos	37
4.3.2 Aspectos sorológicos	37
5 CONCLUSÕES	39
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1	Distribuição, utilizando ferramentas de diagnóstico sorológicos, nos continentes asiáticos, europeu e africano das espécies <i>Theileria equi</i> e <i>Babesia caballi</i>
Tabela 2	Distribuição geográfica da espécie <i>Babesia canis</i> em canídeos
Tabela 3	Distribuição geográfica da espécie <i>Babesia gibsoni</i> em canídeos
Figura 1	Variação da temperatura dos cães filhotes Grupo 3, inoculados com <i>Theileria</i>

- equi*, no período de Julho 2004 à Setembro 2004
- Figura 2 Variação da temperatura dos cães adultos Grupo 2, inoculados com *Theileria equi*, no período de Novembro 2004 a Janeiro 2005.
- Figura 3 Variação da temperatura dos cães adultos imunossuprimidos do Grupo 3, inoculados com *Theileria equi*, no período de Setembro à Outubro 2005

1 INTRODUÇÃO

As Piroplasmoses eqüinas são doenças anemiantes que possuem ampla distribuição mundial. É importante lembrar que somente 10% do plantel eqüino mundial estão alocados em áreas de instabilidade enzoótica, o que na ocasião da exposição aos agentes causais podem apresentar diversos tipos de danos, principalmente nos quadros agudos, que não raramente evoluem para morte. Trata-se de parasitoses que acometem preferencialmente a família Equidae, tendo como agentes etiológicos: *Babesia equi* e *Babesia caballi*.

Recentemente, os avanços nas áreas de biologia molecular, sobretudo nas avaliações de sequenciamento e filogenia, e das observações da ocorrência de esquizogonia pré-eritrocítica em *B. equi*; houve uma variação quanto aos táxons gênero e família, na espécie *B. equi*, que passando a ser designada: *Theileria equi*; Família Theileriidae.

Espécies de piroplasmídeos são transmitidas por carrapatos da família Ixodidae, diferindo, entretanto, na transmissão: horizontal ou transestadial, no tocante à espécie *B. equi* (= *T. equi*); e vertical ou transovariana, na espécie *B. caballi*. Existindo alguns relatos que contrariam essas afirmativas, tais como: *Hyalomma anatolicum anatolicum*, na espécie *B. equi* (= *T. equi*) (NEITZ, 1956a) e *Rhipicephalus evertsi evertsi*, em *B. caballi* (DE WAAL & POTGIETER, 1987), respectivamente.

O estado portador assintomático dos equinos facilita a disseminação dos agentes *B. equi* (= *T. equi*) e *B. caballi*, em locais de instabilidade enzoótica, motivando a comunidade científica de modo geral, a buscar meios de diagnósticos cada vez mais exequíveis e sensíveis, para a detecção destes hemoparasitos. Cabe ressaltar que, por questões ecológicas o manejo integrado de artrópodes, sobretudo o voltado para o controle de carrapatos, torna-se urgente à indicação de medidas sanitárias adequadas para o controle destas parasitoses, ficando os aspectos iatrogênicos e de transmissão vertical entre os hospedeiros vertebrados, em segundo plano.

Quanto aos métodos diagnósticos, foi consenso internacional a utilização do Teste de Fixação de Complemento (TFC), descrito primeiramente para a espécie *B. caballi* por. Esta técnica foi mais tarde adotada e padronizada pelo “United States Department of Agriculture” (USDA) no ano de 1969, passando a ser utilizada como de referência internacional. Desde então, este teste é obrigatório na ocasião de importação de cavalos para os mais variados fins, ganhando especial notoriedade no intercâmbio e exportação entre áreas de estabilidade para áreas de instabilidade enzoótica. A utilização da microscopia óptica, em esfregaços sanguíneos corados por diversos métodos, sobretudo o de Giemsa, mostra-se extremamente conclusivo quanto à existência desses agentes etiológicos, porém não apresentem um grau de sensibilidade seguro, havendo assim, a possibilidade de diagnósticos falsos negativos. O desenvolvimento de novos instrumentos de diagnósticos proporciona um amplo espectro de escolha quanto à relação sensibilidade e especificidade, tanto nos testes detecção direta, tais como: “Single-round Polimerase Chain Reaction (PCR)” e “Nested-round PCR”; Cultivo em eritrócitos; Teste de aglutinações em tubos capilares; Como nos de detecção indireta: Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (ELISA), tanto o simples quanto o de inibição competitivo.

Recentemente com a utilização da PCR a *B. equi* (= *T. equi*) pode ocorrer em *Canis familiaris*, e *B. canis*, em *Equus caballus*. Os autores dessa afirmativa utilizaram marcadores específicos para cães, para eximir o achado de qualquer suspeita de má-manipulação. A observação desta relação não é entendida pelos mesmos, como imprópria tendo em vista a estreita relação que estas espécies apresentam, principalmente em meios rurais e sugeram assim a existência de uma antiga relação entre parasito-hospedeiro, nas espécies em questão.

A pesquisa direcionada ao esclarecimento dos elos epidemiológicos, principalmente no que tange manutenção desses parasitos na natureza, assume um grande vulto do ponto de

vista científico e econômico. A eqüinocultura no Brasil vem destacando-se quanto à melhoria do aspecto genético e na qualidade de nossos animais, especialmente em competições eqüestres no âmbito mundial. A eqüinocultura é um setor de nossa economia, que gera divisas e empregos em nosso País. O Plantel eqüino no Brasil já ultrapassa 5.700.000, que somados aos outros solípedes chega a 8.300.000 .

Este trabalho teve por objetivo verificar se em condições naturais e experimentais, a espécie *C. familiaris* esta envolvida na cadeia epidemiológica de *B. equi* (= *T. equi*), comportando-se como reservatório para esta espécie própria de solípedes em geral, sobretudo na espécie *E. caballus*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico dos Agentes Etiológicos de Piroplasmoses em Equinos e Cães

BABÉS (1888), ao avaliar sangue proveniente de bovinos com hemoglobinúria e febre delta do Rio Danúbio na Romênia descreveu a ocorrência da espécie *Hematococcus bovis*. Mais tarde, STARCOVICI (1893) propôs a criação do gênero *Babesia* em homenagem ao pesquisador romeno, primeiro observador destes hemoparasitos.

PATTON (1895) descreveu o gênero *Piroplasma*, para hemoparasitos intraeritrocíticos não pigmentados que apresentam elementos esféricos, piriformes ou ovóides, e de grande proporção com relação aos eritrócitos que se multiplica por divisão binária, os gametas, se existentes, eram tidos como incomuns. A sua multiplicação se efetua em ixodídeos que os transmitem para suas proles. Em alguns casos, podendo ocorrer a transmissão transestadial principalmente em carrapatos heteroxenos.

A descoberta em cães de caça na província de Lombardia, na Itália, de parasitos intraeritrocíticos grandes, com relação ao diâmetro do eritrócito, piriforme e ovóide, foram designados por PIANA & GALLI-VALÉRIO (1895), como *Piroplasma canis*.

DIONISI (1898), descreveu o gênero *Achromaticus* como parasitos não pigmentados em hemácias e que se apresentam de forma piriforme ou arredondada, e com “grande” dimensão se comparados com o diâmetro dos eritrócitos. Observou também que, o local de esquizogônia era incerto, mas que ao nível dos eritrócitos, realizavam divisão do tipo binária. Naquela época esses autores antes acreditaram ser este gênero a fase de transição evolutiva entre os gêneros *Plasmodium* e *Piroplasma*.

A babesiose equina foi durante muito tempo caracterizado como “síndrome” por veterinários na África do Sul, como citou THEILER (1901). Este autor enviou a França aos cuidados de LAVERAN, que ao examinar amostras de sangue equino, caracterizou e descreveu o agente etiológico como *Piroplasma equi*. Mais tarde, THEILER (1902) comprovou a existência da diferença etiológica entre a febre biliar, causada por vírus e piropilasmose equina causada por protozoários.

BETTENCOURT, FRANÇA E BORGES (1907) *Apud* BRUMPT (1936), descreveram o gênero *Theileria* como parasitos intraeritrocíticos, que apresentam formas de bacilos, ovóides e piriformes de “pequeno porte”, dividindo-se em dois e estes evoluindo para 4 formas, trofozoíticas. Ressaltaram que os elementos que formavam a cruz eram bem pequenos, arredondados e quase que exclusivamente compostos de cromatina. Na descrição da esquizogonia, observaram que a mesma ocorria em gânglios linfáticos. O gênero possui ixodídeos como hospedeiros invertebrados, não sendo descrita, porém, a transmissão do tipo transovariana.

Mais tarde, FRANÇA (1909), propõe a criação de um novo gênero para espécie *Piroplasma equi*, passando esta a ser classificada como *Nuttallia equi* (LAVERAN, 1901) FRANÇA, 1909. Isto se baseou na presença de formas em cruz, que apresentavam um protoplasma mais abundante que o gênero *Theileria*. Esse gênero foi considerado impróprio para o parasito de equinos por se tratar de um nome pré-ocupado por um molusco bivalvo da América do Norte (PEIRCE, 1975 *Apud* LINHARES, 1994).

Posteriormente, PATTON (1910), descreveu a presença de pequenas formas parasitárias, com diversos aspectos: anelar, ovóide (ligeiramente maior), em cães de caça em Madras, Índia, designando a nova espécie como *Piroplasma gibsoni*, em homenagem ao Dr. F. M. GIBSON, que foi o primeiro a observar este agente etiológico.

Ao avaliarem a etiologia da febre biliar dos eqüídeos inoculados com a cepa sul-africana, NUTTALL & STRICKLAND (1912), encontraram além do *Piroplasma equi*, um parasito intraeritrocítico maior, distinto, o qual considerou em definitivo como uma nova espécie, demonstrando a ocorrência de uma outra espécie nas hemácias dos eqüinos. Esta espécie foi designada *Piroplasma caballi*.

DE KOCK (1918) publicou um trabalho relatando o insucesso do tratamento da nuttalliose em cavalos, com o uso de uma gama de componentes químicos como o azul de trypan, o qual foi efetivo para *B. caballi*.

KELSER (1922) reportou a epizootia da doença em 17 cavalos do exército dos EUA, que desembarcaram no Panamá. A associação do ixodídeo *Anocentor (Dermacentor) nitens* (NEUMANN, 1897) com piroplasmose eqüina, incriminando-o como possível agente transmissor da *B. caballi*, identificando o último como o agente etiológico da doença. NEITZ (1956) revisou a classificação dos piroplasmídeos, colocando os gêneros *Nuttallia*, *Achromaticus* e *Piroplasma*, como sinônimas do gênero *Babesia* STARCOVICI, 1893, da família Babesiidae POCHE. Assim, esse autor considerou o gênero *Babesia*, como único da família Babesiidae, caracterizando-o pelo tipo e local de reprodução no hospedeiro vertebrado (divisão binária em eritrócitos) diferentemente do gênero *Theileria* da família Theileriidae a qual se caracteriza por divisão esquizogônica em leucócitos e invasão de eritrócitos.

A piroplasmose eqüina tomou proporções endêmicas nos Estados Unidos da América (EUA) em 1961, devido à importação de animais originários de Cuba, região endêmica para a enfermidade, que chegaram Flórida, e que possivelmente disseminaram a doença para outros estados, devido ao intenso trânsito de cavalos e presença do vetor *A. nitens*, transmissor de *B. caballi* (ROBY & ANTHONY, 1963; BRYANT *et al.*, 1969; THOMPSON, 1969; BRÜNNING, 1996). Nos EUA foi verificada a presença de outras espécies de carrapatos considerados potenciais vetores, a saber: o *Rhipicephalus sanguineus* LATREILLE, está presente na maioria dos estados em maior incidência nos Estados da Flórida e Nova York e o *A. nitens* na Flórida. O *R. sanguineus* pode transmitir por via transovariana *B. caballi* por quatro gerações (MAURER, 1962).

Segundo FRIEDHOFF (1990), com a colonização americana, foram trazidas várias espécies de carrapatos do Velho Mundo, que parasitavam os animais domésticos e que se adaptaram muito bem nas Américas e com o passar dos anos, principalmente devido às contínuas exportações de animais, carrapatos das Américas, também se adaptaram muito bem no Continente Europeu; o que demonstra a capacidade de adaptação dos vetores favorecendo a transmissão de agentes patogênicos em vários continentes.

ZAHLER, RINDER, SCHEIN & GOETHE (2000), descreveram a ocorrência de um pequeno piroplasmídeo, fenotipicamente idêntico a *B. gibsoni*, mas geneticamente mais relacionado à espécie *B. microti*, sugerindo a designação *Theileria annae*, para este parasito.

2.2 Posição Taxonômica

Reino: Protista

Sub-reino: Protozoa (GOLDFUSS, 1818)

Filo: Apicomplexa LEVINE, 1970.

Classe: Sporozoea LEUCKART, 1879.

Subclasse: Piroplasma LEVINE, 1961.

Ordem: Piroplasmida WENYON, 1926.

Família: Theileriidae DU TOIT, 1918; Babesiidae POCHE, 1913

Gênero: *Theileria* BETTENCOURT, FRANÇA & BORGES, 1907; *Babesia* STARCOVICI, 1893.

Espécie: *Theileria equi* (LAVERAN, 1901) MEHLHORN & SCHEIN, 1998; *Babesia caballi* (NUTTALL & STRICKLAND, 1910).

A utilização de aspectos de filogenia para fins taxonômicos, indubitavelmente, traz clarezas e dúvidas com respeito às classificações das inúmeras espécies. Torna-se urgente a adequação dos aspectos: fenotípicos, biológicos e genéticos, a fim de se encontrar o consenso a respeito da sistemática de eucariotes e procariotes, objetivos este que encontrasse celebrado na taxonomia polifásica (UILENBERG et al. 2004).

A discussão sobre a posição da espécie *Theileria equi*, é um assunto que apresenta discordância, no meio científico desde o início do século XX. A discordância reside em fatos referentes a sua biologia, a despeito de diferenças significativas desta espécie com as demais espécies do gênero *Babesia*, tais como: I - O desenvolvimento no hospedeiro vertebrado que, ao contrário das outras espécies, apresenta formas de multiplicação em linfócitos, de acordo com os trabalhos realizados *in vitro* e *in vivo* (SCHEIN et al., 1981; MOLTSMANN et al., 1983); II – *B. equi* (= *T. equi*) apresenta metabolismo distinto, demonstrado pela alta resistência a ação dos compostos babesicidas (MEHLHORN & SCHEIN, 1984); III – A presença de citóstoma e de uma estrutura alimentar tubular em trofozoítos de *B. equi* (= *T. equi*) (SIMPSON et al., 1967; FRERICHS & HOLBROOK, 1969; SIMPSON & NEAL, 1980). Tais aspectos sugerem que a espécie *Babesia equi* está mais próxima ao gênero *Theileria* do que ao gênero *Babesia*. Baseando-se nestes aspectos, e, sobretudo no uso de instrumento da filogenia molecular, MEHLHORN & SCHEIN (1998), propuseram a mudança taxonômica para: *Theileria equi* (LAVERAN, 1901) MEHLHORN & SCHEIN, 1998.

Cabe ressaltar, porém, que outros autores discordam desta grafia, tendo em vista que a *B. equi*, não se apresenta como uma *Theileria* clássica ao nível de filogenia molecular (KJEMTRUP et al., 2000; CRIADO-FORNÉLIO et al. 2003; NAGORE et al., 2004). No entanto existe outra linha de pesquisa que prefere criar uma nova família para *B. equi* (= *T. equi*), que possivelmente se denominaria Nicollidae e seu nome passaria a ser *Nicollia equi*, sendo também futuros integrantes desta família: *B. microti* e *B. rodhaini*. (COX, 1994).

Neste trabalho, adotaremos a terminologia *T. equi*, proposta pelos autores MEHLHORN & SCHEIN (1998). Embora entendamos que os aspectos fenotípicos e de ciclo de vida impulsionam a criação de um novo gênero, até então esta proposta nos parecer mais razoável, em concordância com UILENBERG et al. (2004).

2.3 Vetores das Piroplasmoses Eqüinas no Mundo

ENIGK (1943, 1944) In SOULSBY (1987) revisou as espécies de ixodídeos que são incriminados pela transmissão de *B. equi* (= *T. equi*), a saber: *Dermacentor reticulatus* (Europa), *Hyalomma excavatum* e *H. plumia* (Grécia e Ásia Central), *H. dromedarii* (Norte da África), *Rhipicephalus bursa* e *R. turanicus* (Antiga União das Repúblicas Socialistas Soviética), *R. evertsi* (África do Sul), *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE, 1806) (Ásia Central e África do Norte). O mesmo autor sugere que as espécies *B. equi* (= *T. equi*) e *B. caballi*, são antagônicas e que a *B. equi* (= *T. equi*) apresenta-se mais freqüente, minimizando a ocorrência de *B. caballi*. Trabalhos recentes desenvolvidos na Mongólia por BATTSETSEG *et al.*, (2001) demonstram que ao nível do hospedeiro intermediário *Dermacentor nuttalli*, observou-se através de aspectos biomoleculares a ocorrência de 10 e 12,9% para *B. equi* (= *T. equi*) e *B. caballi*, de ocorrência, nos ixodídeos estudados.

NEITZ (1956a) verificou que alguns vetores de *B. caballi* permanecem com o poder de infectividade por duas gerações, sem se alimentar em animal infectado, enquanto que outros, mantêm a infecção por somente dois estágios sucessivos, do ciclo de vida de uma geração. Para este autor, os vetores de *B. caballi* seriam três espécies do gênero *Dermacentor*: *D. marginalis* (= *D. reticulatus*), *D. pictus* e *D. silvarum*; quatro do gênero *Hyalomma*: *H. volgense*, *H. anatolicum* (= *H. excavatum*), *H. marginatum* e *H. dromedarii*; que fora recém introduzida em nossa plataforma continental (Massard *et al.*, 2001) e duas do gênero *Rhipicephalus*: *R. sanguineus* e *R. bursa*. Os vetores de *B. equi* (= *T. equi*) seriam duas espécies do gênero *Dermacentor*: *D. marginatus* e *D. pictus*, quatro espécies do gênero *Hyalomma*: *H. anatolicum anatolicum*, *H. marginatum detritum*, *H. excavatum* e *H. uralense detritum*, e três espécies do gênero *Rhipicephalus*: *R. bursa*, *R. sanguineus* e *R. evertsi*. *B. equi* (= *T. equi*) é transmitida predominantemente pela via transtestadial, exceto a espécie *H. anatolicum anatolicum*, que faz transmissão transovariana. (NEITZ, 1956b).

ERSHOV (1956) In: SOULSBY (1987) sugeriu a existência de antagonismo quanto a ocorrência no hospedeiro vertebrado, entre as duas babesias, que as infecções por *B. equi* (= *T. equi*) são mais freqüentes do que as produzidas por *B. caballi*.

O vetor de *B. equi* (= *T. equi*), ainda é desconhecido na França, suspeitando-se ser o *Rhipicephalus bursa* (MOREL, 1981).

No Marrocos, *B. equi* (= *T. equi*) foi isolada de carrapatos adultos naturalmente infectados da espécie *H. marginatum* (MOLTMANN *et al.*, 1983).

Dentre as espécies que acometem eqüídeos de modo geral, as principais são: *Anocentor nitens* e *Amblyomma cajennense*, porém demonstraram-se incapazes de transmitir a espécie *B. equi* (= *T. equi*) experimentalmente (STILLER & COAN, 1995).

Trabalhos recentes reportam a transmissão experimental de *B. equi* (= *T. equi*) por *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) que demonstraram através da microscopia eletrônica de transmissão, que *B. equi* (= *T. equi*) é capaz de se multiplicar em glândulas salivares de *B. microplus* na fase adulta, demonstrando a capacidade de transmissão biológica transmissão transtestadial desse hemoparasito. Este fato sugere que o *B. microplus* possivelmente possa ser um transmissor natural da *B. equi* (= *T. equi*), esta espécie possa se tratar do provável vetor onde se observa que não existe nenhuma outra espécie de vetor possível, concomitantemente, constitua a única espécie ou a espécie predominante encontrada em eqüídeos (CUNHA, 1993; GUIMARÃES *et al.*, 1998ab), justificando sua presença em partes da América Latina, dentre as quais o Brasil.

2.4 Sinais Clínicos e Patologia Clínica das Piroplasmoses Eqüinas

Os parasitos *Babesia equi* e *B. caballi* são agentes etiológicos distintos, que se diferem morfolologicamente, biologicamente, pelo modo de transmissão nos vetores e no período de

incubação das enfermidades por elas causadas, que variam de 10 a 30 dias para *B. caballi* (DE WAAL, 1990) e 12 a 19 dias para *B. equi* (= *T. equi*) (DE WAAL, 1992).

A piroplasmose clínica ocorre principalmente em duas circunstâncias: a primeira quando movimento de cavalos susceptíveis para áreas endêmicas, a segunda quando cavalos portadores são movidos para áreas não endêmicas, mas que contêm vetores, capazes de transmitir as espécies de *Babesia* a cavalos susceptíveis (KNOWLES, 1988).

A severidade das infecções por *B. equi* (= *T. equi*) e *B. caballi* está intimamente ligada ao número de parasitos que induzem a primo-infecção e das taxa de reprodução da amostra dos parasitos envolvidos. Observou-se que existem diferenças notórias, no que tange a apresentação geral da infecção grave por *B. caballi* em comparação com a *B. equi* (= *T. equi*) (MASSARD, 1993).

Em geral as infecções graves de *B. caballi* resultam em disfunções de diversos órgãos devido às aglomerações dos parasitos desta espécie nos capilares viscerais, resultando em fragilidade capilar com rompimento e escape de eritrócitos (hemorragias). No fígado observa-se atrofia e degeneração da veia centrolobular e necrose. Nos casos agudos de infecção por *B. caballi*, os sintomas são freqüentemente caracterizados por: inapetência, febre com temperatura acima de 40°C, mucosas congestas, taquicardia e taquipnéia. A infecção por *B. equi* (= *T. equi*), resulta principalmente na destruição de eritrócitos, devido à intensa multiplicação intraeritrocitária sobrevivendo à morte por anemia (HOLBROOK, 1969).

Nos casos agudos de infecções por *B. equi* (= *T. equi*), o sintoma característico é a febre, muitas vezes de natureza intermitente, com temperatura variando de 39,5° a 42,3°C (TAYLOR *et al.*, 1969) em casos mais graves, pode ocorrer hemoglobinúria (SIPPEL *et al.*, 1962; RETIEF, 1964; RUDOLPH *et al.*, 1975). É comum observar-se mucosas pálidas ou ictericas, com petéquias, equimoses e edemas de membros. Há casos em que sintomas digestivos podem estar associados, tais como: cólica, constipação, fezes mucoídes freqüentemente seguidas de diarréia ou fezes ressecadas, principalmente em casos de infecção por *B. equi* (= *T. equi*) (LITTLEJOHN, 1963 *In*: BONE *et al.*, 1963).

As enfermidades causadas por *B. equi* (= *T. equi*) ou *B. caballi*, apresentam algumas sintomas semelhantes, que podem ocorrer em maior ou menor grau de intensidade, dependendo do parasitismo e da resistência individual do hospedeiro (SOULE *et al.* 1984), vale ressaltar, que eqüinos adultos, importados de áreas indenes e introduzidos em regiões endêmicas, são consideravelmente mais susceptíveis ao desenvolvimento de um quadro mais severo da doença (SIPPEL *et al.*, 1962). Estudos recentes desenvolvidos por MUJICA *et al.* (2002), no Estado do Rio de Janeiro-Brasil, demonstrou um quadro clínico de infecção aguda, por *B. caballi*, em eqüino sensível destacando a presença de anemia, icterícia, balanopostite e fezes com secreção do tipo mucoíde.

Em infecções agudas por *B. equi* (= *T. equi*), o hemograma demonstra na série vermelha, anemia do tipo microcítica hipocrômica ou anemia normocítica normocrômica (SCHEIN, 1988). Em 53 casos agudos a campo no Chile, observou-se anemia normocítica normocrômica (RUDOLPH, 1971). Na série branca geralmente se encontra neutropenia, linfopenia, eosinopenia e aumento significativo do número de monócitos (RUDOLPH *et al.*, 1975), além de decréscimo do fibrinogênio e elevadas concentrações de bilirrubina plasmática (RISTIC, 1985).

Embora, em outras localidades, autores citaram que os casos clínicos de *B. caballi* são clinicamente inaparentes e raramente responsáveis por anemias severas entre outros sintomas (DE WAAL, 1992).

A parasitemia, raramente excede a 1% em infecções por *B. caballi* e geralmente em infecções por *B. equi* (= *T. equi*) se encontram na faixa de 1 a 7%, mas em alguns casos podem chegar a 80% (FRIEDHOFF *et al.*, 1990).

Os animais portadores crônicos, principalmente de *B. equi* (= *T. equi*), são os que causam maior preocupação e prejuízos.

2.5 Epidemiologia das Piroplasmoses Eqüinas no Mundo

2.5.1 Epidemiologia nos continentes asiático, africano e europeu

As espécies que provocam as piroplasmoses eqüinas são de ampla distribuição mundial, sendo consideradas limitantes quanto a pecuária eqüina bem como no desenvolvimento genético de raças nativas. Podemos listar dentre os países nos diferentes continentes (Asiático, Europeu e Africano), em cujos plantéis eqüinos, são acometidos por estes agentes etiológicos, conforme listado na Tabela 1.

Tabela 1: Distribuição, utilizando ferramentas de diagnósticos sorológicos, nos continentes Asiáticos, Europeu e Africano das espécies de *Theileria equi* e *Babesia caballi*.

Autor	País	Método de Diagnóstico	<i>T.equi</i> %	<i>B.caballi</i> %	Ambas %
DONNELLY et al. (1980)	Kuwait	RIFI	77,1	11,4	---
CAMACHO et al. (2005)	Espanha	RIFI	40	28	20
XUAN et al. (2002)	China (Xinjianj)	Elisa Recombinante	40	24,3	15,7
BOLDBAATAR et al. (2005)	Mongolia	Elisa	72,8	40,1	30,7
XU et al. (2003)	China (Jilin)	Elisa	34	32	12
IKADAI et al. (2002)	Japão	Elisa	2,2	5,4	---
RHALEM (2001)	Marrocos	Elisa			
SHKAP et al. (1998)	Israel	RIFI e Elisa Competitivo	95,7	---	---
AVARZED et al. (1997)	Mongolia	RIFI	88,2	84,5	---
GUMMOW et al. (1996)	Províncias do Sul da África	RIFI	61	40	---
BOCH (1985)	Alemanha	RIFI	5,6	1,25	
DONNELLY et al. (1980)	Oman	RIFI e TFC	75 (TFC) e 97,7 (RIFI)	40,9 (TFC) e 40,9 (RIFI)	---
MALHOTRA et al. (1978)	Índia (Rajasthan)	TCA	96,4	---	---
POTGIETER et al. (1992)	África do Sul	RIFI	70,6	37	
TENTER et al. (1986)	Sudão	TFC e RIFI	68,1(TFC) e 94,5(RIFI)	---	---

2.5.2 Epidemiologia nas Américas do norte e central

Com o advento da padronização do TFC, atenuaram-se as eventuais discordâncias de dados no “National Veterinary Service Laboratories” (USDA) entre os anos de 1986-1990 que revelaram: em 65.911 soros de eqüinos de várias raças que passaram pelas estações de quarentena, e de 67.517 soros testados para infecção por *B. equi* (= *T. equi*), 5.246 (7,8%) foram soropositivos (ZAUGG & LANE, 1992).

Observa-se um quadro díspar do anterior quando se trata da América central. Nestes animais, cerca de 1/3 do plantel destinado às importações para os EUA, eram soropositivos para uma ou ambas as babesias. Em Porto Rico, 89% dos cavalos examinados eram soropositivos para *B. caballi* e 25% para *B. equi* (= *T. equi*) (HOLBROOK *et al.*, 1969).

2.5.3 Epidemiologia na América do Sul

No Chile e na Argentina no período de 1970 a 1972, cavalos de corrida e de salto foram vendidos para os EUA, sendo rejeitados na estação de quarentena de Miami e devolvidos aos países de origem, à custa de seus proprietários. Este fato causou grande impacto no comércio internacional de cavalos, por serem os animais portadores assintomáticos de *Babesia sp.* Inquéritos epidemiológicos posteriores, demonstraram que havia animais portadores assintomáticos nesses países sul-americanos. A espécie de carrapato mais encontrada parasitando cavalos no Chile foi o *Otobius megnini* (DUGÉS, 1883 *Apud* PEREIRA, 1999), mas não foi comprovado ser esta espécie a veiculadora de *Babesia sp.* aos eqüinos chilenos (RUDOLPH, 1971).

Exames sorológicos em haras de criação e "studs" na Província de Santiago no Chile revelaram que de um total de 24 haras, foram selecionados 18 correspondentes àqueles que tinham mais 10 animais por plantel. A população foi de 912 animais, dos quais 605 eram adultos (com seis a 19 anos) e 307 eram potros (com menos de um ano). Por limitação quantitativa de antígeno para o teste TFC, foram escolhidos 118 adultos e 62 potros, num total de 180 animais, que correspondem a 20% da população. 30% dos cavalos adultos e 22,6% dos potros mostraram a variação de decréscimo de títulos de anticorpos ao TFC, contra os antígenos de *B. equi* (= *T. equi*) e *B. caballi* no decorrer da idade. Num total de 50 animais, 96% foram soropositivos para *B. equi* (= *T. equi*), 2% para *B. caballi* e 2% para ambas. Dos 18 haras, 14 (77,8%) apresentou animais soropositivos para as duas espécies, tanto em adultos quanto em potros; concluindo que a enfermidade se encontra em áreas de cavalos PSI, com nível similar aos hipódromos da Província de Santiago, fato relacionado ao intercâmbio entre haras e hipódromos. Foi também observado que *B. equi* (= *T. equi*), não foi considerada tão patogênica nesta região, como quanto já foi relatada em outros países, onde causa enfermidade e alta mortalidade (URCELAY *et al.*, 1973).

Um estudo da prevalência da piroplasmose em eqüinos da raça Criolla, da província de Córdoba na Colômbia, mostrou que de 82 soros de eqüinos pertencentes a 13 fazendas, situadas na região nordeste da Colômbia, testados pelo TFC e pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), ambas as *Babesia* foram encontradas em todas as fazendas. O TFC detectou anticorpos para *B. caballi* em 41% e para *B. equi* (= *T. equi*) em 65% animais. A RIFI indicou a prevalência de 90% para *B. caballi* e 94% para *B. equi* (= *T. equi*) prevalência de animais soros-reagentes em diferentes grupos de idade, revelou um significativo declínio, de anticorpos para *B. caballi* ao TFC em animais acima de três anos de idade. Os títulos do TFC para ambas as babesias declinaram gradualmente com o aumento da idade dos animais para *B. caballi*, mas ainda presente em animais com idade superior a nove anos para *B. equi* (= *T. equi*). Os carrapatos encontrados foram: *Anocentor nitens*, em todas as fazendas e *Amblyomma cajennense* em apenas duas fazendas (TENTER *et al.*, 1988).

2.5.4 Epidemiologia no Brasil

No Brasil, a piroplasmose equina por *Nuttallia equi* (= *T. equi*) foi descrita pela primeira vez por CARINI (1910) através do diagnóstico clínico e laboratorial em cavalos no Estado de São Paulo. Esta mesma espécie foi novamente reportada em animais de corrida com quadro agudo de piroplasmose no mesmo estado (GUIMARÃES et al., 1950). DUPONT & BARREIROS TERRA (1952) formulam um histórico a respeito da patologia citando a ocorrência no Estado do Rio de Janeiro, através do uso da microscopia óptica.

As babesioses são relativamente freqüentes, sendo a maioria quase sempre causada pela *B. equi* (= *T. equi*) (HIPÓLITO et al., 1965; BARBOSA et al., 1993, 1995; LINHARES, 1994; BITTENCOURT et al., 1997).

TENTER & FRIEDHOFF (1986), analisando soros provenientes do Rio de Janeiro e Espírito Santo, encontraram prevalência de 72% para portadores de infecção por *B. equi* (= *T. equi*) e 64% para *B. caballi* em 20 amostras examinadas pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).

RIBEIRO & LIMA (1989) em Minas Gerais, observaram uma prevalência de 72% para portadores de infecção por *B. equi* (= *T. equi*), examinados através da RIFI.

No Estado do Rio Grande do Sul, CUNHA (1993) observou a prevalência de Infecção por *B. equi* (= *T. equi*) de 57,9%, pela RIFI, na avaliação realizada em 133 animais do Jockey Club de Pelotas e dois haras na zona sul do Rio Grande do Sul, e verificou a presença de *B. microplus* parasitando cavalos.

LINHARES (1994), no centro-oeste, na microrregião de Goiânia, registrou prevalências de 94,7% para *B. equi* (= *T. equi*) e 90,8% para *B. caballi*, utilizando-se a RIFI, caracterizando área como de estabilidade enzoótica e trabalhou com eqüinos criados em regime extensivo e semi-intensivo.

PFEIFER BARBOSA (1993, 1995) verificou elevada prevalência de babesioses, no setor de eqüinocultura da Fazenda do Instituto de Zootecnia (FAIZ), da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), observando que a soropositividade ao TFC em 60 eqüinos, era de 96,7% para *B. equi* (= *T. equi*) e 61,7% para *B. caballi*, em diagnóstico realizado no Laboratório do Instituto de Parasitologia da Universidade de Hannover, Alemanha.

No Brasil a prevalência de babesiose, bastante distinta nas diferentes regiões do país, como por exemplo: estudos realizados no Rio de Janeiro e em Minas Gerais demonstraram que 85% a 100% dos eqüinos examinados pelo TFC, são portadores de *Babesia* sp.; enquanto que no Rio Grande do Sul, o percentual de soropositivos fica em torno de 30 a 50% (ANPC, 1996).

BOTTEON (2002) observou que em 121 amostras em regime extensivo, semi-intensivo, os 27 animais criados em regime de estabulação permanente, apresentavam títulos menores ao RIFI (mais freqüente 1:40), sendo que estes animais apresentavam maior susceptibilidade à enfermidade, devido à Instabilidade enzoótica a que estavam expostos. A pesquisa foi realizada nos municípios de Seropédica, Japeri, Paracambi, Miguel Pereira, Nova Iguaçu, Itaguaí e Rio de Janeiro.

"Aspectos Epidemiológicos da babesiose equina na Microrregião Fluminense do Grande Rio - Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro" foi o tema do trabalho de BITTENCOURT et al. (1997), em que 78 eqüinos, criados em regime extensivo (FAIZ-UFRRJ) e propriedades vizinhas, na Região Fluminense de Itaguaí, RJ, foram testados pelo TFC (Universidade de Hannover), no período de abril a agosto de 1985. A maioria era portadora de anticorpos circulantes anti-*B. equi* (= *T. equi*) (84,6%) e anti-*B. caballi* (93,6%), o que caracterizou ser uma área fortemente enzoótica e potencialmente de risco para animais procedentes de áreas livres de carrapatos, vetores biológicos da enfermidade.

No Brasil, a piroplasmose, considerada como uma endemia, especialmente, nos rebanhos criados soltos a campo. Segundo a experiência do Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias Paddock, Jockey Club de São Paulo (referência para o diagnóstico de piroplasmose Equina), 90% dos animais são soropositivos para as babesioses, nas regiões, centro-oeste e sudeste. Em estudos realizados por (KERBER, 1997) com 720 eqüinos de várias raças originárias de 28 fazendas de diferentes regiões do país: Mato Grosso, São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Rio Grande do Sul, demonstrou a existência de *B. equi* (= *T. equi*) e *B. caballi*, em todas as regiões diagnosticadas pelo TFC e presença das espécies de carrapatos: *A. nitens*, *A. cajennense* e *B. microplus*, parasitando os cavalos. Foram observadas baixas prevalências de *B. caballi* e *B. equi* (= *T. equi*) em áreas subtropicais, provavelmente isto ocorra, por um maior desenvolvimento de várias espécies de carrapatos em regiões tropicais. O controle de carrapato indicado neste trabalho, o "spray", contendo deltametrina (piretróide), à diluição de 25 mg/l a cada três semanas, durante um ano, em áreas tropicais, tentando com isto reduzir a infestação no pasto. Em áreas subtropicais, é suficiente utilizar o produto a cada três semanas, nas estações de primavera e verão. Os assuntos acima mencionados foi tema de trabalho apresentando no Congresso da Associação Mundial de Veterinária Equina, realizado em Padova, na Itália. Em fazendas onde há associação de eqüinocultura com bovinocultura, e não há controle de carrapatos, foi encontrada alta prevalência, especialmente de infecções por *B. equi* (= *T. equi*) (KERBER, 1997, SIQUEIRA, 1997).

DA COSTA PEREIRA et al. (2004) descreveu que a ocorrência de *B. equi* (= *T. equi*), a qual teve oportunidade de avaliar, era superior a *B. caballi* em todas as situações. Também notou que as condições de criação e os métodos ineficazes no controle de vetores são fatores predisponentes à ocorrência da infecção pelos agentes causadores de babesiose equina em estabelecimentos que possuam portadores ditos assintomáticos.

Estudos Desenvolvidos na mesorregião da Baixada Litorânea Fluminense, com avaliação de 49 animais oriundos do Curral de apreensão da Universidade Federal Fluminense, indicou que aquela Mesorregião é de estabilidade enzoótica para espécie *T. equi*, com prevalência de 100%, nas amostras analisada na RIFI (SILVA, 2002).

2.6 Piroplasmoses Canina no Mundo

2.6.1 *Babesia canis* (PIANA & GALLI-VALÉRIO 1895)

Após a descrição de *B. canis* por PIANA & GALLI-VALÉRIO (1895), foi seguida, por estudos posteriores, de distribuição e também da possibilidade da existência de parasitos relacionados a membros da ordem carnívora. Até 1938, era amplamente aceito que esta espécie só acometia *Canis familiaris*, quando SCHOOP & DIDIE (1938), foram bem sucedidos na infecção experimental em *Vulpes vulpes* (raposa) na Alemanha. Posteriormente, NEITZ & STEYN (1947), transmitiram para *Canis mesomelas mesomelas* (Chacal de dorso preto) esplenectomizado e não esplenectomizado e mostraram que havia provas suficientes para afirmar que *B. canis* além de não ser específico de *Canis familiaris*, era sinônimo de *Babesia rossi* descrito por NUTTALL (1910) em *Canis adustus* (Chacal de flanco listrado), conforme Tabela 2.

Atualmente, são reconhecidos três subespécies de *B. canis*, com seus correspondentes vetores: *B. canis canis*, encontrada na Europa, sendo o vetor a espécie *Dermacentor reticulatus*; *B. canis vogeli* encontrada no Norte Africano; na América do Norte tendo como principal vetor o ixodídeo *Rhipicephalus sanguineus*; *B. canis rossi* encontrada na África do Sul, tendo como vetor a espécie *Haemaphysalis leachi* (UILENBERG et al. 1989; TABOADA & MERCHANT, 1991; SCHETTERS et al., 1997; LOBETTI, 1998; CARRET et al., 1999).

Hospedeiro		Parasito	Distribuição	Autores das Citações
<i>Espécies</i>	Nome vulgar	<i>Babesia canis</i> (Microscopia óptica).		
<i>Canis Familiaris</i>	Cão	Presente	Cosmopolita	PIANA & GALLI-VALÉRIO (1895) e muitos outros autores
<i>C. adustus</i> (<i>Thos adustus</i>)	Chacal flanco listrado	Presente	Oeste africano	NUTTALL (1910); NEITZ & STEYN (1947)
<i>C. vulpes</i>	Raposa vermelha	Presente	Alemanha	SCHOOP & DEDIÉ (1938)
<i>T. mesonelas</i>	Chacal de dorso preto	Presente	África do Sul	NEITZ & STEYN (1947)
<i>C. latraus</i>	Coio	Presente	Estados Unidos da América	EWING et al. (1965)
<i>C. lupaster</i>	Lobo	Presente	Argélia	GAYOT (1946)
<i>C. lupus</i>	Lobo	Presente	Rússia	YAKIMOFF & SCHOKHOV (1917)
<i>Cerdocyon thous</i>	Cachorro do mato	Presente	Brasil	MASSARD et al. (1975).
<i>Lycaon Pictus</i>	Cão caçador do Cabo	Presente	África do Sul	NEITZ (1965).

Tabela 2*: Distribuição geográfica da espécie *Babesia canis* em canídeos silvestres.

*MASSARD et al., (2006) dados não publicados.

Apesar de ambas as espécies apresentarem-se ao nível de aspecto fenotípico idênticas, suas patogenias são diferentes, bem como seu caráter antigênico, sendo a espécie *B. canis rossi*, a mais patogênica dentre elas, por apresentar uma capacidade de multiplicação acentuadamente superior as outras, induzindo doença fulminante entre os cães na África do Sul (SCHETTERS et al, 1997).

No Brasil, trabalhos para elucidar qual a subespécie ou a ocorrência das mesmas na população canina têm atualmente gerado publicações acerca de caracterização e transmissão. Recentemente, PASSOS et al. (2005) caracterizaram genotipicamente a ocorrência de *Babesia vogeli*, em cães naturalmente infectados provenientes dos Estados de Minas Gerais e São Paulo. SÁ (2005) identificou este subespécie como sendo a que acomete os cães no Estado do Rio de Janeiro.

Estudos desenvolvidos no Brasil, incriminam a espécie *R. sanguineus* como a responsável pela transmissão tanto em nível cidade como ao nível rural (O'DWYER, 2000). Esta espécie tem hábitos nidícolas, em sua fase de vida livre, podendo ser encontrada dentro de canis, no interior das residências e nos quintais das casas, escondendo-se em frestas e buscando abrigo em buracos das próprias instalações (LABRUNA & PEREIRA, 2000).

Com relação à sintomatologia e respeitando as diferenças quanto à progressão clínica de cada subespécie temos: febre, anorexia, apatia, vômito, icterícia, esplenomegalia e hiperplasia de linfonodos, hemoglobinúria. Na patologia clínica, caracteriza-se por anemia hemolítica, inicialmente normocítica normocrômica, evoluindo para macrocítica hipocrômica e regenerativa, sendo observado não raramente, reticulocitose, anisocitose e policromasia, nota-se em alguns casos a presença de trombocitopenia, hemoglobinemia e bilirrubinemia (FELDMAN et al., 1982; LOBETTI et al., 1996).

2.6.2 *Babesia gibsoni* (PATTON, 1910)

Esta espécie foi descrita originalmente em *Canis familiaris* na Índia, sendo classificada entre os pequenos *Piroplasma* spp., devido seu tamanho diminuto (1 – 2µm). Na ocasião da descrição da espécie, PATTON (1910). Este autor também determinou que as raças autóctones da Índia, bem como a espécie *Canis aureus* (chacal dourado) podendo atuar como reservatório.

Trata-se de um piroplasmídeo que acomete tanto canídeos domésticos como silvestres. Sua sintomatologia apresenta-se da seguinte forma: febre, anemia marcada com icterícia e hemoglobinúria, inapetência, prostração, esplenomegalia, progredindo para o êxito letal (LEVINE, 1985; BOOZER & MACINTIRE, 2003). É uma patologia que acomete tanto animais jovens quanto adultos; na fase jovem os animais desenvolvam quadro mais severo em comparação aos adultos, quando esse agente patogênico é transmitido por carrapatos (BOSE et al. 1995; DE WAAL, 2000; MUHLNICKEL et al. 2002). A infecção por *B. gibsoni* é endêmica em muitas partes da Ásia, Austrália, África, Oriente Médio e América do Norte (BIRKENHEUER et al. 2003 b; BOOZER & MACINTIRE, 2003), existindo relato da sua ocorrência também no Brasil (BRACCINI et al., 1992). A sua ampla distribuição mundial pode ser atribuída principalmente à facilidade de mobilidade dos cães e a presença de vários vetores ixodídeos em potencial. A eliminação desta parasitose é dificultada pelo amplo número de espécies de ixodídeo com potencial vetor biológico para *B. gibsoni*, como também pelo fato desses ixodídeos realizarem repasto sanguíneo em um amplo grupo de mamíferos (SHAW et al., 2001; CACCIO et al. 2002).

Diversas espécies de ixodídeos estão envolvidas em sua transmissão, tais como: *Haemaphysalis bispinosa*, sendo a primeira observada na ocasião da descrição da espécie por

PATTON (1910); *Haemaphysalis longicornis* (HIGUCHI et al., 1991), *R. sanguineus* (HIGUCHI et al., 1999).

Com o advento das ferramentas moleculares, muitas ocorrências que, baseando-se somente no aspecto fenotípico, eram imputadas a *B. gibsoni*, têm sido reavaliadas e reescritas. Neste sentido, recentes avanços são observados também quanto à presença e identificação de pequenos piroplasmídeos de cães. KJEMTRUP et al. (2000), descreveram a ocorrência de três genogrupos distintos de pequenas babesias em cães. Outros relatos neste sentido têm surgido na literatura, como por exemplo, na Alemanha (ZÄHLER et al., 2000) e na Espanha (CAMACHO et al., 2001).

Hospedeiro		Parasito	Distribuição	Autores das Citações
<i>Espécies</i>	Nome vulgar	<i>Babesia gibsoni</i> (Microscopia óptica).		
<i>Canis Familiaris</i>	Cão	Presente	Índia, Europa, Estados Unidos da América, Brasil.	PATTON, 1910; e muitos outros autores
<i>C. aureus</i>	Chacal dourado	Presente	Índia	PATTON, 1910
<i>C. lupus</i>	Lobo	Presente	Rússia	YAKIMOFF & SCHOKHOV, 1917
<i>Cyon duklunensis</i>	Cão selvagem da Índia	Presente	Índia	PLIMMER, 1915.
<i>Vulpes dorsalis</i>	Raposa	Presente	Mali & Egito	LÉGER & BEDIES, 1922; MARONPOT & GUINDY, 1970

Tabela 3*: Distribuição geográfica da espécie *Babesia gibsoni* em canídeos silvestres:

*MASSARD et al. (2006), dados não publicados.

2.6.3 *Rangelia vitalii* (PESTANA, 1910)

O estudo desta parasitose iniciou-se em 1908, quando CARINI observou uma doença de cães no Brasil, com sintomatologia hemorrágica, conhecida como “Nambyuvú” (orelha que sangra – idioma Guarani) levantou a suspeita de tratar-se de uma piroplasmose pela semelhança apresentada com a icterícia maligna dos cães, provocada pela *B. canis*.

PESTANA (1910), em nota preliminar comunicada à Sociedade Científica de São Paulo, que relacionou o fato de haver encontrado um piroplasma no sangue de cães com a doença conhecida vulgarmente como “Nambyuvú” ou peste de sangue. Estudou a doença espontânea e através de inoculações experimentais, reproduziu a infecção em cães jovens. Posteriormente, ainda em 1910, PESTANA em trabalho mais apurado identificou o agente etiológico desta doença, denominando-se *Piroplasma vitalii*, em homenagem ao eminente Diretor do Instituto Butantan, Dr. VITAL BRAZIL. Tal parasito diferia da espécie *B. canis*, baseando-se em aspectos morfológicos e biológicos, além da sintomatologia e achados macroscópicos.

Segundo PESTANA (1910) esta parasitose apresenta-se em três formas clínicas características, a saber: I – Benigna: febre intermitente, com a presença no sangue circulante de formas intraeritrocitárias; II – Hemorrágica: o animal desenvolve apatia, anorexia e emaciação. Observa-se a hiperplasia de linfonodos e a febre torna-se constante, com mucosas evoluindo de pálidas a icterícias (que também se acentuam no tegumento), fraqueza muscular, com dificuldade de deambulação e com respiração ofegante. As hemorragias manifestam-se externamente na boca, nariz, olhos, pele e nas bordas das orelhas, sintoma patognômico que dá o nome à doença entre os populares; III – Grave: presença de desenvolvimento rápido, não havendo tempo para o desenvolvimento de hemorragias externas, havendo, porém, hemorragias internas, sobretudo as enterorragias. Talvez por isso designada, pelos caçadores como “Nambyuvú das tripas”.

CARINI & MACIEL (1914) re-avaliando a doença, observaram aspectos relacionados com a patogenia e lesões patológicas, confirmando os resultados de Pestana e propuseram a criação de um novo gênero que denominaram *Rangelia*, homenageando o Dr. RANGEL PESTANA que estudou e descreveu minuciosamente esta espécie. Baseou-se principalmente na presença de esquizogonia exo-eritrocítica em células endoteliais que foram descritas detalhadamente. Ensaíram ainda (1914) os primeiros testes no sentido do tratamento com “Tripan Blue”, com resultados animadores para época.

CARINI (1916) no idioma alemão publicou praticamente o mesmo trabalho que já havia sido publicado em 1914 juntamente com Maciel. Este trabalho foi apenas enriquecido com novas ilustrações sobre aspectos da morfologia do parasito.

MOREIRA (1938), em desacordo com os autores anteriores, não encontrou diferenças no quadro sintomatológico entre nambyuvú e a clássica babesiose canina, causada pela *Babesia canis* e admitiu de acordo com WENYON (1926) a possibilidade de infecção mista intercorrente de *Toxoplasma gondii* e *B. canis* para as formas de esquizogonia descritas por PESTANA (1910) e CARINI & MACIEL (1914).

MOREIRA (1939) testou a eficiência de “Tripan Blue” e da acaprina no tratamento da babesiose canina, utilizando grande número de animais.

CARINI (1948) novamente publicou sobre o assunto, confirmando a existência das formas de *Rangelia* encontradas nos tecidos (esquizontes) e refutando a possibilidade de tratar-se de *Toxoplasma* ou *Hepatozoon*. Discute apresentando com maiores detalhes a multiplicação do parasito nas células retículo-endoteliais. Neste trabalho cita o fato de BRUMPT acreditar serem válidos seus achados, tendo inclusive incluído o novo gênero em seu livro publicado em 1936.

PARAENSE (1949) sugeriu a possibilidade da existência de uma fase negativa no sangue no período prepatente da babesiose canina transmitida por carrapatos, contudo sem encontrar quaisquer formas de desenvolvimento exo-eritrocítico, neste mesmo trabalho, o autor tentou também reproduzir a doença no sentido de verificar os estágios de esquizogonia sem alcançar êxito.

REZENDE (1976) descreveu a ocorrência desta parasitose em cães provenientes de áreas rurais no Rio de Janeiro com proposta de revalidação do grupo *Rangelia*, relatando a ocorrência de baixa parasitemia e de infestação dos ixodídeos: *Amblyomma aureolatum*, *A. cajennense*, *A. ovale*, *A. tigrinum* e *R. sanguineus* em *C. familiaris* provenientes destas áreas. MASSARD (1979) citou que neste tipo de nicho ecológico, nota-se a maior prevalência da espécie *A. aureolatum*, infestando *C. familiaris*. Posteriormente, observou-se a relação destes ixodídeos com a presença da espécie *Hepatozoon canis* em áreas rurais (O'DWYER et al., 2001), embora a caracterização do esporocisto deu-se na espécie *A. ovale* (FORLANO et al., 2005).

Recentemente, LORETTI & BARROS (2005) em uma revisão desta parasitose na Região Sul do Brasil, sobretudo Rio Grande do Sul, citam que neste estado, os cães de áreas rurais que apresentam manifestações clínicas compatíveis com a infecção por *Rangelia vitalii*, estão predominantemente infestados com o carrapato *A. aureolatum*.

2.6.4 *Theileria annae* ZAHLER, RINDER, SCHEIN & GOTHE, 2000

Recentemente, ZAHLER et al. (2000) descreveram a ocorrência de um pequeno babesídeo, isolado de um cão procedente da Alemanha que adquiriu a infecção em sua estada na região dos Pirineus, na Espanha em 1994. Na ocasião utilizou-se a porção 18S rRNA para amplificação e notou-se que o agente em questão tinha 89,5% de similaridade com a *B. gibsoni* asiática; 86,6% de identidade com a *B. canis* e uma acentuada similaridade com parasito de outra espécie animal, apresentando alto grau de relação filogenética com a espécie *B. microti* (96,7%), porém distante o suficiente para a sugestão da criação da espécie, a qual foi sugerida como *Theileria annae*.

Durante o ano 1996 foi observada a presença, no exame de esfregaços sanguíneos de 157 *C. familiaris* procedentes do Norte da Espanha, pequeno piroplasmídeo, anelado. Nenhum deles havia estado em áreas endêmicas para *B. gibsoni*, até então o único pequeno piroplasmídeo atribuído à espécie *C. familiaris*. A hematologia e a bioquímica sérica mostrou que quase todos os espécimes tinham uma intensa anemia hemolítica regenerativa e que em alguns casos havia evidências de insuficiência renal. O estudo molecular foi procedido em amostras obtidas em junho de 2000. A análise filogenética mostrou 99% com a *B. microti* e 100% de identidade com o novo piroplasmídeo recém descrito (ZAHLER et al., 2000), que provisoriamente foi denominado *T. annae*, sugerindo tratar-se o Norte da Espanha de uma área endêmica para este piroplasmídeo (CAMACHO et al., 2001). Mais tarde, estudos desenvolvidos por CAMACHO et al. (2003) sugerem que exista a associação da transmissão desta parasitose com o ixodídeo *Ixodes hexagonus*.

2.6.5 *Theileria equi* (LAVERAN, 1901) MEHLHORN & SCHEIN, 1998

As observações morfológicas por si só, não são suficientemente convincentes quanto à distinção entre os babesídeos (ZÄHLER et al, 2000). A existência do acentuado pleomorfismo da *B. gibsoni* esta intimamente correlacionada com a *B. equi* (= *T. equi*), em contrapartida a distinção entre esta espécie e a *B. microti* é impossível, adotando métodos fenotípicos (PURNELL, 1981; KJEMTRUP et al., 2000).

O advento de métodos diagnósticos que elucidem a identificação, sobretudo de pequenos piroplasmídeos, tornou-se urgente e relevante. Segundo UILENBERG et al. (2004) e MASSARD (comunicação pessoal, 2006), o aspecto fenotípico, isoladamente, não proporciona subsídios suficientes para identificação de uma espécie, embora o uso do aspecto genotípico por si só não proporciona, em definitivo, as identificações específicas, surgindo à necessidade da formulação de um consenso ente estes aspectos, bem como o aspecto biológico das espécies em questão. CRIADO-FORNÉLIO et al. (2003a), citaram que muitas vezes direcionam-se as ferramentas diagnósticas disponíveis para a identificação de espécies clinicamente relevantes, desconsiderando a ocorrência de quadros incomuns de relação parasito-hospedeiro. Utilizando-se a metodologia de abordagem diagnóstica molecular, CRIADO-FORNÉLIO et al. (2003b) demonstraram com o uso de iniciadores universais e a técnica de sequenciamento, a presença de infecções mistas e isoladas de *T. annae* e *B. canis* em *Felix catus*, provenientes de Portugal e Espanha.

Recentemente, CRIADO-FORNÉLIO et al. (2003a) demonstraram, utilizando a abordagem molecular, a presença incomum da espécie *B. equi* (= *T. equi*) em *C. familiaris*. A presença desta relação parece estar amplamente distribuída em diversas províncias espanholas (Madrid, Sevilla e Alicante), e está intimamente correlacionada ao habitat rural. Vale ressaltar que, a ocorrência em cães assintomáticos denota baixo grau de patogenicidade deste parasito neste hospedeiro. A presença do sequenciamento de amostras provenientes de diversas espécies, a principio, levou os autores a suspeitar de má-manipulação das amostras, porém tal questionamento foi suprimido com o uso de iniciadores específicos para *C. familiaris* (CAN-F e CAN-R / amplificam produto do gen mitosina canina com 290 pares de base). E a presença de infecções cruzadas em ambas as espécies, *B. equi* (= *T. equi*) em *C. familiaris* e *B. canis* em *E. caballus*, não é algo improvável, tendo em vista a estreita relação existente entre estas espécies, principalmente no que tange o nicho ecológico rural.

2.7 Diagnóstico

Com o advento da microscopia óptica, muitas parasitoses que até então não havia sido diagnosticadas as suas etiologias, seja causada por um agente etiológico potencial ou mesmo metabólica, como as que ocorrem em inúmeras enfermidades. Esta ferramenta é utilizada desde então em inúmeras áreas do conhecimento dentre as quais a parasitologia *Lato sensu*, e em diversas espécies de microrganismos, pode citar como exemplos: as piroplasmoses, as tripanosomatíases, as malárias, as espiroquetoses entre outros.

Certamente, a observação a “olhos armados” é bastante conclusiva, porém nem sempre isto é possível de ser feito, sendo especialmente verdade nos casos crônicos e assintomáticos (YAMANE *et al.* 1993 a,b). Em algumas áreas da parasitologia, desenvolveu-se desde os primórdios métodos de diagnósticos alternativos, que visavam refutar esta dificuldade. Dentre as inúmeras técnicas utilizadas, destacam-se o uso de animais de laboratório (inoculação *in vivo*) e o diagnóstico utilizando vetores potenciais sobre o hospedeiro vertebrado (Xenodiagnóstico).

Neste particular, a espécie *B. equi*, para sua perpetuação, por tratar-se de um parasito obrigatório, necessita de vetores que possuam habilidade de adquirir, desenvolver e replicar em seu interior formas evolutivas de *B. equi*, para posteriormente migrarem para as glândulas salivares e serem inoculadas na forma de esporozoíta em hospedeiros vertebrados. UETI *et al.* (2005), basearam-se nesta presunção, que os carrapatos adquiram tal infecção em baixos níveis parasitêmicos, utilizaram ninfas de *B. microplus*, que é uma espécie na qual a *B. equi* desenvolve-se biologicamente, e observou-se a transmissão ao infestarem potros.

HIRATO *et al.*, (1945), foi quem primeiro reportou a possibilidade de aplicação do Teste de Fixação de Complemento (TFC) para o diagnóstico das babesioses eqüinas, primeiramente envolvendo *B. caballi*. Em março de 1969 o TFC foi aceito como teste oficial para piroplasmoses eqüinas pelo USDA, sendo desde então reconhecido e utilizado mundialmente (FRIEDHOFF, 1982). As amostras de *B. equi* (= *T. equi*) e *B. caballi* (USDA) utilizadas no TFC foram isoladas de cavalos naturalmente infectados da Flórida criopreservadas e mantidas por várias passagens em pôneis e vetores. No caso de *B. caballi*, se utilizaram passagens em *A. nitens* e para *B. equi* (= *T. equi*) passagens em *Hyalomma anatolicum anatolicum* e *Rhipicephalus turanicus* (KLINCKMANN, 1981; TENTER, 1984).

O TFC detecta títulos de anticorpos, a partir de oito dias do início da infecção, declinando entre dois e três meses pós-infecção, por eliminação espontânea ou terapêutica com drogas babesicidas em caso de infecção por *B. caballi*. A partir daí, as reações imunológicas diagnosticadas através do TFC, podem se tornar negativas num intervalo de 3 a 15 meses para *B. caballi*, e para *B. equi* (= *T. equi*) o animal se mantém por toda a vida como portador (FRIEDHOFF, 1982; BRÜNNING, 1996).

Em casos de exportação de cavalos de áreas endêmicas para os Estados Unidos, Canadá, Japão e Austrália, utilizado o TFC com o "screening", e em casos contraditórios, pode-se associar a imunofluorescência indireta e futuramente o ELISA, que se encontra em fase de pesquisa (BOSE & PEYMANN, 1994).

Atualmente as pesquisas têm avançado para o desenvolvimento de novos testes de diagnóstico, que na maioria das vezes são mais sensíveis na detecção de portadores assintomáticos “Enzyme Linked immunosorbent Assay” - ELISA, mas o TFC ainda , o teste mais específico para o diagnóstico das babesioses eqüinas (BRÜNNING, 1996).

Uma razão primária para que ocorram resultados falsos negativos no TFC é a presença da imunoglobulina da classe das IgG (T) que não fixa complemento e é bastante encontrada no soro de eqüinos (MCGUIRE *et al.*, 1971). As imunoglobulinas do grupo das Ig G que tem hábil poder de fixação de complemento são IgG1 e IgG3 (ROITT, 1998).

O teste de imunofluorescência indireta é o método mais utilizado atualmente, sendo empregado no diagnóstico de todas as espécies do Gênero *Babesia* (BÖSE *et al.*, 1995). Foi

utilizada pela primeira vez por RISTIC & SIBINOVIC (1964) para o diagnóstico de babesiose. Comparada com o TFC, apresenta maior sensibilidade e especificidade (DONNELLY *et al.*, 1980). Este método pode detectar anticorpos já a partir do sexto dia pós-infecção (DE WAAL *et al.*, 1987) e mesmo com uma única infecção, os anticorpos podem ser detectados um ano e meio após a inoculação (WEILAND, 1986; KUTTLER *et al.*, 1988). O Custo por teste é baixo e a maioria dos reagentes necessários é prontamente disponível ou de preparação local. Normalmente não mais que 70-90 amostras podem ser examinadas por dia (BÖSE *et al.*, 1995).

O método sorológico mais sensível é o teste ELISA, embora exista necessidade de adaptação para um protocolo mais simples, o que quando alcançado, proporcionará a facilidade da automação possibilitando o manejo de grandes amostras em períodos relativamente mais curtos dos que observados em testes atuais. Foi adaptado para pesquisa de anticorpos anti-*Babesia divergens* por PURNELL *et al.* (1976). Comparado ao TFC e a RIFI, apresenta sensibilidade maior, no entanto, tem se verificado reações cruzadas entre as diversas espécies de *Babesia*, entre elas *Babesia equi* e *Babesia caballi* (AICHER, 1984; SOULE *et al.*, 1984). Atualmente Ensaio Imunoenzimáticos do tipo competitivo com a utilização de anticorpos monoclonais, vêm sendo desenvolvidos e demonstrados um alto grau de sensibilidade e especificidade, embora ainda pouco executável ao nível de diagnóstico de rotina por tratar-se de uma técnica laboriosa (KNOWLES *et al.*, 1998).

Devido ao pleomorfismo dos parasitos, as observações morfológicas por si só, não são suficientes para distinção entre *B. gibsoni*, *B. equi* (= *T. equi*) e *B. microti*, ao nível de microscopia óptica (PURNELL, 1981; ZAHLER *et al.*, 2000 ab; KJEMTRUP *et al.*, 2000).

A amplificação molecular de DNA de *Babesia* utilizando a Reação de Cadeia de Polimerase demonstra ser um método de detecção direta acentuadamente mais sensível que a microscopia óptica. (BOSE *et al.* 1995; BIRKENHEUER *et al.*, 2003 a).

A utilização das técnicas moleculares, sobretudo a utilização de mais de uma técnica em conjunto, tais como: PCR + RFLP, (CACCIO *et al.* 2002); PCR + Clonagem e sequenciamento (CRIADO-FORNÉLIO *et al.* 2003; SCOFIELD, 2006) tem se mostrado promissora tanto fins diagnósticos quanto epizootológicos.

Entende-se que após a ocorrência desta relação atípica entre *B. equi* (= *T. equi*) e *C. familiaris*, salienta-se a importância do desenvolvimento de modelos diagnósticos que avaliem ao mesmo tempo a ocorrência destes dois parasitismos, tais como existente para *B. gibsoni* e *B. canis* (BIRKENHEUER *et al.*, 2003). Embora se apresentando incipiente e ainda sem a devida avaliação quanto à importância na cadeia epidemiológica, acentuasse a intimidade que tanto cães quanto equinos têm entre si e a tendência a cronicidade presente nas infecções por *B. equi* (= *T. equi*) e sua importância em sanidade animal e econômica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de Execução

Os experimentos foram realizados em três diferentes locais, que foram:

- Estação para Pesquisa Parasitológica W.O. NEITZ, pertencente ao Departamento de Parasitologia Animal/ Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). A UFRRJ está situada entre os paralelos 22°41' 22°45' de latitude sul e os meridianos 43°38' 43°42' de longitude oeste de Greenwich a uma altitude de 33 metros do nível do mar, apresentando um clima tipicamente tropical, localizada no Município de Seropédica, Rio de Janeiro.
- Laboratório de Biologia Molecular, Embrapa Agrobiologia – Seropédica – RJ – Brasil.
- Laboratório de Diagnóstico de Doenças Parasitárias da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, Brasil. Sob a supervisão do Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares.

3.2 Origem do Inóculo, Cálculo de Parasitemia e Inoculação Experimental de *T. equi* em *Canis familiaris*

Utilizou-se nestes experimentos a cepa Jaboticabal criopreservada de *T. equi*. Esta cepa demonstrou ser viável na produção da doença clínica e alto nível parasitemicos em cavalos jovens sensíveis ou adultos imunossuprimidos.

O descongelamento foi realizado em banho-maria¹, a 37°C durante 30 minutos, a fim de proporcionar as condições mais próximas às observadas *in vivo*. O grau de parasitemia do inóculo foi calculado conforme preconizado pelo “Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura” (IICA, 1985), para o cálculo de Babesiose e anaplasose bovina. Para tanto, avaliou-se à microscopia óptica de imersão, 29 campos uniformes em esfregaços sanguíneos, com aproximadamente 350 hemácias, em movimento borda grega na lâmina, escolhidos na porção do terço final dos esfregaços sanguíneos, obtendo ao final da avaliação grau de parasitemia de 60%.

Após isto, inoculou-se por via subcutânea sobre a região escapular, volume que variaram conforme a faixa etária dos espécimes, a saber: 2 ml em espécimes jovens e 3 ml em espécimes adultos. O mesmo procedimento foi adotado com os animais testemunhas (controle), sendo que o inóculo utilizado, por via subcutânea, para este grupo era composto por NaCl a 0,9% (solução fisiológica).

3.3 Origem, Formação dos grupos e Manutenção de *Canis familiaris*

Os animais utilizados nos experimentos foram obtidos do produto de duas gestações de fêmeas sem raça definida (SRD), totalizando 17 cães, sendo 05 fêmeas e 12 machos. Formou-se 03 grupos distintos: G1–04 cães jovens (02 filhotes; 02 filhotes-controle); G2–08 cães adultos (06 adultos; 02 adultos-controles); No intuito de esclarecer a susceptibilidade da espécie *C. familiaris* ocorre em condições normais, condições de aumento fisiológico de corticosteróide (esforço físico) ou mesmo em algum tipo de imunodeficiência, introduzimos o G3 composto de: 02 cães filhotes e 03 adultos (01 filhotes e 02 adultos imunossuprimidos; 01 filhote e 01 adulto-controle).

¹ Banho-maria Fanem Mod. 102/8

Os animais foram mantidos, vermifugados, vacinados e alimentados com ração comercial² e água *ad libitum* desde Março de 2003 até Novembro de 2005. Os cães eram isentos de carrapatos, previamente e durante todo o experimento tratado da seguinte forma: utilizaram-se produtos carrapaticidas à base de deltametrina e amitraz, nas diluições recomendadas pelos fabricantes, em intervalos regulares de 21 dias; e como métodos físicos à varredura de fogo, e distribuição de vaselina em volta das paredes e assoalhos em intervalos de 15 dias. A inspeção quanto à presença de carrapatos nos cães foram feitas diariamente.

Utilizou-se para fins de estudos epizootiológicos, 12 espécimes de cães (SRD), de idade e sexos distintos, que conviviam em estreita relação com cavalos em nichos rurais desde o nascimento, dando origem à formação do último grupo avaliado: G4. Todos os animais estudados conviviam com eqüinos desde o nascimento e apresentavam-se infestados com carrapatos do gênero *Amblyomma*. Estes animais pertenciam a 05 propriedades rurais, localizadas no Município de Seropédica, Rio de Janeiro dispersas no raio de 20 km, tendo por referência a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

3.3.1 Avaliação dos aspectos clínicos dos cães

Para verificar o estado de higidez dos espécimes *C. familiaris*, antes e durante os experimentos, adotou-se o seguinte protocolo de avaliação clínica: I - Temperatura retal, aferida a cada 24 horas a partir do dia zero da inoculação; II - Tempo de preenchimento capilar, realizado no momento da aferição da temperatura; III - hematócritos, com intervalos regulares de 07 dias, a fim de avaliar se ocorreria algum tipo de anormalidade sanguínea.

3.3.2 – Protocolo de imunossupressão

Para a imunossupressão química utilizou-se Dexametasona³ na dose de 0,5mg/kg de peso vivo, administrado pela via intramuscular a cada 12 horas. Os cães foram previamente imunossuprimidos e continuaram até o 27º dia de imunossupressão. A inoculação dos animais com sangue total contendo *T. equi*, deu-se no 7º dia de imunossupressão.

Adotou-se este protocolo de FORLANO (2005), que naquela ocasião avaliava o ciclo biológico de *Hepatozoon canis* em condições experimentais. Adaptou-se, principalmente o tempo de imunossupressão ao ciclo biológico de *T. equi*, cerca de 10 dias e prolongou-se sete dias por com o intuito de proporcionar manifestações clínicas ou parasitológicas da possível interação entre as espécies *T. equi* e *C. familiaris*.

² Ração Bummer®

³ Azium®

3.4 Origem, Obtenção e Manutenção de Carrapatos

3.4.1 Larvas de *Boophilus microplus* livres de *Babesia* sp.

A metodologia utilizada para criação e manutenção da colônia de carrapato *B. microplus* foi baseada no trabalho de NEITZ et al. (1971) e BARREIRA (1988).

Foram utilizadas 125 teleóginas de *Boophilus microplus* coletadas de bovinos mestiços mantidos na Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. NEITZ na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

No laboratório, as teleóginas foram lavadas em água corrente, secadas, pesadas, selecionadas segundo o seu peso, em seguida foram identificadas e fixadas em placas de Petri as quais foram acondicionadas em câmara climatizada do tipo BOD, à temperatura de $28\pm 2^\circ\text{C}$ e $80\pm 5\%$ de Umidade Relativa (UR).

Os ovos do segundo dia de postura das teleóginas foram separados e pesados em balança analítica de quatro casas decimais. Durante a pesagem parte dos ovos foram separados em seringas cada uma com 0,5g de ovos. As seringas contendo os ovos foram identificadas e acondicionadas em câmara climatizada, à temperatura e UR igual à utilizada para manutenção das teleóginas.

Quinze dias pós-eclosão, as larvas de *Boophilus microplus* foram utilizadas para uma segunda infestação de bezerros sensíveis, livres de *Babesia* spp. Cada bezerro foi infestado com aproximadamente 10.000 larvas viáveis. A finalidade dessa infestação foi verificar, através do exame da hemolinfa das teleóginas recuperadas (5, 7 e 10º dia pós-início de postura) a confirmação de nenhum tipo de hemoparasito. Assim sendo, seguiu-se o protocolo exposto referente a ovos do 2º dia de postura.

3.4.2 Obtenção de ninfas *Rhipicephalus sanguineus* livres de parasitos de *Babesia* sp.

Utilizou-se 60 fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* obtidas de cães naturalmente infestados. Depois de coletadas, os exemplares foram lavados em água corrente, secos em papel toalha, pesados em balança analítica e acondicionadas em placas de Petri, devidamente identificadas, e transferidas para câmara climatizada do tipo BOD regulada a $28\pm 2^\circ\text{C}$, Umidade Relativa de $80\pm 5\%$.

Utilizou-se o mesmo protocolo adotado para espécie *B. microplus* quanto à postura do 2º dia. Estes foram pesados em alíquotas de 0,1g e acondicionados em seringas plásticas descartáveis com a extremidade distal cortada e vedada com algodão hidrofílico. Estas seringas foram mantidas nas mesmas condições controladas descritas para as fêmeas ingurgitadas. Foram feitos exames da hemolinfa nos dias 5, 7 e 10 após o início da postura de cada teleóquina, para verificar a possibilidade dessas teleóginas estarem infectadas com hemoparasitos do gênero *Babesia*, utilizando-se somente as posturas das teleóginas negativas.

Quinze dias após a eclosão das larvas, foram feitas infestações artificiais em coelhos mestiços (Nova Zelândia X Califórnia). Utilizou-se a técnica do saco de pano aderido à orelha (NEITZ et al., 1971) com larvas de 15-20 dias de idade, na razão de 1500 larvas por coelho.

As larvas ingurgitadas naturalmente desprendidas foram divididas em seringas, conteúdo em cada cerca de 100 larvas ingurgitadas, as quais foram transferidas para a câmara climatizada regulada nas mesmas condições descritas anteriormente. Após 15 dias da ecdise as ninfas foram utilizadas para infestação artificial em coelhos, na razão de 200 ninfas por coelho, para obtenção de teleóginas.

Após o desprendimento natural, as teleóginas foram acondicionadas em seringas 20ml, mantidas câmara climatizada do tipo BOD e foi feito exame da hemolinfa das teleóginas nos dias 5, 7 e 10 após o início da postura sendo separados os ovos dos dois primeiros dias, para a obtenção de forma mais segura, larvas livres de parasitos do gênero *Babesia*. As larvas obtidas após a eclosão foram utilizadas para infestação artificial em coelhos, conforme descrito anteriormente. As ninfas livres de parasitos do gênero *Babesia*, obtidas dessas infestações, posteriormente foram utilizadas para infestação artificial em cão SRD, utilizando a técnica do saco de pano aderido às orelhas.

3.4.3 Procedimento de infestação nos espécimes *C. familiaris* adultos

Foram utilizados dois cães do grupo G3, ambos machos e com aproximadamente 1 ano de idade, imunossuprimidos e experimentalmente inoculados com *T. equi*. As infestações foram realizadas utilizando a técnica do saco de pano aderido às orelhas (NEITZ et al., 1971; CUNHA, 1978). Quinze dias após a eclosão das larvas de *B. microplus*, procedemos à infestação artificial no cão (C₁) na razão de 10000 larvas, distribuídas uniformemente em ambas orelhas. O cão C₂ foi infestado com ninfas de *Rhipicephalus sanguineus* na razão de 200 ninfas distribuídas uniformemente em cada orelha. Ao final de cada infestação foram colocados em cada cão (C₁ e C₂) colares especiais, designados de elisabetano, para impedir a retirada dos sacos de pano pelos cães.

3.5 Coleta de Amostras de Sangue

3.5.1 Parasitologia

Foram realizados diariamente punções de vasos periféricos do pavilhão auricular dos animais inoculados com *B. equi*, utilizando as primeiras gotas de sangue para realizar os esfregaços sanguíneos, sendo procedidas tricotomias prévias e utilizando para punção agulhas estéreis (25X7 mm), individualizadas para cada animal. Após a coleta e distensão do sangue em lâminas de vidro apropriadas para hematoscopia, estas foram identificadas, secas em temperatura ambiente, fixadas nos locais de coleta com a utilização do álcool metílico puro para análise, durante 3 minutos. Em seguida foram coradas pelo método de Giemsa⁴ (1:10) por 45 minutos em temperatura ambiente, e avaliados à microscopia óptica de imersão⁵ com amplitude de 1000X.

⁴ Azur-Eosin-Methylene blue solution – Lab. Merck – Part 7442592;

⁵ Microscópio binocular Wild Mod. 31977;

3.5.2 Hematologia, sorologia e biologia molecular

Nos grupos G1, G2 e G3, os animais tiveram amostras coletadas antes da inoculação, as demais coletas foram realizadas após a inoculação com intervalo de 07 dias entre as elas. As amostras de sangue foram coletadas utilizando-se o sistema Vacutainer® em tubos com e sem anticoagulante, através da venipunção braquial.

Os tubos com anticoagulante foram colocados em temperatura ambiente até a formação do coágulo no interior dos mesmos; colocados em seguida em centrifuga específica⁶ e após a centrifugação a 1500 rpm (rotações por minuto), durante 10 minutos, os soros sanguíneos foram obtidos. Após isto, foram colocados em frascos do tipo Eppendorf®, com auxílio de pipetas do tipo Pasteur e acondicionados a -20°C.

Os tubos contendo EDTA, destinados a hematologia, foram extraídos com auxílio de pipetas de 25 µl para os diferentes fins diagnósticos, bem como retiradas amostras destes para os tubos de microhematócritos, por capilaridade. O material restante, era acondicionado em freezer à -20°C, para utilização em biologia molecular.

3.6 Coleta de Amostras de Outros Tecidos

3.6.1 Biopsia de linfonodos

Nas ocasiões de coleta de sangue, adotou-se o procedimento da punção do linfonodo poplíteo, nos seguintes dias pós-inoculação: 0, 5 e 7; a fim de verificar a ocorrência de macro ou microesquizontes de *T. equi* nestas amostras. Adotou-se o seguinte protocolo para este fim: localizava-se por meio de palpação o linfonodo-alvo; procedia-se à tricotomia com o uso de lâmina de aço no local; utilizavam-se agulhas e seringas estéreis, sendo as primeiras (25 x 7mm) e as seringas de 20ml, por meio de pressão negativa (puxando-se o êmbulo da seringa), com a agulha dentro do linfonodo; retirava-se o equipamento e colocava-se o produto da coleta sobre lâmina de vidro; confeccionava-se o esfregaço do tecido e após isto, fixou-se em metanol o material para, posteriormente, adotar o método de coloração de Giemsa e proceder-se à observação no microscópio óptico com magnitude de 1000 X.

3.6.2 Coleta de fragmentos de órgãos *post-mortem*

No decorrer do experimento, alguns dos animais do grupo (G3) desenvolveram quadro clínico de dermatite do tipo úmida. Utilizou-se antibioticoterapia⁷ e fluidoterapia para os animais, mas os mesmos não responderam, evoluindo para quadros septicêmicos e, posteriormente, óbito. A necrópsia foi procedida tão logo confirmou-se os respectivos episódios. Foram coletados fragmentos de: pulmão, rins, fígado, coração, baço e linfonodos mesentéricos. Deste material, procedemos à técnica de “imprint” dos mesmos, que consistiu no toque dos respectivos fragmentos sobre lâmina de vidro e o uso da pressão física com o uso de pinça do tipo “dente-de-rato”, adotando o mesmo tratamento para coloração por Giemsa. Os fragmentos restantes, foram acondicionados em recipientes estéreis e conservados sob congelamento até a ocasião de seu uso em pesquisas moleculares.

⁶ Centrifugador Excelsa 2 – Fanem LTDA – Modelo 205N.

⁷ Flotril® 10%

3.7 Hematologia

Seguiram os critérios adotados por SILVA (2002). Os hemogramas compunham-se da avaliação do volume globular, hematimetria, hemoglobinometria, leucometria global, específica, hematoscopia e leucocitoscopia.

O volume globular era efetuado em centrífuga para microhematócrito⁸, utilizando-se tubos capilares. A hematimetria e leucometria global foram realizadas em câmara de específicas⁹ utilizando-se, respectivamente, soro fisiológico (Hematimetria) e líquido de Tuerk (Leucometria) (COLES, 1986).

A coloração dos esfregaços sanguíneos para a leucometria específica, hematoscopia, leucocitoscopia e pesquisa de parasitos foram efetuada através da coloração de Giemsa (JAIN, 1993)

As leucometrias específicas foram realizadas com esfregaços sanguíneos obtidos na ocasião da venipunção braquial, sendo os esfregaços corados pelo Giemsa e avaliados a luz da microscopia óptica com a utilização do aumento de 1000X. (COLES, 1986).

3.8 Sorologia

3.8.1 Origem do extrato antigênico

O extrato antigênico utilizado para realizar a RIFI foi preparado nos laboratório de Hemoparasitoses e vetores, do Departamento de Parasitologia Animal. Procedimento desenvolvido pelos doutorandos Kátia Roberta Fernandes e Anselmo Afonso Golynski, sob a responsabilidade e supervisão do Prof. Carlos Luiz Massard.

Objetivando a eliminação de *Babesia caballi*, iniciou-se o protocolo de quimioesterilização para a mesma com Dipropionato de imidocarb¹⁰ em três aplicações (em doses 2x superiores a preconizada pelos fabricantes, com intervalos de 72 horas entre as mesmas). O equino foi mantido nas dependências da UFRRJ, onde este foi submetido a esplenectomia, foram procedidos exames clínicos e parasitológicos diários e aproximadamente no 10º dia pós-operatório verificou-se pico parasitêmico superior a 80%. Coletou-se sangue para confecção das lâminas, que posteriormente foram mantidas à -20°C, até o momento da reação.

3.8.2 Confecção da reação de imunofluorescência indireta

A técnica foi procedida segundo critérios adotados por BALDANI (2004), com modificações referentes à espécie testada e a composição dos controles negativos e positivos (*E. caballus*), em todas as repetições. As lamínas de antígenos confeccionados com sangue de equino com alto grau de parasitemia para *T. equi*, foram descongeladas à temperatura ambiente e, em seguida, marcadas com pequenos círculos com esmalte de coloração vermelha. Em cada cavidade foram pipetados 10µl dos soros teste (1:40 e 1:80). As lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 45 minutos e, a seguir, submetidas a três lavagens por imersão de cinco minutos cada em solução salina tamponada (PBS). Após secagem à temperatura ambiente, as cavidades das lâminas foram recobertas com aproximadamente 2µl de conjugado de isotiocianato de fluoresceína anti-IgG canina, diluído em 1:700 em solução de PBS, contendo azul de Evans 1mg%. Foram utilizados como

⁸ Centrifugador para Micro-hematócrito Fanen Mod. 207N

⁹ Neubauer Improved

¹⁰ Imizol®

controles negativo e positivo, soros negativos e positivos de equino para cada lâmina, com conjugado de isotiocianato de fluoresceína anti-IgG equino, diluído em 1:1000 em solução PBS, contendo Azul de Evans 1mg%. Após adição do conjugado, as lâminas foram novamente incubadas conforme descrito acima e submetidas a duas lavagens por imersão, de cinco minutos cada em PBS, e uma terceira lavagem de 30 segundos em água tridestilada. As lâminas, após secagem, foram montadas com lamínulas, utilizando-se glicerina tamponada a uma reação 9:1 de glicerina/tampão carbonato-bicarbonato 0,5M pH 9,6 e, posteriormente, observadas em microscópio equipado para fluorescência (Olympus, BX-FLA).

3.9 Biologia Molecular

3.9.1 Escolha dos protocolos

Com o propósito de avaliar a presença de *T. equi* nas amostras de: sangue, fragmentos de órgãos (Linfonodos, pulmões, baço e fígado) e carrapatos (ninfas de *Boophilus microplus* e adultos de *Rhipicephalus sanguineus*) de *C. familiaris* experimentalmente infectados com *T. equi*, foram utilizados quatro diferentes protocolos espécie-específicos para detecção de *T. equi*, a saber: três ensaios de PCR, a saber: LINHARES, 2003; ALLSOPP et al., 1994; BASHIRUDDIN et al., 1999; e um ensaio de “nested PCR” (NICOLAIEWSKY et al., 2001).

Os protocolos escolhidos para os ensaios de PCR (iniciadores) amplificam fragmentos-alvo do DNA de *T. equi* de diferentes tamanhos, a saber: ALLSOPP et al. (1994) e BASHIRUDDIN et al. (1999) - produtos do gene 18 S RNA r de, respectivamente, 816 e 664 pares de base (pb); o emprego do protocolo descrito por NICOLAIEWSKY et al. (2001) para nested-PCR, que gera produto interno de 102 pb, referente ao gene EMA 1.

3.9.2 Extração de DNA

Utilizaram-se diferentes materiais, com o objetivo de extração do DNA, tais como: sangue total conservado em EDTA; fragmentos de órgãos; ninfas de *B. microplus* e adultos de *R. sanguineus*. Previamente à extração de DNA, as amostras de sangue, passaram pelo processo de refrigeração (-8 à -2°C), para posteriormente, serem utilizadas.

O preparo do material de natureza sólida, tanto fragmentos de órgãos como os carrapatos, utilizamos o processo de maceração com graau e pistilo. Adicionou-se água ultrapura para facilitar o processo de coleta de células e líquidos tissulares provenientes do processo de maceração, com o auxílio de pipetas e ponteira estéreis.

As extrações do DNA foram realizadas empregando-se o "Kit" Comercial¹¹, conforme indicado pelo fabricante.

¹¹ Amersham pharmacia Biotech GFX.

3.9.3 Reações em cadeia de polimerase

As misturas de reagentes ("mix") para os ensaios de PCR foram preparadas conforme descrito originalmente pelos seus respectivos autores.

As amostras de DNA total foram testadas sem diluição e nas diluições de 1:10, 1:100 e 1:1000. Com relação às programações adotadas para cada grupo de iniciadores, temos:

1. LINHARES, (2003): "hot start" à 94°C por 2 minutos, seguidos de 40 ciclos sucessivos nas temperaturas de 94°C por 30 segundos; 53°C por 30 segundos; 72°C por 1 minuto e um tempo de extensão extra à 72°C por 5 minutos (LINHARES, 2003);
2. ALLSOPP et al.,(1994):A desnaturação em 94 / 5 min.; 30 ciclos de 94 / 30s; 64 / 30s e 72 / 30s; extensão final de 72 / 5 minutos;
3. BASHIRUDDIN et al. (1999): Utilizou-se para o "Single PCR", descrito por, a seguinte programação: 5 min a 94°C, 30 ciclos: 94°C por 30 s, 64°C por 30 s, 72°C por 30 s e tempo de extensão final a 72°C de 5 min; e
4. NICOLAIEWSKY et al. (2001): primeira etapa com iniciadores: Externos EMAE-1 e EMAE-2; e Internos EMAI-1 e EMAI-2. Ciclo a primeira etapa: hot start 94°C por 4 min; seguidos de 40ciclos: 94°C por 40 s, 60°C por 1 min, 72°C por 1 min, tempo de extensão final a 72°C de 4 min; na segunda etapa: Hot start a 94°C por 4 min 35ciclos: 94°C por 1 min, 60°C por 45 s, 72°C por 45;

3.9.4 Controle positivo para PCR

Utilizou-se, como controle positivo para as reações em cadeia de polimerase, DNA total extraído de sangue de cavalo inoculado experimentalmente com amostra pura de *T. equi*, colhida na fase de pico de parasitemia. Estas amostras de sangue foram gentilmente cedidas pela Dra. ROSÂNGELA ZACARIAS MACHADO - FCAV/UNESP- Jaboticabal - Estado de São Paulo, Brasil.

3.9.5 Confeção da eletroforese

Os produtos de PCR foram inoculados no gel de Agarose a 1,2%, no volume de 10µl, misturados previamente em corante de corrida e submetidos a 90 volts durante 55 minutos, em tampão TBE 1x.

Para cada corrida de eletroforese eram inoculados os controles (negativo e positivo) e o marcador molecular (100bp DNA - Ladder - Invitrogen®) ao lado das amostras.

Após a corrida os géis foram corados em brometo de etídio por imersão em solução na concentração de 1%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Grupos G1 e G2:

4.1.1 Aspectos clínico-parasitológicos

Na microscopia óptica de imersão, após a avaliação dos esfregaços sanguíneos e de punções de linfonodos dos espécimes *C. familiaris* imunocompetentes, não foram observadas formas evolutivas compatíveis com a presença de *T. equi*. E estes animais não apresentaram variações clínicas, característica de processo patológico, conforme FIGURA 1 e 2.

Estes resultados sugerem que mesmo em animais jovens, que possuem o sistema imunológico imaturo, portanto mais susceptíveis que os adultos, não foram capazes de desenvolver infecção por *T. equi* detectável a microscopia óptica.

As considerações referentes ao diagnóstico diferencial de pequenos piroplasmídeos na microscopia óptica, tais como: *Babesia gibsoni*, *B. microti* e *T. annae* (ZAhLER et al., 2000b; KJEMTRUP et al., 2000), é plausível, tendo em vista a não diferenciação destes à microscopia. Embora os resultados observados indiquem que colocar a espécie *T. equi* no grupo de espécies de protozoários que acometem *C. familiaris*, mereça uma certa reserva, até que todas as possibilidades de transmissão sejam avaliadas.

Observa-se que as diferenças de compatibilidade espécie-específica entre parasito-hospedeiro, demonstraram ser decisivas quanto ao estabelecimento de infecção deste *T. equi* em *C. familiaris*, contrapondo-se ao descrito na literatura sobre os piroplasmídeos (ZAhLER et al., 2000; CRIADO-FORNÉLIO et al., 2003ab).

4.1.2 Aspectos sorológicos

As amostras de soro avaliadas pela RIFI para pesquisa de anticorpos anti-*Theileria equi*, foram negativas em ambas as titulações adotadas.

Tais resultados são comuns em quadros em que não exista de interação parasito-hospedeiro. O que sugere a existência de barreiras imunológicas, que podem ter contribuído para o resultado observado, tais como: a resposta imune do tipo celular, promovida pelo sistema mononuclear fagocitário, por meio da fagocitose, pode ter limitado a instalação do agente etiológico em questão; a ausência de receptores específicos nas células das espécies *C. familiaris* impedindo penetração de *T. equi*.

4.1.3. Aspectos moleculares

Os resultados das PCRs para amostras de sangue total de *C. familiaris* experimentalmente infectados com *T. equi*, conservadas em EDTA, foram negativos nos protocolos utilizados.

Tais resultados se contrapõem aos da literatura (CRIADO-FORNÉLIO et al., 2003a). Os autores responsáveis pela citação da ocorrência desta relação parasito-hospedeiro, utilizaram abordagem direcionada a biologia molecular (sequenciamento e filogenia), não utilizando porém, como contraprova, protocolo bio-molecular específica para *T. equi*. Diferenças genótípicas pequenas têm sido motivações para reavaliações, redescrições ou mesmo a criação de novas espécies (ZAhLER et al., 2000a), sem a adoção de critérios mais amplos que acomodem não somente o aspecto molecular, como também o fenotípico e , principalmente, o biológico (UILENBERG et al. 2004)

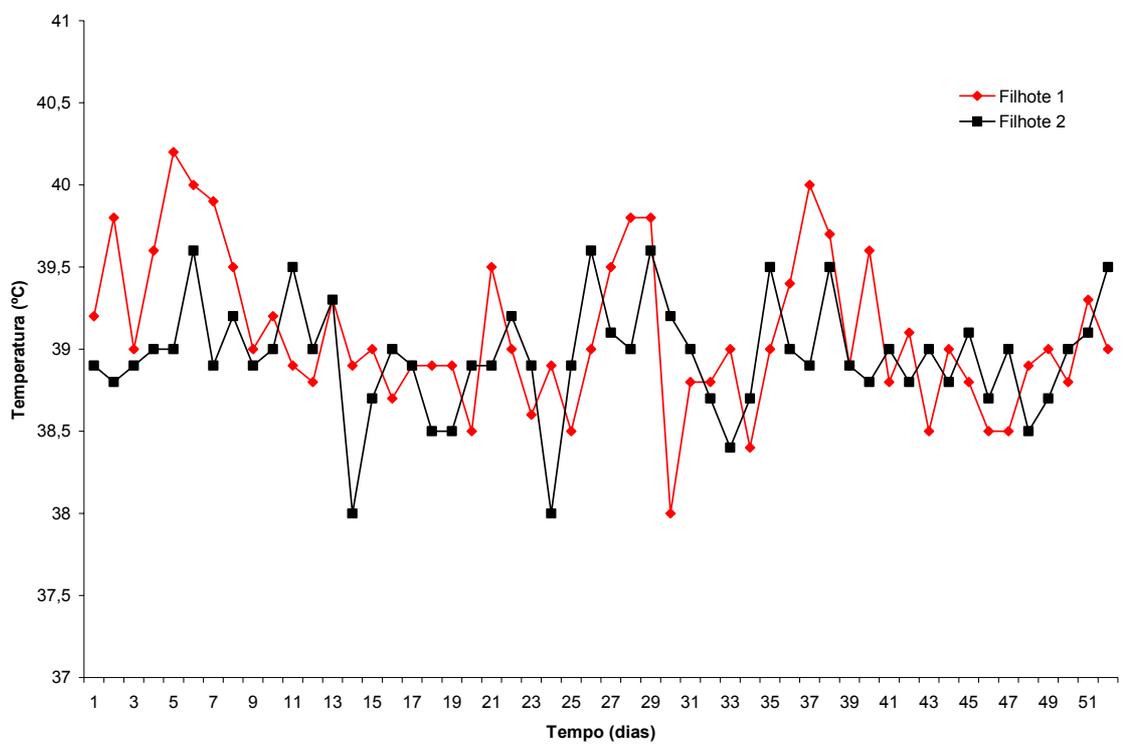


Figura 1. Variação da temperatura de Cães filhotes (Grupo 1) inoculados com *Theileria equi*, no período de julho a setembro de 2004.

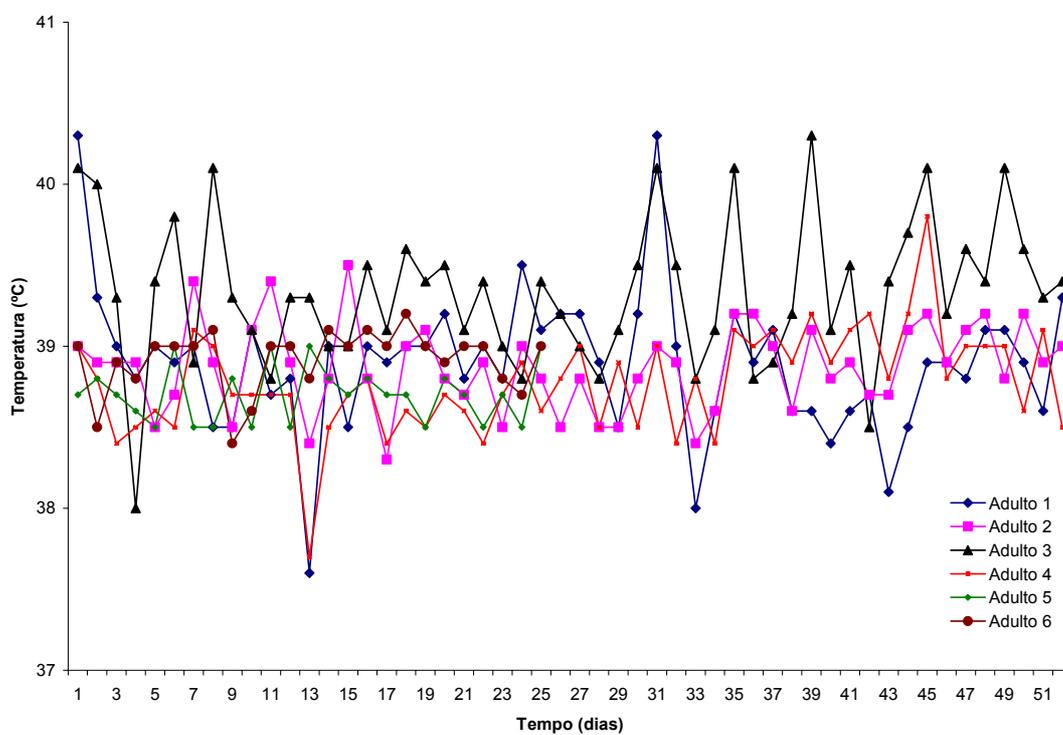


Figura 2. Variação da temperatura de cães adultos (Grupo 2) inoculados com *Theileria equi*, no período de novembro de 2004 a janeiro de 2005.

4.2 Grupo G3

4.2.1 Aspectos clínico-parasitológicos

Os resultados a microscopia óptica de imersão, referentes aos grupos de *C. familiaris* imunossuprimidos e infectados experimentalmente com *T. equi*, avaliando tanto esfregaços sanguíneos de sangue sistêmico e periférico, quanto os provenientes de punções de linfonodos dos espécimes estudados, não foram observadas formas evolutivas compatíveis com a presença de *T. equi*. Observaram-se anormalidades clínicas decorrentes da sensibilidade à imunossupressão química, em função de infecções secundárias, sobretudo no sistema tegumentar de dois espécimes que evoluíram a óbito: um cão-testemunha e um adulto avaliado, conforme Figura 3.

A leucopenia inicial induzida pelo uso de corticosteroíde sintético, tende a diminuir a resposta celular nos capilares sanguíneos e mais ainda a diminuição da migração dos monócitos circulantes para resposta imunológica do tipo celular. Este fato foi levado em consideração quando se preconizou a inclusão deste grupo. Os autores da descrição da relação entre *T. equi* e *C. familiaris*, citam de modo pouco pormenorizado os critérios adotados pelos clínicos daquelas localidades para a coleta e envio do material a pesquisa laboratorial (CRIADO-FORNÉLIO et al., 2003a). Embora não fosse motivo deste trabalho a indução de quadro infeccioso, mesmo frente à situação mais grave, aonde os animais que vieram a falecer estavam com prognóstico reservado, e sabidamente inoculados com *T. equi*, não houve a observação da parasitemia.

Fundamentando-se deste modo, a hipótese da incapacidade da cepa utilizada causar quaisquer anormalidades ou mesmo de estabelecer-se na espécie *C. familiaris*.

4.2.2. Aspectos moleculares

Os resultados das PCRs, do DNA extraído de: sangue total com EDTA conservado à -20°C e fragmentos de linfonodos, pulmões, baço, e fígado conservados pelo congelamento, provenientes de *C. familiaris* experimentalmente infectados com *T. equi* e imunossuprimidos, foram negativos nos protocolos adotados neste estudo.

No concernente a observação na confecção da reação de cadeia de polimerase, utilizou-se “amplicon” obtido sem diluições prévias, procedendo ao protocolo de LINHARES (2004). Nesta oportunidade, nos deparamos com o resultado negativo e uma faixa de amplificação inespecífica e significativa.

Em um dos espécimes imunossuprimidos, precisamente no 18º dia pós-inoculação, ao avaliarmos o material proveniente do linfonodos poplíteos observou-se à presença de estruturas compatíveis com Corpus Azuis de Koch, descritas na espécie *Theileria parva*. Porém a luz da biologia molecular, não houve a confirmação desta suspeita, cabendo ressaltar que as amostras utilizadas para exame foram coletadas, exatas 48 horas antes do óbito.

4.2.3. Aspectos biológicos

Não houve, em nenhum dos protocolos utilizados, amplificação de DNA nas reações de PCR, referentes a pesquisa de *T. equi* em adultos de *R. sanguineus* e ninfas de *Boophilus microplus*, provenientes de animais imunossuprimidos e experimentalmente inoculados com *T. equi*.

No meio científico, existe um consenso a respeito da existência de um complexo de espécie, denominado complexo *R. sanguineus*, que tem como espécies: *R. camicasi*; *R. turanicus*; *R. sanguineus stricto sensu*; *R. sulcatus*.. No entanto, alguns trabalhos ainda sugerem que a espécie *R. sanguineus*, possua um amplo espectro de hospedeiros susceptíveis, estas afirmações carecem de revisão profunda quanto a classificação específica (PEGRAM et al., 1987ab). Avaliando-se o ponto-de-vista morfológico, sem adoção de métodos mais acurados para fins taxonômicos, existe uma real dificuldade na distinção destas espécies, fato este que justificou a criação do complexo. Assim sendo, ao observarmos tais resultados na pesquisa bio-molecular de *T. equi*, entendemos que: o animal não desenvolveu a infecção por *T. equi*; ou provavelmente o *R. sanguineus* que havia sido citado por ENIGK (1943) da espécie *R. turanicus*, devido sua localização, sendo também notório o fato de não haver mais citações neste sentido na literatura científica desde então sobre esta relação *T. equi* e *R. sanguineus*.

Nota-se que a utilização da espécie *B. microplus* para fins de xenodiagnóstico, é tanto plausível quanto exequível (GUIMARÃES et al., (1998); UETI et al. (2005)) do ponto-de-vista biológico. Não existindo outro motivo a ser ponderado, neste caso, que não a incapacidade da cepa *T. equi*, inoculada experimentalmente em animal previamente imunossuprimido, de estabelecer e desenvolver-se neste hospedeiro vertebrado.

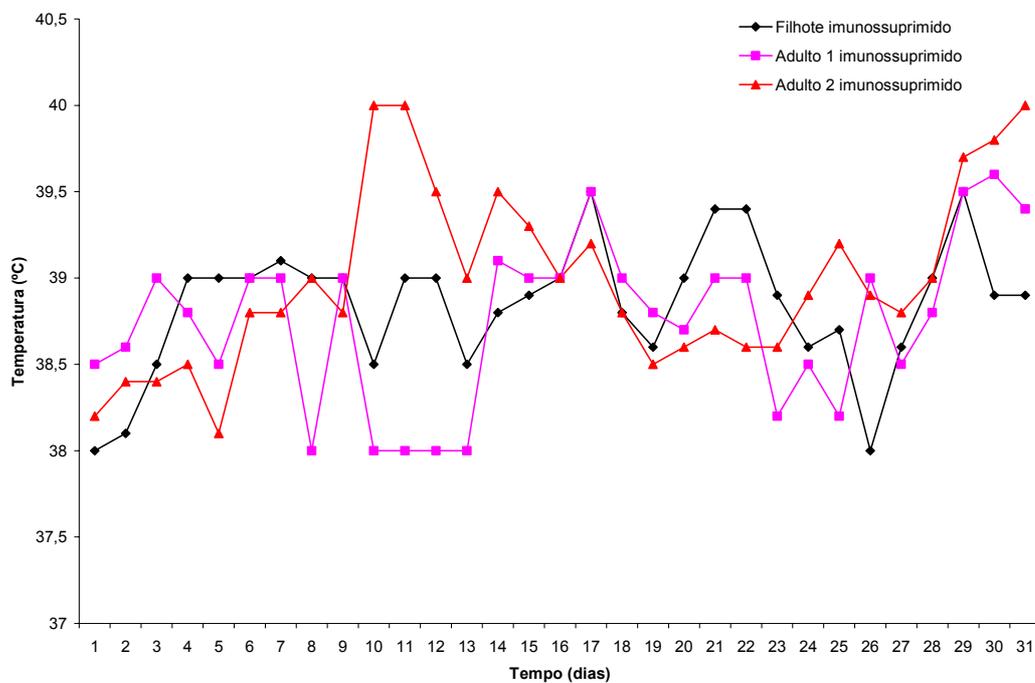


Figura 3. Variação da temperatura de cão jovem e adulto imunossuprimidos (Grupo 3) inoculados com *Theileria equi*, no período de setembro a outubro de 2005.

4.3 Grupo G4

4.3.1 Aspectos parasitológicos

Ao nível da microscopia óptica de imersão, não foram observadas formas evolutivas, em nenhum elemento figurado do sangue, compatíveis com *T. equi*, ou quaisquer outros hematozoários que acometa a espécie *C. familiaris*. Embora, aspectos epidemiológicos, sobretudo a questões referentes à teoria dos focos naturais (REIS, 2001): a superposição das áreas habitadas pelos hospedeiros e potenciais vetores e a presenças do parasito e sua prevalência estão contempladas, tendo em vista que a área em questão é citada como área de estabilidade enzoótica para *T. equi* (PFIFFER, 1994).

Este aspecto não serve em absoluto de base para refutar a ocorrência da relação entre *T. equi* e *C. familiaris*, devido à baixa sensibilidade em níveis parasitêmicos baixos (YAMAME et al., 1987ab). O que é também reportado no estudo desenvolvido por LORETTI & BARROS, 2005, com relação à ocorrência em sangue circulante de outros pequenos piroplasmídeos de caninos de procedência rural, como a espécie *Rangelia vitalii*.

As ocorrências de pequenos babesídeos em *C. familiaris* têm estado incipientes, se comparado à ocorrência de *B. canis* e *B. vogeli* (PASSOS et al., 2005; SÁ, 2005). Apenas no Estado do Rio Grande do Sul, se tem notícia através de publicação científica da ocorrência de pequeno babesídeo (BRACCINI et al., 1992), que poderia ser atribuída a *T. equi*, por ser de consenso comum que esta espécie, fenotipicamente, é indistinta da *B. gibsoni*, apresentando, porém um único aspecto que poderia ser utilizado em diagnóstico diferencial, entre elas: a presença de divisões com aspecto de cruz, o que não foi reportado em outra espécie, que não as pertencentes ao gênero *Equus*.

Porém adotou-se a inclusão do G4 no intuito de se observar em condições tão próximas quanto possíveis, respeitando-se objetivamente a adaptação e evolução da espécie *C. familiaris* reportada no continente americano em detrimento ao europeu, o comportamento destas espécies, *T. equi* e *C. familiaris*, conforme descrito pelos autores europeus (CRIADO-FORNÉLIO et al. 2003a) em um nicho rural considerado enzoótico para *T. equi*.

4.3.2 Aspectos sorológicos

As pesquisas referentes à presença de anticorpos da classe Ig G anti-*T. equi*, nas amostras de soro oriundas de três repetições em doze espécimes *C. familiaris*, foram negativas nas diluições 1:40 e 1:80, na reação de imunofluorescência indireta. A não produção de resposta imune detectável pela RIFI, em particular para pesquisa desta classe de imunoglobulina (Ig G), que apresenta maiores graus de concentração sérica em detrimento as da classe Ig M (TIZARD, 2000; ROITT et al., 1999).

Estes resultados não corroboram com a hipótese de que a co-habitação de um mesmo nicho ecológico proporciona a ocorrência da relação parasito-hospedeiro incomum (CRIADO-FORNÉLIO et al., 2003 ab). Porém, no âmbito densidade populacional do hospedeiro vertebrado e vetores biológicos, bem como os fatores limitantes à transmissão, tais como uso de produtos carrapaticidas ou mesmo o grau nutricional dos indivíduos, provavelmente corroboraram para observação do resultado negativo em *C. familiaris*, na região estudada.

Considera-se que a interação entre as espécies *T. equi* e *C. familiaris* incomum ocorrida em outros países, tanto envolvendo *C. familiaris* (CRIADO-FORNÉLIO et al., 2003a), quanto *Felis catus* (CRIADO-FORNÉLIO et al., 2003b) e as espécies *T. equi* e *B. canis canis*, respectivamente, são plausíveis com as cepas ocorrentes naquelas localidades. Em alguns casos, existem diferenças genotípicas estritas a poucos pares de bases em espécies seqüenciadas e depositadas no banco de dados genéticos, mundialmente acessíveis, como por exemplo, o que ocorre com as cepas de *T. equi* (Spain 1 e Spain 2), que possuem diferença de apenas 04 Pares de bases, fato este que segundo os autores CRIADO-FORNÉLIO et al. (2003a), inviabiliza a infecção de uma possível espécie hospedeira alternativa, no caso a *C. familiaris*.

Tais diferenças, como já abordado em tópicos anteriores, não podem por si só servir de apoio para redescrições, revalidações ou mesmo criações de espécies; outros parâmetros são de notória importância quanto à taxonomia, não somente do grupo dos piroplasmídeos, mas em todas as espécies de modo geral (UILENBERG et al., 2004).

5 CONCLUSÕES

1. A inoculação experimental em cães domésticos (*C. familiaris*) imunocompetentes e imunossuprimidos com amostra viável criopreservada da cepa Jaboticabal de *T. equi* não reproduziu infecção detectável clinicamente ou pelos métodos: microscopia óptica, RIFI, biologia molecular e xenodiagnóstico;
2. *C. familiaris* imunocompetentes e imunossuprimidos foram refratários à infecção experimental com a cepa Jaboticabal de *T. equi*; e
3. Em condições naturais, cães domésticos como estreita relação com eqüinos em áreas enzoóticas para *T. equi*, na microrregião de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, Brasil, não apresentaram anticorpos anti-*T. equi*, não estando, portanto, envolvidos na epizootiologia de *T. equi* nesta localidade.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE PROPRIETÁRIOS DE CAVALOS DE CORRIDA. **Babesiose eqüina: Caracterização da doença e avanço na pesquisa.** 1996. 16p.

AVARZED, A.; DE WAAL, D.T.; IGARASHI, I.; SAITO, A.; OYAMADA, T.; TOYODA, Y.; SUZUKI, N. Prevalence of equine piroplasmiasis in Central Mongólia. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, South África, v. 64, n. 2, p. 141-145, 1997.

BALDANI, C. D. **Estudo comparativo de técnicas diretas (esfregação sanguíneo, cultivo “in vitro”, reação em cadeia de polimerase) e indireta (reação de imunofluorescência, ensaio imunoenzimático e fixação do complemento) no diagnóstico de Babesia equi em eqüinos naturalmente infectados.** 2004. 93 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

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

BARBOSA, I. P. **Epidemiological studies of infections with Babesia equi and Babesia caballi in Brazil.** 1993. 34 p. Dissertação (Master in Veterinary Medicine) – School of Veterinary Medicine, Germany, 1993.

BARBOSA, I. P.; ROSE, R.; PEYMANN, B.; FRIEDHOFF, K. T. Epidemiological aspects of equine babesiosis in a herd of horses in Brazil. **Veterinary Parasitology**, United Kingdom, v. 58, p. 1-8, 1995.

BATTSETSEG, B.; XUAN, X.; IKADAI, H.; BAUTISTA, J. L.; BYAMBAA, B.; BOLDBAATAR, D.; BATTUR, B.; BATTSETSEG, G.; BATSUKH, Z.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; MIKAMI, T.; FUJISAKI, K. Detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in *Dermacentor nuttalli* adult ticks. **International Journal of Parasitology**, Australy, v. 31, n. 4, p. 384-386, 2001.

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

BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; STEBBINS, M.; POORE, M.; BREITSCHWERDT, E. Serosurvey of anti-*Babesia* antibodies in stray dogs and American Pit Bull Terriers and American Staffordshire Terriers from North Carolina. **Journal of the American Animal Hospital Association**, United States, v. 39, p. 551-557, 2003.

BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASSARD, C. L.; MASSARD, C. A. Aspectos epidemiológicos da babesiose eqüina na microrregião fluminense do Grande Rio – Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Seropédica, v. 4, n. 1, p. 13-17, 1997.

BOCH, J. *Babesia* infecions in horses, cattle and dogs in southern Germany. **Tierarztl Prax suppl**, Germany, v. 1, p. 3-7, 1985.

- BOLDBAATAR, D.; XUAN, X.; BATTSETSEG, B.; IGARASHI, I.; BATTUR, B.; BATSUKH, Z.; BAYAMBAA, B.; FUJISAKI, K. Epidemiological study of equine piroplasmiasis in Mongolia. **Veterinary Parasitology**, United Kingdom, v. 127, n. 1, p. 29-32, 2005
- BONE, J. F.; CATAcott, E. J.; GABE, A. A.; HOHNSON, L. E.; RILEY, W. F. **Equine medicine and surgery**. 1ª edição. California: American Veterinary Publications, 1963. 420p.
- BOOZER, A.L.; MACINTIRE, D.K. Canine babesiosis. **Veterinary clinics small animal practice**, United States, v. 33, p. 885-904, 2003.
- BOSE, R.; JORGENSEN, W. K.; DALGLIESH, R. J.; FRIEDHOFF, K. T. DE VOS, A. J. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Veterinary Parasitology**, United Kingdom, v. 57, p. 61-74, 1995.
- BOSE, R.; PEYMANN, B. Diagnosis of *Babesia caballi* infections in horses by enzyme-linked immunosorbent assay and western blot. **International Journal of Parasitology**, Australy, v. 24, p. 341-346, 1994.
- BOTTEON, P. T. L.; MASSARD, C. L.; BOTTEON, R. C. C. M.; LOSS, Z. G.; LINHARES, G. F. C. Seroprevalencia de *Babesia equi* em tres diferentes sistemas de criaçaõ de equinos, Rio de Janeiro, Brasil. **Parasitologia Latinoamericana**, Chile, v. 57, p. 3-4, 2002.
- BRACCINI, G.C.; CHAPLIN, E. L.; STOBBE, N. S.; ARAUJO, F. A. P.; SANTOS, N. R. Resultados de exames laboratoriais realizados no setor de protozoologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, nos anos de 1986-1990. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, v. 20, p. 134-149, 1992.
- BRUMPT, E. **Précies de parasitologia**. 1ª Edição. Paris: Masson et cie, 1936. 500p.
- BRUNNING, A. Equine piroplasmiasis: an update on diagnosis, treatment and prevention (review). **British Veterinary Journal**, United Kingdom, v. 152, p.139-151, 1996.
- BRYANT, J. E.; ANDERSON, J. B.; WILLERS, K. H. Control of equine piroplasmiasis in Florida. **Journal American veterinary Medicine Association**, United States, v. 154, n. 9, p 1034-1036, 1969.
- CACCIO, S. M.; ANTUNOVIC, B.; MORETTI, A.; MANGILI, V.; MARINCULIC, A.; BARIC, R. F.; SLEMENDA, S. B.; PIENIAZEK, N. J. Molecular characterization of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogelli* freom naturally infected European dogs. **Veterinary Parasitology**, United Kingdom, v. 106, p. 285-292, 2002.
- CAMACHO, A. T.; PALLAS, E.; GESTALT, J. J.; GUITIAN, F. J.; OLMEDA, H.K.; GOETHERT, K.; TELFORD, S. R. Infection of dogs in northwest Spain with *Babesia microti*-like agent. **Veterinary Record**, United Kingdom, v. 149, p. 552-555, 2001.
- CAMACHO, A. T.; PALLAS, E.; GESTALT, J. J.; GUITIAN, F. J.; OLMEDA, A. S.; GOETHERT, K.; TELFORD, S. R.; SPIELMAN, A. *Ixodes hexagonus* is the main candidate as vector of *Theileria annae* in northwest Spain. **Veterinary Parasitology**, United Kingdom, v. 112, n. 1-2, p. 157-163, 2003.

CAMACHO, A. T.; PALLAS, E.; GESTALT, J. J.; GUITIAN, F. J.; OLMEDA, A. S.; GOETHERT, K.; TELFORD, S. R.; SPIELMAN, A.; HABELA, M. A. *Theileria*(*Babesia*) *equi* and *Babesia caballi* infections in horses in Galicia, Spain, **Tropical Animals Health and Production**, Netherlands, v. 37, n. 4, p. 293-302, 2005.

CARINI, A.; MACIEL, J. Sobre a moléstia dos cães, chamada Nambi-Uvú e o seu parasita *Rangelia vitalii*. **Anuario Paulista de Medicina e Cirurgia**, São Paulo, v. 3, n. 3, p. 65-71, 1914.

CARINI, A. Noticias sobre as zoonoses observadas no Brasil. **Revista Médica de São Paulo**, São Paulo, v. 22, p. 459, 1908.

_____. Sobre o ciclo de desenvolvimento exoeritrocítico de um piroplasma de cão. **Arquivos do Biológico**, São Paulo, v. 32, n. 285, p. 49-52, 1948.

_____. Sobre uma piroplasmose eqüina observada em São Paulo. **Arquivo da Sociedade de Medicina Cirúrgica de São Paulo**. São Paulo, v. 1, p. 63-66, 1910.

_____. Ueber die hundekran kheit Nambi-uvú und ihren parasiten, *Rangelia vitalii*. **Cent. F. Bakt. Orig.**, v. 77, p. 265-271, 1916.

CARRET, C.; WALAS, F.; CARCY, B.; GRANDE, N.; PRECIGOUT, E.; MOUBRI, K.; SCHETTERS, T. P.; GORENFLOT, A. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. **Journal of Eukaryotics Microbiology**, United States, v. 46, n. 3, p. 298-303, 1999.

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

CRIADO-FORNELIO, A.; MARTINEZ-MARCOS, A.; BULING-SARANA, A.; BARBA-CARRETERO, J. C. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe Part I. Epizootiologicas aspects. **Veterinary Parasitology**, United Kingdom, v. 113, p. 189-201, 2003.

_____. Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from southern Europe: a molecular study. **Veterinary Microbiology**, United States, v. 93, n. 4, p. 307-317, 2003.

CRIADO-FORNELIO, A.; GONZALEZ-DEL-RIO, M.A.; BULING-SARANA, A.; BARBA-CARRETERO, J. C. The “expanding universe” of piroplasms. **Veterinary Parasitology**, United Kingdom, v. 119, p. 337-345, 2004.

CUNHA, C. W. DA. **Babesiose equina**: padronização da reação de imunofluorescência para sorodiagnóstico e levantamento epidemiológico em eqüinos puro sangue inglês. 1993. 57p. Dissertação (Mestrado em Parasitologia), Universidade Federal de Pelotas, 1993.

DE WAAL, D. T.; POTGIETER, F. T. The transtadial transmission of *Babesia caballi* by *Rhipicephalus evertsi evertsi*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, South Africa, v. 54, n. 4, p. 655-656, 1987.

_____. The transtadial transmission of *Babesia caballi* by *Rhipicephalus evertsi evertsi*. **Onderstepoort Journal Veterinary Research**, South Africa, v. 54, p. 655-656, 1987.

DA COSTA PEREIRA, M. A. V.; MASSARD, C. L.; FACCINI, J. L. H.; SIQUEIRA, L. F. G. DE. Ocorrência de *B. equi* (Laveran, 1901) e *B. caballi* (Nuttall & Strickland, 1912) em equinos da raça PSI de pequenos estabelecimentos equestres. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, p. 405-409, 2004.

DE WAAL, D. T. Global importance of piroplasmosis. **Journal of Protozoology Research**, Japan, v.10, p. 106-127, 2000.

_____. Equine piroplasmosis: a review. **British Veterinary Journal**, United Kingdom, v. 148, n. 1, p. 6-14, 1992.

_____. The transovarial transmission of *Babesia caballi* by *Hyalomma truncatum*. **Onderstepoort Journal Veterinary Research**, South Africa, v. 57, p. 99-100, 1990.

DONNELLY, J.; JOYNER, L. P.; FRANK, C. Quantitative epidemiological studies on the prevalence of babesiosis in horses in Kuwait. **Tropical Animals Health and Production**, Netherlands, v. 12, n. 4, p. 253-258, 1980.

DONNELLY, J.; JOYNER, L. P.; GRAHAM-JONES, O.; ELLIS, C. P. A comparison of the complement fixation and immunofluorescent antibody tests in a survey of the prevalence of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horses in the Sultanate of Oman. **Tropical Animals Health and Production**, Netherlands, v. 12, n. 1, p. 50-60, 1980.

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

ENIGK, K. Die Überträger der pferdepiroplasmose, ihre verbreitung und biologie. Arch. Wiss. Prakt. Tierheilk., Germany, v. 78, p. 209-240, 1943. In SOULSBY, E. J. L. **Parasitologia Y Enfermidades parasitarias – en los animals domesticos**. 7ª edição. México: Interamericana, 1987. 820p.

_____. Weitere Untersuchungen zur Überträgerfrage der pferdepiroplasmose. Arch. Wiss. Prakt. Tierheilk., v. 79, p. 58-60, 1944. In SOULSBY, E. J. L. **Parasitologia Y Enfermidades parasitarias – en los animals domesticos**. 7ª edição. México: Interamericana, 1987. 820p.

ERSHOV, R. Parasitology and parasitic diseases of livestock. State Publication, House for Agricultural Literature, USSR, P. 388-406, 1956. In SOULSBY, E. J. L. **Parasitologia Y Enfermidades parasitarias – en los animals domesticos**. 7ª edição. México: Interamericana, 1987. 820p.

FELDMAN, B. V.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 5ª edição. Philadelphia (USA): Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 1344p.

FORLANO, M.; SCOFIELD, A.; ELISEI, C.; FERNANDES, K.R.; EWING, S. A.; MASSARD, C. L. Diagnosis of *Hepatozoon* spp. in *Amblyoma ovale* and its experimental transmission in domestic dogs in Brazil. **Veterinary Parasitology**, United States, v. 25, n. 134, p. 1-7, 2005.

FRERICHS, W. M.; HOLBROOK, A. A.; JOHNSON, A. J. Equine piroplasmosis complement fixation titers of horses infected with *Babesia caballi*. **American Journal Veterinary research**, United States, v. 30, p. 697-702, 1969.

FRIEDHOFF, K.T. [Piroplasmas of Horses impact on the international horse trade.] **Berl Munch Tierarztl wochenschr.**, Germany, v. 95, n. 19, p. 368-374, 1982.

- FRIEDHOFF, K. T.; TENTER, A. M.; MÜLLER, F. Hemoparasites of equines: impact on international trade of horse. **Revue Scientifique et Technique Office International epizootie**, France, v. 9, n. 4, p. 1184-1187, 1990.
- GUIMARÃES, A. M.; LIMA, J. D.; RIBEIRO, M. F. B. Sporogony and experimental transmission of *Babesia equi* by *Boophilus microplus*. **Parasitology Research**, Germany, v. 84, p. 323-327, 1998.
- GUIMARÃES, A. M.; LIMA, J. D.; RIBEIRO, M.F. B.; CAMARGOS, E. R. S.; BOZZI, I. A. Ultrastructure of sporogony in *Babesia equi* in salivary glands of adult female *Boophilus microplus* ticks. **Parasitology Research**, Germany, v. 60, p. 69-74, 1998.
- GUIMARÃES, L. M.; ARAÚJO, T. L.; LACERDA JR., P. M. G. DE. Ocorrência de nuttalliose em equinos puro sangue de corrida em São Paulo. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária de São Paulo**, São Paulo, v. 4, p. 357-362, 1950.
- GUMMOW, B.; DE WET, C.S.; DE WAAL, D. T. A sero-epidemiological survey of equine piroplasmiasis in the northern and eastern Cape Provinces of South Africa. **Journal of South African Veterinary Association**, South Africa, v. 67, n. 4, p. 204-208, 1996.
- HIGUCHI, S.; SIMOMURA, S.; YOSHIDA, H.; HOSHI, F.; KAWAMURA, S.; YASUDA, Y. Development of *Babesia gibsoni* in the hemolymph of the vector tick, *Haemaphysalis longicornis*. **Journal Veterinary Medical Science**, Japan, v. 53, n. 3, p. 491-493, 1991.
- HIGUCHI, S.; KURODA, H.; HOSHI, H.; KAWAMURA, S.; YASUDA, Y. Development of *Babesia gibsoni* in the midgut of nymphal stage of the tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Journal Veterinary Medical Science**, Japan, v. 61, n. 6, p. 697-699, 1999.
- HIPOLITO, O.; FREITAS, M. G.; FIGUEIREDO, J. B. **Doenças infecto-contagiosas dos animais domésticos**. 4ª edição. São Paulo: Melhoramentos, 1965. 598p.
- HIRATO, K.; NONOMIYA, N.; UWANO, Y.; KUTH, T. Studies on complement fixation reaction for equine piroplasmiasis In: **Third International Conference on Equine Infections Diseases**, Paris: Proceedings, p. 467-475, 1945.
- HOLBROOK, A. A. Biology of equine piroplasmiasis, **Journal of American Veterinary Medical Association**, United States, v. 155, p. 453-454, 1969.
- IKADAI, H.; NAGAI, A.; XUAN, X.; IGARASHI, I.; TSUGIHIKO, K.; TSUJI, N.; OYAMADA, T.; SUZUKI, N.; FUJISAKI, K. Seroepidemiologic studies on *Babesia caballi* and *Babesia equi* infections in Japan. **Journal Veterinary Medical Science**, Japan, v. 64, n. 4, p. 325-328, 2002.
- JAIN, N. **Essentials of veterinary hematology**. 1ª edição. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417 p.
- KELSER, R. A. A note on equine piroplasmiasis. **Abstract bacteriology**, United States, v. 6, p.21-22, 1922.
- KERBER, C. E.; FERREIRA, F.; PEREIRA, M. C. Controlo f equine piroplasmiasis in endemic countries. In: **World equine veterinary congress**, Padova (Italy), Proceedings, 1997.

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

KLINCKMANN, G. **Sporozoitensabilate von *Babesia equi* aus *Hyalomma anatolicum anatolicum* und *Rhipicephalus turanicus***. Tesis (Doctor degree in Veterinary Medicine) 1981. 215p. School of Veterinary Medicine, Hannover, 1981.

KUTTLER, K. L. World wide impact of babesiosis, p. 1-22. In: RISTIC, M. **Babesiosis of Domestic Animals and Man**. Boca Raton: CRC, Press, 1988. 255p.

LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C. Carrapatos em cães no Brasil. **Clinica Veterinária**, São Paulo, v. 6, n. 30, p. 24-32, 2000.

LAVERAN, A. Contribution à létude de *Piroplasma equi*. **Recueil Medicine Veterinarie**, France, v. 8, p. 380, 1901.

LEVINE, N. D. **Veterinary Protozoology**. Iowa: Iowa State University Press, 1985. 401p.

LINHARES, G. F. L. **Aspectos biológicos e epidemiológicos das babesioses de eqüídeos com ênfase a microrregião de Goiânia, Goiás, Brasil**. 1994. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), 120p. Universidade Federal rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1994.

LITTLEJOHN, A. A. Babesiosis, p. 211-220. In: BONE, J. F.; CATACOTT, E. J.; GABE, A. A.; HOHNSON, L. E.; RILEY, W. F. **Equine medicine and surgery**. 1ª edição. California: American Veterinary Publications, 1963. 420p.

LOBETTI, R. G.; REYERS, F.; NESBIT, J. W. The comparative roles of haemoglobinaemia and hypoxia in the development of canine babesial nephropaty. **Journal of South Africa Veterinary Association**, South Africa, v. 67, n. 4: 188-198, 1996.

LORETTI, A. P.; BARROS, S. S. Hemorrhagic disease in dogs infected with na unclassified intraendothelial piroplasm in sothern Brazil. **Veterinary Parasitology**, United States, v. 134, n. 3-4, p. 193-213, 2005.

MASSARD, C. A. **Hepatozoon canis (James, 1905) (Adeleida: Hepatozoidae) cães do Brasil, com uma revisão do gênero em membros da ordem carnívora**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). 1979. 121p. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, 1979.

MASSARD, C. L. **Comunicação pessoal**. Seropédica, 2006.

MAURER, F. D. Equine piroplasmosis: another emergency disease. **Journal American veterinary medicine association**, United States, v. 141, n. 2, p.669705, 1962.

MCGUIRE, T. C.; VAN HOOSIER, G. L.; HENSON, J. B. The complement fixation reation in equine infectious anemia: demonstration of inhibition by IgG(T). **The Journal of Immunology**, United States, v. 107, n.6, p. 1738-1744, 1971.

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

_____. Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein, 1998. **Parasitology research**, Germany, v. 84, n. 6, p. 467-475, 1998.

MOLTMANN, Y. G.; MEHLHORN, H.; SCHEIN, G.; VOIGT, W. P.; ZWEYFARTH, E. *Babesia equi* (Laveran, 1901). 1. Development in horses and in lymphocyte culture. **Zeitschrift der tropenmedizin und parasitologie**, Germany, v. 32, p. 223-227, 1983.

MOREIRA, J. O Nambiuvú. **Biologico**, São Paulo, v.. 5, n. 6, p. 113-116. 1939.

_____. Sobre a natureza do Nambiuvú dos cães. **Arquivos do instituto Biológico**, São Paulo, v. 9, p. 315-319, 1938.

MUHLNICKEL, C. J.; JEFFERIES, R.; RYAN, U. M.; IRWIN, P. J. *Babesia gibsoni* infection in three dogs in Victoria. **Australian Veterinary Journal**, Australy, v. 80, p. 606-610, 2002.

MUJICA, F. F. *Babesia caballi* (Nuttall & Strickland, 1912): Patogenia, transmissão e alterações hemocitárias no carrapato *Anocentor nitens* (Neumann, 1867), vetor biológico nas Américas. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). 2002. 80p. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2002.

NAGORE, D.; GARCIA-SANMARTIN, J.; GARCI-PEREZ, A. L.; JUSTE, R. A.; HURTADO, A. Detection and identification of equine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blotting: epidemiological survey and phylogenetic analysis. **Veterinary Parasitology**, United Kingdom, v. 123, n. 1-2, p. 41-54, 2004.

NEITZ, W. O.; BOUGHTON, F.; WALTERS, H. S. Laboratory investigations on the life-cycle of the Karoo paralysis tick (*Ixodes rubicundus* Neumann, 1904). **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, South Africa, v. 38, n.3, p. 215-223, 1971.

NEITZ, W. O. A consolidation of our knowledge of the transmission of tick-borne diseases. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, South Africa, v. 27, n.2, p. 115-163, 1956b.

_____. Classification, transmtion and biology of piroplasms of domestic animals. **Annual New York Academic Science**, United States, v. 64, n. 2, p. 56-111, 1956a.

NUTTALL, G. H. F.; STRICKLAND, C. On the occurrence of two species of parasites in equine "Piroplasmosis" or "Biliary Fever". **Parasitology**, United Kingdom, v. 5, n.1, p. 65-83, 1912.

O'DWYER, L. H.; MASSARD, C. L.; PERIRA DE SOUZA, J. C. *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, Seropédica, v. 94, n. 3, p. 143-150, 2001.

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

PARAENSE, W. L. Verificação da existência de uma fase negativa do snague no período prepatente da babesiose canina transmitida por carrapatos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 3-4, p.367-373, 1979.

- PATTON, W. S. Preliminary report on a new piroplasm (*Piroplasma gibsoni* sp. Nov.) found in the blood of the hounds of the Madras Hunt and subsequently discovered in the blood of the jackals *Canis aureus*. **Bulletin of Society Exotical Pathologies**, United Kingdom, v. 3, p. 274-280, 1910.
- PEREIRA, M. A. V. C. **Situação do parasitismo por *Babesia equi* (Laveran, 1901) e *Babesia caballi* (Nuttall & Strickland, 1912) em eqüinos da raça PSI, nos diferentes sistemas de manejo, no Estado do Rio de Janeiro**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). 1999. 96p. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, 1999.
- PESTANA, B. R. O nambyuvú. **Revista médica de São Paulo**, São Paulo, v. 22, p. 423-426, 1910.
- PFEIFER BARBOSA, I.; BOSE, R.; PEYMANN, B.; FREIDHOFF, K. T. Epidemiologic aspects of equine babesiosis in a herd of horse in Brazil. **Veterinary Parasitology**, United Kingdom, v. 58, p. 1-8, 1995.
- PFEIFER, I. B.; FRIEDHOFF, K. T.; MASSARD, C. L.; LINHARES, G. F. C. Diagnosis of natural infection with *Babesia caballi* (Nuttall & Strickland, 1910) in horses and *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) in Itaguaí, Rio de Janeiro, Brazil. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Seropédica, v. 15, p. 105-107, 1992.
- PURNELL, R. E.; BROCKLESBY, D. W.; KITCHENHAM, B.A.; YOUNG, E. R. A statistical comparison of the behaviour of five British isolates of *Babesia divergens* in splenectomized calves. **Journal of Comparative Pathology**, United Kingdom, v. 86, n. 4, p. 609-614, 1979.
- PURNELL, R. E. Babesiosis in various hosts. In: RISTIC, M.; KREIER, J. P. (eds), **Babesiosis**. 1ª edição. New York: Academic Press, p. 105-107. 1981.
- REZENDE, H. E. R. Sobre a validade de *Rangelia vitalii* (Pestana, 1910), hemoparasito dos cães no Estado do Rio de Janeiro. In: **XV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, 1976.
- RIBEIRO, M. F. B.; LIMA, J. D. Diagnóstico sorológico da babesiose eqüina por *Babesia equi* em Minas Gerais. In: **VI Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, Bagé: Anais, 1989, p. 111.
- RISTIC, M.; SIBINOVIC, S. Equine Babesiosis: diagnosis by a precipitation in gel and by a one-step fluorescent antibody-inhibition test. **American journal of veterinary research**, United States, v. 25, p. 1519-1526, 1964.
- RISTIC, M. Equine babesiosis and trypanosomiasis. In: **International symposium equine haematological**, Michigan, 1985.
- ROBY, T. O.; ANTHONY, D. W. The transmission of equine piroplasmosis by the tropical horse tick, *Dermacentor nitens* Neumann. **Journal of the American veterinary medical association**, United States, v. 142, p. 768-769, 1963.
- ROITT, I. M. **Essential Immunology**. 5ª edição. São Paulo: Editora Atheneu, 1998, 294p.
- RUDOLPH, W. Piroplasmosis em caballos de carrera de Chile. **Boletín chileno de parasitología**, Chile, v. 26, p. 66-68, 1971.
- RUDOLPH, W.; CORREA, J.; ZURITA, L.; MANLEY, W. Equine piroplasmosis: leukocytic response to *Babesia equi* (Laveran, 1901) infection in Chile. **British Veterinary Journal**, United Kingdom, v. 131, p. 601-601, 1975.

SCHEIN, E. Equine babesiosis. In: RISTIC, M (Editor) **Babesiosis** of domestic animals and man. Boca Raton: CRS, 1988, p. 197-208.

SHEIN, E. REHBEIN, G.; VOIGT, W. P.; ZWEYGART, E. *Babesia equi* (Laveran, 1901). I. Development in horses and lymphocyte culture. **Tropenmedizin Parasitology**, Germany, v. 32, p. 223-227, 1981.

SCHETTERS, T. P.; KLEUSKENS, J. A.; SCHOLTES, N. C.; PASMAN, J. W.; GOOVAERTS, D. Vaccination of dogs against *Babesia canis* infection. **Veterinary Parasitology**, United States, v. 73, n.1-2, p. 41, 1997.

SHAW, S. E.; DAY, M. J.; BREITSCHWERDT, E. B. Tick-borne infectious diseases of dogs. **Trends in Parasitology**, United Kingdom, v. 17, p. 74-80, 2001.

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

SILVA, G. V. O. **Caracterização de uma área enzoótica peri-urbana no Estado do Rio de Janeiro com avaliação de aspectos hematológicos e bioquímicos séricos e revisão bibliográfica sobre babesiose equina no continente americano.** 2002. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). 49p. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2002.

SIMPSON, C. F.; NEAL, F. C. Ultrastructure of *Babesia equi* in ponies treated with imidocarb. **American journal of veterinary research**, United States, v. 41, n. 2, p. 267-271, 1980.

SIMPSON, C. F.; KIRKHAM, W. W.; KLING, J. M. Comparative morphologic features of *Babesia caballi* and *Babesia equi*. **American journal of veterinary research**, United States, v. 28, n. 127, p. 1623-1627, 1967.

SIPPEL, W. L.; COOPERRIDER, D. E.; GAINER, J. H.; ALLEN, R. W.; MOUW, J. E. B.; TIGLAND, M. B. Equine piroplasmiasis in the United States. **Journal American of veterinary medicine association**, United States, v. 141, p. 694-698, 1962.

SIQUEIRA, F. G. **Comunicação Pessoal.** Rio de Janeiro, 1997.

SOULE, C.; PERRET, C.; DORCHIES, P. Babesiose equine a *Babesia equi*: comparaison des techniques de fixation du complément d'immunofluorescence indirecte et d'ELISA. **Revue de Médecine Veterinaire**, France, v. 135, n. 7, p. 419-427, 1984

SOULSBY, E. J. L. **Parasitologia y enfermedades parasitarias – en los animales domésticos.** 7ª edição. México: Interamericana, 1987. 820p.

STILLER, K.; COAN, M. E. Recent developments in elucidating tick vector relationships for anaplasmosis and equine piroplasmiasis. **Veterinary Parasitology**, United States, v. 57, p. 97-108, 1995.

TABOADA, J.; MERCHANT, S. R. Babesiosis of companion animals and man. **Veterinary Clinician North America Small Animal Practices**, United States, v. 21, p. 103-123, 1991.

TAYLOR, W. M.; BRYANT, J. E.; ANDERSON, J. B.; SILLERS, K. H. Equine piroplasmiasis in the United States: a review. **Journal American veterinary medicine association**, United States, v. 155, n.6, p. 915-919, 1969.

- TENTER, A. M. **Serodiagnose experimenteller und natürlicher piroplasmeninfektionen der pferde**. 1984. Dissertation (Master in Veterinary Medicine). School Veterinary Medicine, Hannover, 1984.
- TENTER, A. M. J.; OTTE, M. J.; GONZALEZ, C. A.; ABUABARA, Y. Prevalence of piroplasmosis in equines in the Colombian province of Córdoba. **Tropical Annual Health Production**, Netherlands, v. 29, p. 93-98, 1988.
- TENTER, A. M.; FRIEDHOFF, K. T. Serodiagnosis of experimental and natural *Babesia equi* and *B. caballi* infections. **Veterinary Parasitology**, United Kingdom, v. 21, n. 2, p. 139+, 1986.
- THOMPSON, P. H. Ticks as vectors of equine piroplasmosis. **Journal American veterinary medicine association**, United States, v. 155, n. 2, p. 454-457, 1969.
- UILENBERG, G.; FRANSSEN, F. F.; PERIE, N. M.; SPANJER, A. A. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. **Vet Q.** v. 11, n. 1, p. 33-40, 1989.
- UILENBERG, G., THIAUCOURT, F.; JONGEJAN, F. On molecular taxonomy: what is in a name: **Experimental and applied Acarology**, United Kingdom, v. 32, n. 4, p. 301-312, 2004.
- URCELAY, S.; CORREA, J.; RUDOLPH, W. Piroplasmosis en caballos de carrera. Estudio serológico Y criaderos de la Provincia de Santiago. **Boletin Chileno de Parasitologia**, Chile, v. 28, p. 6-9, 1973.
- WEILAND, G. Species-specific serodiagnosis of equine piroplasma infections by means of complement fixation test (CFT), immunofluorescence (IIF) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISaa). **Veterinary Parasitology**, United States, v. 20, p. 43-48, 1986.
- WENYON, C. M. **Protozoology**. London: Bailliere, Tindal and Cox, p. 1011-1022, 1926.
- XU, Y.; ZHANG, S.; HUANG, X.; BAYIN, C.; XUAN, X.; IGARASHI, I.; FUJISAKI, K.; KABEYA, H.; MARUYAMA, S.; MIKAMI, T. Seroepidemiologic studies on *Babesia equi* and *Babesia caballi* infections in horses in Jilin province of China. **Journal of Veterinary Medicine and Science**, Japan, v. 65, n. 9, p. 1015-1017, 2003.
- XUAN, X.; CHAHAN, B.; HUANG, X.; YOKOYAMA, N.; MAKALA, L. H.; IGARASHI, I.; FUJISAKI, K.; MARUYAMA, S.; SAKAI, T.; MIDAMI, T. Diagnosis of equine piroplasmosis in Xinjiang province of China by the enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigens. **Veterinary Parasitology**, United Kingdom, v. 108, n. 2, p. 179-182, 2002.
- YAMANE, I.; CONRAD, P.; GARDNER, I. *Babesia gibsoni* infections in dogs. **Journal of Protozoology Research**, United States, v.3, p. 111-125, 1993a.
- YAMANE, I.; THOMFORD, J. W.; GARDNER, I. A.; DUBEY, J. P.; LEVY, J. P.; CONRAD, P. A. Evaluation of indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Babesia gibsoni* infections in dogs. **American journal of veterinary research**, United States, v. 54, p. 1579, 1584, 1993b.
- ZAHLER, M.; RINDER, H.; SCHEIN, E.; GOTHE, R. Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. **Veterinary Parasitology**, United Kingdom, v. 89, p. 241-248, 2000a.

ZAHLER, M.; RINDER, H.; ZWEIGARTH, E.; FUKATA, T.; MAEDE, Y.; SCHEIN, E.; GOTHE, R. "*Babesia gibsoni*" of dogs from North America and Asia belong to different species. **Parasitology**, Germany, v. 120, p. 365-369, 2000b.

ZAUGG, J. L.; LANE, V. M. Efficacy of buparvaquone as a therapeutic and clearing agent of *Babesia equi* of European origin in horses. **American journal of Veterinary research**, United States, v. 53, n. 8, p. 1396-1399, 1992.