



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VETERINÁRIA**

**“ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E HUMORAIS DE EQÜINOS
EXPOSTOS À INFECÇÃO POR *Babesia equi*, NA REGIÃO SUL DO
RIO GRANDE DO SUL”**

LEANDRO QUINTANA NIZOLI

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação do Prof. Carlos Eduardo Wayne Nogueira, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Área de Concentração: Sanidade Animal, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

**PELOTAS
Rio Grande do Sul - Brasil
Fevereiro de 2005**



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VETERINÁRIA**

**“ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E HUMORAIS DE EQÜINOS
EXPOSTOS À INFECÇÃO POR *Babesia equi*, NA REGIÃO SUL DO
RIO GRANDE DO SUL”**

LEANDRO QUINTANA NIZOLI

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação do Prof. Carlos Eduardo Wayne Nogueira, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Área de Concentração: Sanidade Animal, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

**PELOTAS
Rio Grande do Sul - Brasil
Fevereiro de 2005**

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

N 737a Nizoli, Leandro Quintana

Alterações hematológicas e humorais de eqüinos expostos à infecção por *Babesia equi*, na região sul do Rio Grande do Sul / Leandro Quintana Nizoli ; orientador Carlos Eduardo Wayne Nogueira ;co-orientador Sergio Silva da Silva . – Pelotas, 2005. – 39 f. : il. Dissertação (Mestrado). Sanidade Animal. Faculdade de Veterinária. Universidade Federal de Pelotas,. Pelotas, 2005.

1. Equino 2. Babesiose equina 3. *Babesia equi* 4. PCR. 5. RIFI 6. Incidência I .Nogueira, Carlos Eduardo W. (orientador)
II .Título.

CDD 636.082 41

LEANDRO QUINTANA NIZOLI

**“ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E HUMORAIS DE EQÜINOS
EXPOSTOS À INFECÇÃO POR *Babesia equi*, NA REGIÃO SUL DO
RIO GRANDE DO SUL”**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação do Prof. Carlos Eduardo Wayne Nogueira, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Área de Concentração: Sanidade Animal, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado: 18 de fevereiro de 2005.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Wayne Nogueira
(Orientador)

Prof. Dr. Odilon Vidotto

Prof^a. Dr^a. Maria Elisabeth Aires Berne

Prof. Dr. Odir Dellagostin

*“À minha filha Luiza com
muito amor e carinho”*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Volnei e Elizabete por terem me apoiado e incentivado a seguir com a realização deste projeto.

A esposa Catia, pelo apoio, companherismo e compreensão.

Aos familiares e amigos que sempre incentivaram e apoiaram a realização deste trabalho.

Ao professor Sergio Silva pela grande amizade, conhecimentos transmitidos e pelo estímulo à vida acadêmica.

Ao professor Carlos Nogueira pelo apoio à pesquisa e orientação para a realização desta dissertação.

A todos professores e colegas do Curso de Pós-Graduação.

Ao haras onde foi realizado o experimento.

Aos estagiários Igor, Mateus e Paula pela ajuda na coleta e processamento das amostras.

Ao colega Leandro Centeno pela amizade e esforço na seleção dos animais experimentais.

Ao amigo Daniel Dutra pela ajuda na cirurgia dos animais experimentais.

Ao laboratorista Eduardo Krause pela ajuda no processamento das amostras.

Ao Prof. Daniel Passos pelo suporte para a realização dos testes de PCR.

A Dra. Cristina Cunha por seus esclarecimentos e ajuda na elaboração deste projeto.

A toda direção e funcionários da Faculdade de Veterinária.

A todos de que de uma forma ou outra tenha colaborado e apoiado com a realização deste trabalho.

Obrigado a todos!!!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo geral.....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Etiologia	4
3.2. Patogenia.....	5
3.3. Ciclo.....	7
3.4. Epidemiologia	7
3.5. Resposta Imune.....	8
3.6. Tratamento	9
3.7. Diagnóstico	10
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1. Obtenção de antígeno de <i>B. equi</i>	13
4.1.2. Esplenectomia	13
4.1.3. Infecção experimental de potros com <i>B. equi</i>	14
4.1.4. Preparo do antígeno	14
4.2. Avaliação de <i>B. equi</i> em eqüinos naturalmente infectados em área endêmica	15
4.2.1. Local e duração do experimento.....	15
4.2.2. Grupos experimentais.....	15
4.2.3. Avaliação clínica e hematológica.....	16
4.2.4. Avaliação sorológica.....	16
4.2.5. Reação de nested-PCR.....	16
4.4. Análise Estatística	17
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18

5.1. Obtenção de antígenos parasitários de <i>B. equi</i>	18
5.2. Prevalência de eqüinos reagentes à <i>B. equi</i>	21
5.3. Incidência da infecção na propriedade	24
5.4. Dinâmica de anticorpos em animais soropositivos.....	25
5.5. Alterações hematológicas em eqüinos naturalmente infectados e sadios	26
5.6. Resultados da técnica de PCR e a RIFI	28
CONCLUSÕES.....	30
REFERÊNCIAS	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Seqüência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados no nested-PCR.....	17
Tabela 2 - Reprodução experimental do isolado UFPel-E15 de <i>B. equi</i> em eqüinos esplenectomizados.	18
Tabela 3 - Prevalência de anticorpos anti- <i>B. equi</i> , em eqüinos PSI e RC de diferentes categorias, pela reação de imunofluorescência indireta, em um haras no Rio Grande do Sul, em fevereiro de 2002.....	22
Tabela 4 - Freqüência absoluta e relativa de títulos soropositivos para <i>B. equi</i> , pela reação de imunofluorescência indireta, em fevereiro de 2002.	23
Tabela 5 - Análise estatística do diferencial de leucócitos, hematócritos e PPT, de eqüinos naturalmente infectados.	27
Tabela 6 – Resultados das técnicas de nested-PCR e RIFI para diagnóstico de <i>B. equi</i> , em outubro de 2001.....	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Temperatura, volume globular e parasitemia do potro E23, esplenectomizado e infectado experimentalmente com cepa de <i>B. equi</i> criopreservada.	19
Figura 2 - Temperatura, volume globular e parasitemia do potro E24, esplenectomizado e infectado experimentalmente com cepa de <i>B. equi</i> a fresco.	19
Figura 3 – Potro E23: Achados <i>pós-mortem</i> aos 14 DAI experimental com <i>B. equi</i> : A - Mucosa ocular ictérica; B - Carcaça e órgãos abdominais ictéricos.	20
Figura 4 – Hemácias parasitados por <i>B. equi</i> (seta lilás: forma anelar; seta verde: forma “Cruz de Malta”), presente em esfregaços sangüíneos de eqüinos infectados experimentalmente.	21
Figura 5 - Distribuição da freqüência de títulos de anticorpos anti- <i>B. equi</i> em eqüinos positivos pela RIFI de um haras no Rio Grande do Sul, em fevereiro de 2002.	23
Figura 6 – Esfregaço corado por Giemsa, mostrando hemácias parasitados por <i>B. equi</i> , em potro neonato.	25
Figura 7 - Curva de anticorpos anti- <i>B. equi</i> durante o período de um ano em éguas PSI e eqüinos RC, em um haras no Rio Grande do Sul, de setembro de 2001 a agosto de 2002.	25
Figura 8 – Curva de hematócrito em eqüinos livres e portadores de <i>B. equi</i> , durante 12 meses em éguas PSI e em eqüinos RC.	27

RESUMO

NIZOLI, LEANDRO Q. Universidade Federal de Pelotas, fevereiro de 2005. **Alterações hematológicas e humorais de eqüinos expostos à infecção por *Babesia equi*, na região sul do Rio Grande do Sul.** Orientador: Carlos Eduardo Wayne Nogueira.

A babesiose eqüina é uma das principais enfermidades parasitárias dos eqüinos, que causa grandes danos à sanidade animal. A doença é uma hemoparasitose, causada por *Babesia equi*, que por infectar e destruir hemáceas, causa comprometimento da função eqüina levando à perda de vitalidade e decréscimo de rendimento nos animais infectados. Este trabalho teve como objetivo, fazer a avaliação hematológica e humoral em eqüinos infectados por *Babesia equi*. Foram acompanhados 93 éguas de cria da Raça Puro Sangue Inglês de Corrida (PSI), 52 potros da Raça Puro Sangue Inglês de Corrida (PSI) e 20 eqüinos da Raça Crioula (RC). As coletas de sangue foram realizadas mensalmente durante 12 meses para realização de exames laboratoriais, visando estabelecer: a soroprevalência de animais reagentes a *B. equi*; incidência da infecção na propriedade; dinâmica de anticorpos anti-*B. equi* em eqüinos portadores da infecção; relacionar alterações hematológicas celulares em eqüinos infectados e sadios; e determinar a infecção por *B. equi*, pela técnica de PCR. Foram esplenectomizados potros livres da infecção para obtenção de altas parasitemias e produção de antígenos para prova sorológica de RIFI. A sorologia revelou positividade variável entre as categorias estudadas; e a ocorrência de um neonato com infecção pré-natal e sintomatologia condizente, a partir da mãe persistentemente infectada. As alterações dos níveis de anticorpos, contagem diferencial de leucócitos, hematócrito e proteína plasmática total não revelaram nenhuma variação estatisticamente significativa. A detecção de *B. equi* por PCR e RIFI foram capazes de demonstrar o estado de portador em animais persistentemente infectados.

ABSTRACT

NIZOLI, LEANDRO Q. Universidade Federal de Pelotas, fevereiro de 2005. **Humoral and hematological changes in equines exposed to infection by *Babesia equi*, in the southern regions of Rio Grande do Sul state, Brazil.** Advisers: Carlos Eduardo Wayne Nogueira.

The equine babesiosis is one of the most important parasitic disease of the equines, it causes great damage to animal health. The disease is a haemoparasitosis caused by *Babesia equi*. Through infecting and destroying red blood cells, it can compromise the equine function, leading to loss of vitality and decrease in the performance of infected animals. The purpose of this work was the evaluation of humoral and hematological characteristics of carrier animals. A group of 93 thoroughbred mares, 52 thoroughbred foals and 20 Crioulo horses were analyzed. Blood samples were taken once a month during twelve months for laboratorial examination, to determine: the prevalence of *B. equi* seropositive animals using IFAT; the infection incidence in the property; dynamics of antibodies anti-*B. equi* in carrier animals; the white and red blood cell changes in infected and healthy equines and the infection by *B. equi* using the PCR technique. Infection free foals were splenectomized and infected with *B. equi* stabilate to obtain high parasitaemias and production of the antigen for the IFAT. Different levels of positivity were detected by IFAT among the studied categories; and the occurrence of one newborn with prenatal infection and typical symptomatology, from a persistently infected mother. Antibody levels, differential counts for leucocytes, packed cell volume and total plasmatic protein value did not reveal significant statistic variation. Both PCR and IFAT were able to demonstrate the carrier state in persistently infected animals.

1. INTRODUÇÃO

A babesiose tem sido citada como a principal parasitose eqüina devido aos danos diretos como as perdas de performance e mortalidade além de danos indiretos como o impedimento para comercialização e principalmente exportação (FRIEDHOFF et al., 1990). A doença é causada por dois agentes etiológicos classificados como hematozoários do gênero *Babesia*: *B. equi* e *B. caballi*, tendo como vetores de transmissão os carrapatos, mas podem também ser transmitidas por agulhas contaminadas com sangue de animais portadores, picadas de moscas ou mosquitos (KNOWLES & UNISS-FLOID, 1983; BRUNNING, 1996). A doença caracteriza-se por apresentar uma forma aguda, com o desenvolvimento de anemia hemolítica progressiva, e uma forma crônica na qual os animais tornam-se portadores muitas vezes assintomáticos (KNOWLES et al., 1980). Em situações imunossupressivas como restrição alimentar e uso de corticosteróides, a reagudização da doença é favorecida e os eqüinos podem apresentar diferentes graus de anemia, com agravamento dos sinais clínicos (NOGUEIRA et al., 2004). Em cavalos atletas, a *B. equi* tem se constituído no principal patógeno relacionado a babesiose, já que o estresse provocado pelos treinamentos induz ao aumento da parasitemia em animais com infecções latentes, pois o baço pode abrigar eritrócitos parasitados bem como parasitas livres em número elevado (ZWART & BROCKLESBY, 1979). Nos períodos de treinamento o baço se contrai liberando uma grande quantidade de eritrócitos, plaquetas e leucócitos para a circulação (SMITH et al., 1989), resultando em estados anemiantes que diminuem o rendimento dos animais (IBANÉZ et al., 1979; OLADOSU, 1988; CUNHA et al., 1997). Nestes casos, o diagnóstico da infecção por este parasita é essencial no manejo adequado dos animais para uma melhor performance atlética. A alta resistência da *B. equi* à ação das drogas tem representado um problema complexo e contraditório já que a

toxicidade dos protocolos de tratamento produz graves seqüelas nos animais tratados (RIBAS et al., 2003)

A técnica laboratorial mais utilizada para detecção da infecção era a visualização microscópica dos parasitos em esfregaços sangüíneos corados. Devido à baixa sensibilidade deste método, testes imunológicos indiretos têm sido incorporados com sucesso na rotina de laboratórios veterinários. Entre estes testes destaca-se a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), descrita pela primeira vez para o diagnóstico sorológico de *B. equi* por Callow et al. (1979). Recentemente, o diagnóstico direto através da técnica baseada na reação em cadeia da polimerase (PCR) vem sendo proposta pois permite a detecção do DNA de *B. equi* com maior sensibilidade, especificidade e rapidez (NICOLAIEWSKY et al., 2001; BATTSETSEG et al., 2002). A produção de antígenos para reações sorológicas tem sido descrita a partir da multiplicação de *B. equi* em potros esplenectomizados com altas parasitemias. Antígenos parasitários nativos obtidos de eritrócitos infectados são largamente utilizados para a detecção de anticorpos em animais portadores de infecção aguda e crônica. As provas sorológicas se constituem em importantes ferramentas para acompanhamento de casos clínicos e estudos epidemiológicos da infecção.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliação hematológica e humoral em eqüinos infectados por *Babesia equi*.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar a soroprevalência de eqüinos PSI e de eqüinos da Raça Crioula reagentes à *B. equi*, em um haras no Rio Grande do Sul;
- Determinar a incidência da infecção por *B. equi* em uma propriedade em área endêmica;
- Avaliar a dinâmica de anticorpos anti-*B. equi* em eqüinos naturalmente expostos à infecção;
- Relacionar alterações hematológicas celulares em eqüinos infectados e sadios;
- Determinar a infecção por *B. equi*, pela técnica de PCR e detecção de anticorpos anti-*B. equi* através da RIFI.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A babesiose é considerada uma das principais doenças parasitárias em cavalos, com grande impacto econômico na indústria eqüina. As perdas associadas à infecções por *B. equi* estão relacionadas tanto aos fatores clínicos como à restrição ao trânsito internacional de animais soropositivos (FRIEDHOFF et al., 1990). Nos Estados Unidos, Canadá, Austrália e Japão, assim como em alguns países da Europa e América Latina, onde o parasito não ocorre de forma endêmica, são mantidas rigorosas medidas de controle que impedem a entrada de animais soropositivos (SCHEIN, 1988; POSNETT et al., 1991; IKADAI et al., 2002). Na maioria destes países, apesar da doença ser considerada exótica, o risco de se tornar endêmica é constante devido à existência dos carrapatos vetores. Sabe-se ainda que animais após a fase aguda da doença tornam-se portadores, sem sinais de infecção exceto pela presença de anticorpos e ocasionalmente pela visualização do protozoário no sangue periférico por microscopia eletrônica no esfregaço em lâmina corada, também um fator que dificulta seu controle. Estes animais portadores representam um potencial contínuo na transmissão da doença. Portanto, além dos testes sorológicos, medidas de controle muitas vezes incluem quarentena e controle de carrapatos. Estes procedimentos, além de extremamente dispendiosos, afetam negativamente o mercado internacional de eqüinos e a participação em competições eqüestres no exterior.

3.1. Etiologia

A babesiose eqüina pode ser causada por dois protozoários distintos, *Babesia equi* (Laveran, 1901) e *Babesia caballi* (Nuttall e Strickland, 1912) que são transmitidas naturalmente através de carrapatos, sendo que os eqüídeos podem ser

parasitados por uma ou ambas espécies de *Babesia*. Os ácaros causadores desta doença são parasitos e transmissores de doenças para o homem e para os animais domésticos. Pertencem à subordem Ixodides e à família *Ixodidae* e são vulgarmente conhecidos como carrapatos, com 14 espécies nos gêneros *Dermacentor*, *Rhipicephalus* e *Hyalomma* identificados como vetores de uma ou ambas, *B. equi* e *B. caballi*.

As espécies de *Babesia* que parasitam eqüídeos situam-se dentro de dois grandes grupos, as “grandes babesias”, com comprimento médio superior a 3µm, *B. caballi* e as “pequenas babesias”, com comprimento médio inferior a 3µm, *B. equi*. No gênero *Babesia* os trofozoítos se multiplicam nos eritrócitos por fissão binária, formando pares, ou por esquizogonia, formando tétrades (HOLBROOK et al., 1968). No entanto, as descobertas a respeito do ciclo de vida desse parasito, como multiplicação em linfócitos e ausência de transmissão transovariana nos carrapatos vetores (SCHEIN, 1988), sugerem que *B. equi* não seja uma espécie clássica e, desde então, sua taxonomia tem sido questionada. Considerando similaridades do parasito com organismos da família *Theileriidae*, a reclassificação de *B. equi* como *Theileria equi* tem sido proposta (MEHLHORN & SCHEIN, 1998). Entretanto, estudos filogenéticos, utilizando RNA ribossomal e proteínas de superfície de parasitos de ambas famílias, indicam que *B. equi* pode representar um terceiro grupo, diferente de *Babesia* e de *Theileria* (ALLSOPP et al., 1994; KATZER et al., 1998).

3.2. Patogenia

A infecção por *B. equi* causa uma doença conhecida como nutaliose ou piroplasmose eqüina. Infecções por *B. caballi* também causam babesiose eqüina, porém os dois agentes são bastante diferentes e determinam manifestações da doença também distintas. As infecções causadas por *B. equi* caracterizam-se pelo desenvolvimento de anemia hemolítica progressiva nos animais infectados, sendo a patogenia da enfermidade determinada principalmente pela lise de eritrócitos durante a invasão e multiplicação do parasito (SINGH et al., 1980; AMBAWAT et al., 1999). Durante a fase crônica não há alteração significativa entre o hematócrito de eqüinos não infectados e de portadores de *B. equi* (HAILAT et al., 1997). Quando

equínos suscetíveis são infectados desenvolvem a fase aguda da doença (SCHALM, 1975; JAIN, 1993), a qual cursa com febre, anemia, petéquias de mucosas, hemoglobinúria e icterícia (DE WAAL et al., 1988; OLADASU & OLUFEMI, 1992; SENGUPTA et al., 1999). A gravidade da doença neste estágio depende da patogenicidade da cepa, dose do inóculo e condição imunológica do animal (HOLBROOK et al., 1972 apud IBANÉZ, 1974; GUIMARÃES et al., 1997). A mortalidade em infecções por *B. equi* é baixa, em geral os animais recuperam-se da fase aguda da doença e permanecem como portadores do parasita. Durante a fase crônica da infecção, sinais clínicos inespecíficos como inapetência, perda de peso e queda no desempenho físico e reprodutivo são comuns (SCHEIN, 1988). Observações de casos de babesiose congênita, sugeriram haver transmissão transplacentária (DONATIEN et al., 1924; GUIMARÃES et al., 1954). Somado a ocorrência de fetos abortados com icterícia e estado de anemia, ou potros prematuros e aqueles a termo que nascem doentes, mostrando sintomas como icterícia, anemia, prostração e relutância a amamentação (DU PLESSIS, 1966).

Em condições experimentais, envolvendo cavalos infectados por *B. equi*, esplenectomizados e com baço *in situ*, o período pré-patente da enfermidade mostra-se curto (MAHONEY et al., 1977; KUTTLER et al., 1986; DE WAAL et al., 1988). Com a utilização de inóculo criopreservado, os hematozoários sofrem considerável queda de metabolismo, dificuldade de reprodução e grande mortalidade (GUGLIELMONE et al., 1989, 1991 apud SACCO et al., 2001).

As alterações histológicas mais comumente encontradas são necrose centro lobular no fígado, hematopoiese extramedular e congestão hepática; hemorragia focal e congestão vascular ao nível de sistema nervoso central, o pulmão também com congestão e áreas de atelectasia e nos rins lesões degenerativas (GAUTAM & DWIVEDI, 1976; MAHONEY et al., 1977).

Em casos de imunossupressão a reagudização da doença é favorecida e os animais podem apresentar diferentes graus de anemia, com agravamento dos sinais clínicos (OLADOSU, 1988; CUNHA et al., 1997).

3.3. Ciclo

O ciclo de *B. equi* em eqüinos inicia com a inoculação de esporozoítos junto com a saliva dos carrapatos vetores. Os esporozoítos inicialmente invadem linfócitos, onde desenvolvem macro e micro esquizontes que originam merozoítos, os quais invadem eritrócitos (SCHEIN et al., 1981; FRIEDHOFF, 1990). Nos eritrócitos os parasitos dividem-se sucessivamente por fissão binária, originando organismos piriformes que muitas vezes aparecem formando uma estrutura conhecida como “Cruz de Malta”, típica de *B. equi*.

Os merozoítos são então ingeridos pelos carrapatos, onde o ciclo tem continuidade através de reprodução sexuada no intestino e posteriormente, esporogonia nas glândulas salivares. Até então, somente transmissão transestadial foi demonstrada em *B. equi* (MEHLHORN & SCHEIN, 1998). Não ocorrendo transmissão transovariana, o ciclo do parasito no carrapato é limitado a uma geração, fazendo com que eqüinos portadores sejam o reservatório da infecção e os principais responsáveis pela manutenção de uma área endêmica (FRIEDHOFF, 1990).

3.4. Epidemiologia

O parasita está mundialmente distribuído em regiões tropicais e subtropicais, sendo sua prevalência diretamente relacionada à distribuição de carrapatos capazes de transmissão de *Babesia* (FRIEDHOFF & SOULE, 1996). É estimado que 90% da população mundial de eqüinos está exposta à *B. equi*, ainda que em alguns países a infecção não ocorra de forma endêmica (FRIEDHOFF et al., 1990). Altas prevalências de *B. equi* têm sido associadas com a criação conjunta de eqüinos e bovinos (KERBER et al., 1999; HEUCHERT et al., 1999). Esta relação sugere que, pelo menos no Brasil, o *Boophilus microplus*, principal carrapato de bovinos e em muitas áreas o único encontrado também em eqüinos, desempenhando um papel importante na transmissão de *B. equi*. (FRIEDHOFF, 1988; KNOWLES, Jr. et al., 1992; STILLER & COAN, 1995; GUIMARÃES et al., 1998^{a,b}; STILLER et al., 2002).

A doença caracteriza-se por apresentar uma forma aguda com o desenvolvimento de anemia hemolítica progressiva e uma forma crônica na qual os animais tornam-se portadores muitas vezes assintomáticos (KNOWLES et al., 1980).

Mundialmente as prevalências da infecção por *B. equi* chega a 40% na China e na Mongólia uma prevalência média de 72,8%, em ambos utilizando antígenos recombinantes em testes de ELISA (XUAN et al., 2002; BOLDBAATAR, et al., 2005). Em Israel a prevalência é de 33,7% pelo teste de cELISA e 29,4% pela RIFI (SHKAP et al., 1998).

As Américas do Sul e Central são consideradas áreas endêmicas para babesiose, com exceção do sul da Argentina e Chile.

No Brasil a babesiose por *B. equi* e *B. caballi* apresenta-se de forma endêmica, com raros casos da doença clínica (PFEIFER et al., 1995). Estudos utilizando o teste de Fixação de Complemento demonstram um grande número de animais contaminados em todas as áreas testadas, com prevalência mais elevadas em regiões tropicais (KERBER et al., 1999).

Significativas variações nas taxas de prevalência de acordo com as categorias e sistemas de criação, têm sido descrito em diferentes regiões do Brasil (CUNHA et al., 1996; PASSOS et al., 1999; BOTTEON et al., 2002).

Estudos epidemiológicos realizados no Rio Grande do Sul utilizando imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos anti-*B. equi* detectaram prevalência de 57,9% (CUNHA et al., 1996). No Rio de Janeiro foram encontradas prevalências de 72% a 100% (TENTER & FRIEDHOFF, 1986; PFEIFER et al., 1995). No estado de São Paulo a prevalência varia de 49,2% a 81% (HEUCHERT et al., 1999; XUAN et al., 2001) quando diagnosticado anticorpos por provas sorológicas, e em outras regiões como Minas Gerais a prevalência foi de 60,45% (RIBEIRO et al., 1999).

3.5. Resposta Imune

Animais infectados por *B. equi* persistem infectados por anos, provavelmente durante toda vida, enquanto que infecções por *B. caballi* não são persistentes e são pouco estáveis (SCHEIN, 1988).

A doença torna-se crônica devido à fraca imunidade natural do hospedeiro, que se deve à adaptação do parasito às defesas naturais num processo evolutivo, ou seja, sua capacidade de evasão da resposta imune através da variação de seus antígenos de superfícies (BROWN et al., 1999; JENKINS, 2001).

Ainda não esta bem definida como é a resposta imune mediada por células para o controle da parasitemia da *B. equi*, mas existe uma correlação estabelecida entre a inibição da migração de leucócitos e o grau de parasitemia (KNOWLES, Jr., 1996). Neste trabalho os autores encontraram valores normais de leucócitos em animais avaliados antes e após diferentes tratamentos. Já em condições experimentais de inoculação o aumento de leucócitos, especialmente neutrófilos, apresentam o principal papel na remoção de *B. equi* através da opsonização (RUDOLPH et al., 1975; KNOWLES, Jr., 1996).

As respostas imunes específicas são necessárias para controlar a parasitemia em infecções com *B. equi*. No entanto, os mecanismos imunológicos associados com proteção não são completamente conhecidos (KNOWLES, Jr. et al., 1994).

Eqüinos infectados com *B. equi* desenvolvem altos títulos de anticorpos contra proteínas de superfície de merozoítos, o que está envolvido no controle da multiplicação e eliminação do parasito (CUNHA et al., 2002). Sendo a produção de anticorpos idade dependente, ou seja, a medida que os eqüinos tornam-se mais velhos, passam a apresentar uma resposta sorológica mais rápida, com títulos mais altos e por um período de tempo maior (REHBEIN et al., 1983). A dinâmica de anticorpos detectáveis por métodos sorológicos na infecção por *B. equi* começa ao redor dos 15-20 dias (LEVINE, 1985; SCHEIN, 1988; KUTTLER et al., 1988). Em áreas endêmicas e de baixo risco de re-infecção os títulos de anticorpos anti-*B. equi*, tendem a ficar ao redor de 320 e 640 (LINHARES et al., 1994).

3.6. Tratamento

As diferenças entre as espécies determinam tratamentos específicos, observando-se dificuldade somente para a eliminação da *B. equi*. (BRUNING, 1996).

Sabe-se que as drogas empregadas no tratamento químico da babesiose eqüina produzem variados graus de toxicidade nervosa, hepática e renal (ADAMS, 1981). Mesmo assim, a falta de uma técnica eficaz de diagnóstico direto tem

induzido a preconização indiscriminada da terapia química. Do ponto de vista clínico, a administração excessiva de drogas leva o equino a distúrbios digestivos, por insuficiência na secreção de enzimas hepáticas fundamentais à digestão, predispondo o aparecimento da síndrome cólica, assim como importantes alterações podem ser notadas na função neuromotora e sistema excretor renal, que indiretamente condenam determinado tipo de cavalo à diminuição de sua vida útil, principalmente nos desportos (DE WAAL, 1992).

O tratamento da babesiose eqüina é feito por diferentes medicamentos. Entre os quais destacam-se o azul de tripan, o diminazeno, amicarbalida e o dipropionato de imidocarb (KUTTLER, 1988; FRIEDHOFF et al., 1990). Nenhum babesicida é satisfatório para eliminação da *B. equi*, mas pode ser eficiente para o controle da doença.

A determinação da concentração do medicamento no sangue, soro ou plasma é importante no monitoramento dos seus efeitos, pois estabelece a relação entre a concentração da droga no plasma e o eventual efeito terapêutico e/ou tóxico (BENET et al., 1996).

Animais comprovadamente doentes que receberam tratamento com dipropionato de imidocarb (5 mg/kg) apresentaram diminuição da parasitemia após dois dias, de 20% para 10% em eritrócitos infectados, em pôneis não tratados observou-se aumento de 20% para 60% em três dias (SIMPSON & NEAL, 1980).

Recomenda-se o uso do dipropionato de imidocarb via intramuscular ou intravenoso em solução a 10%, 2 mg.kg⁻¹ duas vezes para *B. caballi* e quatro vezes, com intervalo de 72 horas, para *B. equi*. O protocolo de tratamento utilizando a dose de 1,2 mg.kg⁻¹, mostra-se eficaz no combate a infecção por *B. equi*, não apresentando diferença dos animais tratados com 2,4 mg.kg⁻¹, com as vantagens de reduzir custos e diminuir riscos de efeitos colaterais (RIBAS et al., 2003).

3.7. Diagnóstico

A preocupação dos criadores de cavalos com a babesiose eqüina têm exigido a atenção de veterinários com o diagnóstico da enfermidade. O diagnóstico pode ser realizado a partir dos sinais clínicos e da avaliação de alguns parâmetros do hemograma como contagem de eritrócitos, hematócrito e contagem diferencial de

leucócitos (RUDOLPH et al., 1975), associados à detecção dos parasitos na circulação (PHIPPS, 1995). O hematócrito e a detecção de parasitos na circulação constituem-se nos melhores parâmetros para avaliação da doença na fase aguda e na fase crônica a detecção de anticorpos específicos representa o parâmetro mais confiável para o diagnóstico (NIZOLI et al., 2002). As alterações de temperatura não representam um padrão confiável para o diagnóstico da enfermidade, visto que, a temperatura é um parâmetro inconsistente na demonstração clínica de babesiose equina (AZEREDO et al., 2000). Existe também uma relação inversa entre o hematócrito e o título de anticorpos durante a fase aguda da infecção, cujas oscilações provavelmente estejam relacionadas com a dinâmica do parasita na circulação (CUNHA et al., 1998).

Desta forma, o diagnóstico de *B. equi* pode ser direto, através da identificação do parasito na circulação, ou indireto, pela detecção de anticorpos específicos no soro.

A pesquisa do hematozoário é feita rotineiramente por microscopia ótica em esfregaços sangüíneos corados. No entanto, durante a fase crônica da enfermidade, quando os animais em geral apresentam sintomas inespecíficos e parasitemias inferiores a 0,01%, a sensibilidade desta técnica torna-se muito baixa, incorrendo em um grande número de falsos negativos (DE WALL et al., 1987; CUNHA et al., 1998). Técnicas de biologia molecular têm também sido empregadas na detecção do parasito. A reação em cadeia da polimerase (PCR) também tem sido testada na identificação de *B. equi*, onde um sistema de PCR, o qual utiliza duas etapas de amplificação (nested-PCR) e o gene EMA-1 de *B. equi* como molde, possui alta sensibilidade, podendo detectar parasitemias equivalentes a 0,000006% (NICOLAIEWSKY et al., 2001; RAMPERSAD et al., 2003). Através de multiplex-PCR pode ter em uma mesma reação um diagnóstico diferencial para *B. equi* e *B. caballi* (ALHASSAN et al., 2005). Estas técnicas, no entanto, por envolverem equipamentos e pessoal especializados não são rotineiramente utilizadas em muitos laboratórios de diagnóstico.

A utilização de testes sorológicos para o diagnóstico de *B. equi* baseia-se no fato de que o título de anticorpos específicos é diretamente relacionado com a multiplicação do parasito, mesmo durante baixas parasitemias (CUNHA et al., 1998); mas não permitem concluir se o animal é portador de *B. equi*, pois os anticorpos permanecem na circulação por até quatro meses após a infecção. Anticorpos

maternais persistem de um a cinco meses para *B. equi* e de um a quatro meses para *B. caballi* (HEUCHERT et al., 1999). Desde 1969, o teste de fixação de complemento (TFC) é considerado como o método de referência para a detecção de anticorpos anti *B. equi* (FRERICHS et al., 1969; JOYNER et al., 1981). No entanto, o TFC resulta em um grande número de falsos negativos (HEUCHERT et al., 1999), pois sua sensibilidade é limitada quando o título de anticorpos é baixo ou quando anticorpos com atividade anti complemento estão presentes no soro (KNOWLES, Jr. et al., 1992).

A RIFI é sensível e específica na detecção de anticorpos anti-*B. equi* (CALLOW et al., 1979; DONNELLY et al., 1980; KUTTLER et al., 1988; CUNHA et al., 1996). Este método tem sido amplamente utilizado em estudos epidemiológicos e em casos onde outros testes são inconclusivos. No entanto, a necessidade de reprodução de altas parasitemias em cavalos esplenectomizados para a preparação de antígenos e a leitura subjetiva e demorada dos resultados limitam sua padronização e uso em larga escala (SHKAP et al., 1998).

Testes imunoenzimáticos são facilmente padronizáveis e adequados para uso como rotina (XUAN et al., 2001). Entretanto, ELISAs têm apresentado limitada sensibilidade e reações cruzadas com *B. caballi* (WEILAND, 1986; SCHELP et al., 1995). A baixa sensibilidade e especificidade destes testes têm sido atribuída principalmente ao uso de antígenos não purificados. Na tentativa de contornar estes problemas, um ELISA competitivo (cELISA) utilizando antígeno recombinante foi desenvolvido (KNOWLES, Jr. et al., 1992) e com base nos resultados obtidos, representa um candidato em potencial para ser utilizado como teste de referência para o diagnóstico de *B. equi* (BRUNING, 1996).

No entanto, faz-se necessário maior conhecimento da dinâmica de anticorpos durante as diferentes fases da infecção, assim como da sua relação com os parâmetros hematológicos e clínicos utilizados no diagnóstico da enfermidade.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção de antígeno de *B. equi*

4.1.1. Animais experimentais

Os eqüinos destinados a obtenção de antígenos de *B. equi* foram selecionados entre potros sem raça definida, oriundos do município de Santa Vitória do Palmar, RS, região situada abaixo do paralelo 32º de Latitude Sul, considerada como região livre de infecção de *B. equi*.

A partir de um grupo de seis eqüinos com idade entre 6 a 12 meses, foram selecionados dois potros, identificados como E23 e E24, com exames negativos para anemia infecciosa eqüina, estomatite vesicular e babesiose eqüina. Para o exame de babesiose eqüina, foram realizados exames diretos de esfregaços sangüíneos corados pelo Giemsa, teste de PCR e testes sorológicos pela RIFI.

4.1.2. Esplenectomia

Os potros selecionados foram transportados para a Faculdade de Veterinária e mantidos em baias, sob condições de isolamento contra artrópodes. Após foram submetidos à imunossupressão cirúrgica pela técnica de esplenectomia de flanco, metodologia descrita por Cunha et al. (1997). As cirurgias e pós-operatório foram realizadas utilizando a estrutura do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFPel.

4.1.3. Infecção experimental de potros com *B. equi*

4.1.3.1. Infecção com isolado criopreservado

O potro E23 recebeu inóculo experimental criopreservado, conforme descrito por Cunha (1993). O inóculo foi constituído de $1,6 \times 10^{11}$ eritrócitos infectados com *B. equi* do isolado UFPel-E15, administrado por via endovenosa. O potro foi acompanhado diariamente quanto as alterações hematológicas, de parasitemia e alterações clínicas.

4.1.3.2. Infecção com isolado fresco

O potro E24 recebeu inóculo experimental através de passagem por seringa a partir do potro E23. O inóculo quantificado, constituído de $1,6 \times 10^{11}$ eritrócitos infectados com *B. equi* de sangue com anticoagulante colhido diretamente da circulação do doador, foi administrado a fresco por via endovenosa. O receptor foi acompanhado diariamente quanto às alterações hematológicas, de parasitemia e alterações clínicas.

As infecções experimentais por *B. equi*, foram produzidas no infectório do Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Veterinária Preventiva da Faculdade de Veterinária da UFPel.

4.1.4. Preparo do antígeno

Foi preparada uma partida de antígeno de cada animal. O sangue, logo após a coleta, foi centrifugado a 2000xg por dez minutos para remover o plasma e a capa de leucócitos. As hemácias foram lavadas em PBS pH 7,2 (solução tampão fosfato) por três ou quatro vezes e finalmente ressuspensas em igual volume do mesmo PBS. Com este material foram confeccionados esfregaços delgados e uniformes em

lâminas para cito-diagnóstico, fixadas em acetona a 0°C por dez minutos e secadas ao ar. As lâminas foram envoltas em papel filtro, empacotadas quatro a quatro em papel alumínio e estocadas a -20°C em caixas plásticas herméticas contendo sílica gel.

Vários testes foram feitos com a finalidade de avaliar a reação dos antígenos frente a soros positivos e negativos em diferentes diluições.

4.2. Avaliação de *B. equi* em eqüinos naturalmente infectados em área endêmica

4.2.1. Local e duração do experimento

Foram utilizados eqüinos mantidos sob condições de campo e estabulação em um haras, situado no município de Bagé, RS, com localização de 31°30' de Latitude Sul, O experimento foi conduzido de setembro de 2001 a agosto de 2002.

4.2.2. Grupos experimentais

Grupo I: de 93 éguas de cria da Raça Puro Sangue Inglês de Corrida (PSI) origem nacional e internacional adquiridas;

Grupo II: 52 potros da Raça Puro Sangue Inglês de Corrida (PSI) todos nascidos na propriedade;

Grupo III: 20 eqüinos da Raça Crioula (RC) utilizados no serviço de campo, oriundos de propriedades variadas da região sul.

Para os animais adultos, ou seja, éguas PSI e eqüinos RC, a coleta de amostras constou de coletas mensais de sangue com e sem anticoagulante usando sistema Vacutainer®, e para os potros PSI a coleta de sangue foi realizada no mês de fevereiro de 2002, para levantamento da prevalência da infecção na propriedade. Paralelamente durante a coleta de sangue os animais foram inspecionados para a presença de carrapatos.

4.2.3. Avaliação clínica e hematológica

As amostras coletadas foram encaminhadas em caixas isotérmicas com gelo ao Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas. As amostras com EDTA (etileno diamino tetrácido) foram submetidas à confecção de esfregaço sanguíneo (IICA, 1987), contagem diferencial de leucócitos (KOHAYGAWA, 1991), determinação de microhematócrito e obtenção de papa de hemácias para o teste de PCR (NICOLAIWESKY, 1997).

4.2.4. Avaliação sorológica

As amostras sem anticoagulante tiveram o soro extraído, aliquoteado, identificado e estocado a -20°C até o momento do seu uso no processamento sorológico de detecção de anticorpos anti-*B. equi* (CUNHA, 1993) e proteínas plasmáticas totais (PPT).

4.2.5. Reação de nested-PCR

Foram utilizados 108 amostras de sangue coletados no mês de outubro de 2001, das éguas PSI e equínos RC, os quais foram processadas no Centro Integrado do Câncer (CINCAN) da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA). Para a reação da nested-PCR, o DNA foi extraído a partir de uma amostra de 100 µl de sangue, usando o método padrão fenol - clorofórmio e precipitação com etanol (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). A Tabela 1 apresenta a sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados e o tamanho dos fragmentos esperados nas amplificações parciais do gene. Os testes de nested-PCR foram realizados nas condições de amplificação definidas por Nicolaiewsky et al. (2001). Os produtos da reação de amplificação foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5%, corado com nitrato de prata. A confirmação do tamanho do fragmento foi realizada através da comparação com uma escada alélica de 50 pares de bases (Amersham Biosciences).

Tabela 1 - Seqüência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados no nested-PCR.

Iniciadores	Seqüência de Nucleotídeos	Fragmento Esperado
EMA-1F	5'-CCGCCCTTCACCTCGTTCTCAA-3'	396 pb
EMA-2R	5'-CTCCAGTTCCTACGGCGGCTCT-3'	
EMA-3F	5'-CCGTCTCCGTTGACTTGGCCG-3'	102 pb
EMA-4R	5'-TCCGAGGTCCGTTGCGGCAGG-3'	

4.4. Análise Estatística

As variações de hematócrito, títulos de anticorpos e diferencial de leucócitos entre os diferentes meses do ano, foram analisadas estatisticamente utilizando o software Statistix 8.0 (2003).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção de antígenos parasitários de *B. equi*

Após a inoculação os dois potros infectados experimentalmente apresentaram sintomatologia clínica de babesiose por *B. equi*, com sinais clínicos típicos de anemia hemolítica progressiva. Os resultados de parasitemia, temperatura e volume globular estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2 - Reprodução experimental do isolado UFPel-E15 de *B. equi* em eqüinos esplenectomizados.

Nº	PERÍODO	PICO DE	REAÇÃO FEBRIL		HEMATÓCRITO	
	PRÉ-PATENTE	PARASITEMIA	INÍCIO	DURAÇÃO	0 DAI	MINÍMO
E23	(9)	85% (14)	(11)	5d.	38%	11% (14)
E24	(4)	9,5% (7)	(6)	3d.	37%	22% (7)

() = Dias após a inoculação (DAI)

A infecção por *B. equi* nos dois potros mostrou períodos pré-patentes de nove dias para o potro E23, que recebeu inóculo criopreservado, e de quatro dias no potro E24, que recebeu inóculo fresco. No trabalho, o potro E23 apresentou período pré-patente maior, o que pode ser justificado pelo inóculo criopreservado, onde os hematozoários sofrem considerável queda de metabolismo, dificuldade de reprodução e grande mortalidade de acordo com dados sugeridos por Guglielmone et al. (1989, 1991) citados por Sacco et al. (2001), trabalhando com espécies de *Babesia* em bovinos.

Os valores de temperatura retal, volume globular e parasitemia dos potros E23 e E24, infectados com cepa de *B. equi* criopreservada e a fresco estão apresentados nas Figuras 1 e 2, respectivamente.

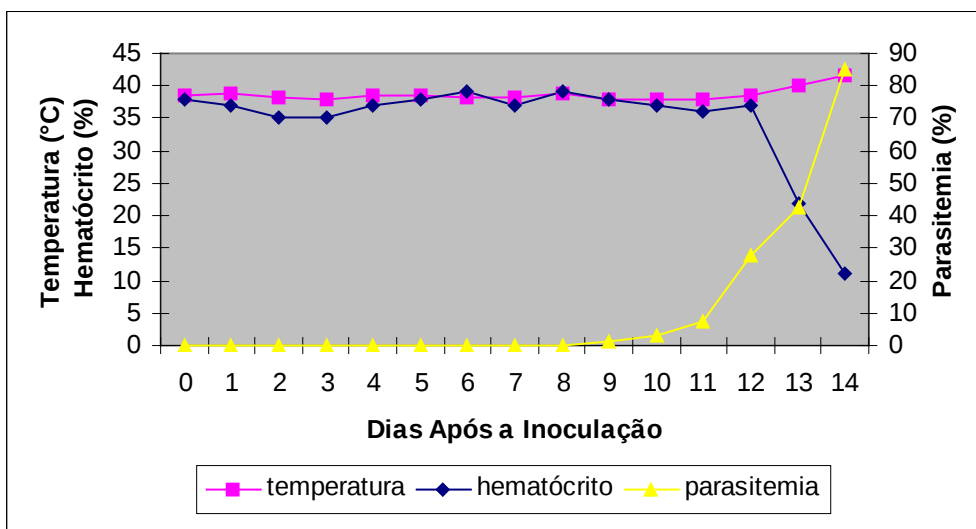
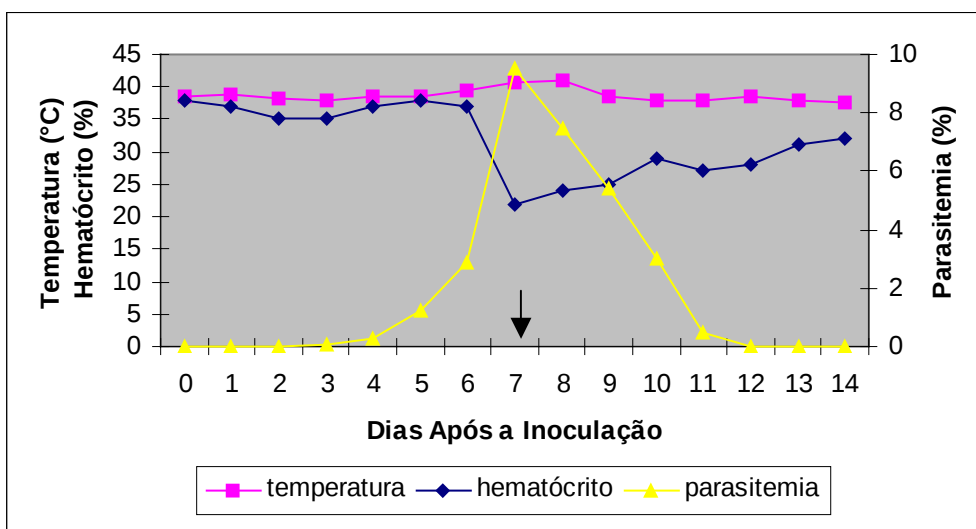


Figura 1 - Temperatura, volume globular e parasitemia do potro E23, esplenectomizado e infectado experimentalmente com cepa de *B. equi* criopreservada.



* seta no 7º dia esta indicando o dia do tratamento com dipropionato de imidocarb

Figura 2 - Temperatura, volume globular e parasitemia do potro E24, esplenectomizado e infectado experimentalmente com cepa de *B. equi* a fresco.

Com o agravamento do quadro clínico o potro E23 foi a óbito no final do 14º DAI. As lesões macroscópicas observadas consistiram em carcaça e órgãos ictéricos, hemoglobinúria e fígado aumentado (Figura 3).

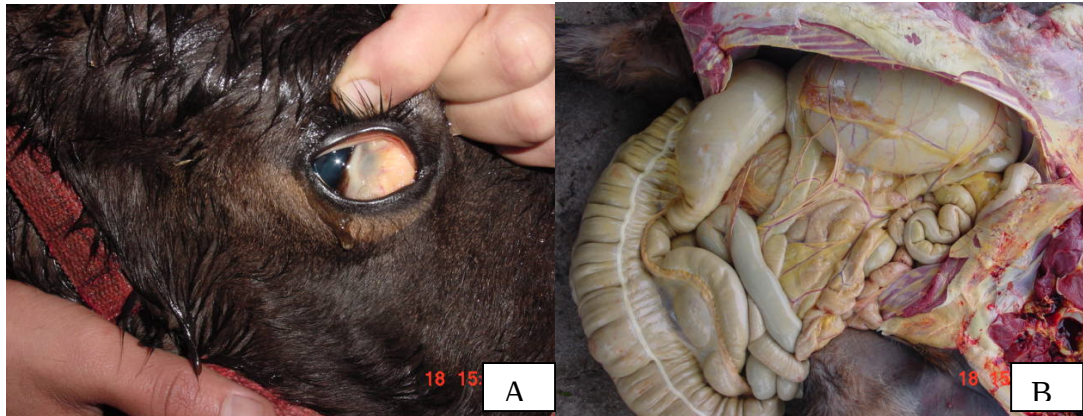


Figura 3 – Potro E23: Achados *pós-mortem* aos 14 DAI experimental com *B. equi*:
A - Mucosa ocular ictérica; B - Carcaça e órgãos abdominais ictéricos.

No 7º DAI do potro E24 uma amostra de 100 ml de sangue foi tomada para o preparo de antígenos para RIFI, conforme descrito por Cunha (1993). No 7º DAI o potro foi tratado com dipropionato de imidocarb¹ na dose de 1,2 mg.kg⁻¹ por quilo de peso vivo. Após o tratamento foi demonstrada a recomposição do hematócrito de forma lenta até o 14º DAI quando os dados não foram mais considerados. Ribas et al. (2003) mostraram que a dose utilizada de 1,2 mg kg⁻¹, é eficaz no combate a infecção por *B. equi*, não apresentando diferença dos animais tratados com 2,4 mg.kg⁻¹. O protocolo de tratamento tem sido sugerido pelos autores com as vantagens de reduzir custos e diminuir riscos de efeitos colaterais.

Na leitura dos esfregaços sangüíneos dos eqüinos durante a evolução da babesiose foram observadas diferentes formas de *B. equi*: a forma oval, em anel e a forma parasitária característica de “Cruz de Malta”, esta observada em aproximadamente 5% das células vermelhas sangüíneas infectadas (Figura 4). A morfologia das formas sangüíneas do parasita corresponderam àquela de *B. equi* descrita por Holbrook et al. (1968).

¹ IMIZOL® - Shering-Ploug Coopers

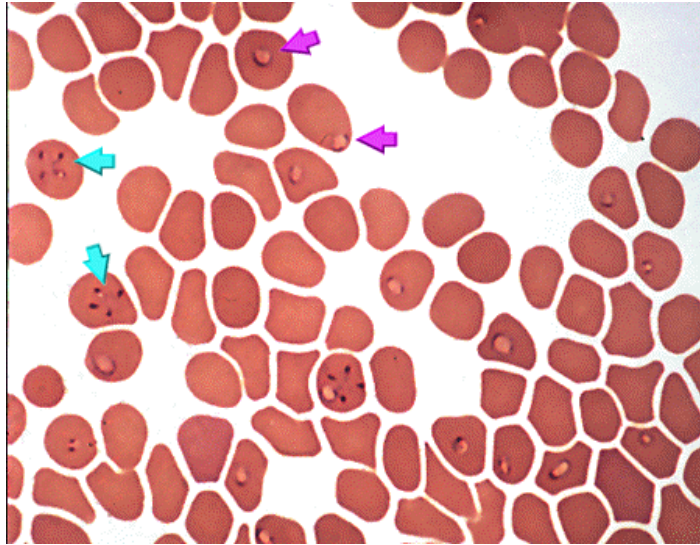


Figura 4 – Hemácias parasitadas por *B. equi* (seta lilás: forma anelar; seta verde: forma “Cruz de Malta”), presente em esfregaços sangüíneos de eqüinos infectados experimentalmente.

A padronização da reação de imunofluorescência indireta mostrou que o antígeno produzido a partir do sangue do potro E23, coletado no 13 DAI teve presença de reações inespecíficas, já o sangue do potro E24 coletado no 6 DAI não apresentou reações inespecíficas e foi selecionado como antígeno padrão para pesquisa de anticorpos anti-*B. equi* no Laboratório de Doenças Parasitárias.

5.2. Prevalência de eqüinos reagentes à *B. equi*

Dentre 165 amostras de soros coletadas no mês de fevereiro e examinadas pela RIFI, demonstraram 28 positivas para *B. equi*, correspondendo a uma prevalência de 16,97% (28/165). A Tabela 3 mostra a distribuição das positivities por categorias e a prevalência média da infecção por *B. equi*, utilizando a RIFI.

Tabela 3 - Prevalência de anticorpos anti-*B. equi*, em eqüinos PSI e RC de diferentes categorias, pela reação de imunofluorescência indireta, em um haras no Rio Grande do Sul, em fevereiro de 2002.

CATEGORIA	Nº DE ANIMAIS EXAMINADOS	Nº DE POSITIVOS	% DE POSITIVOS
PSI (égua)	93	14	15,05
PSI (potros)	52	3	5,77
RC (serviço)	20	11	55,00
TOTAL	165	28	16,97

Segundo Knowles & Uniss-Flويد (1983), somente a transmissão através de carrapatos é capaz de manter uma área endêmica. A taxa de prevalência está diretamente relacionada com a epidemiologia dos carrapatos vetores na região. Estudos epidemiológicos realizados por Cunha et al. (1998), Tenter & Friedhoff (1986) e Pfeifer et al. (1995), Heuchert et al. (1999) e Ribeiro et al. (1999) em vários estados brasileiros demonstraram prevalências muito superiores, variando desde 49,2% até 100%, sob diferentes condições epidemiológicas, sobretudo expostos a altas infestações por carrapatos.

Variações de prevalência foram observadas de acordo com as categorias e os sistemas de criação. Este efeito tem sido descrito por Cunha et al. (1996) e Botteon et al. (2002) em diferentes regiões do Brasil. Estes achados embasam-se no fato de que animais mais velhos submetidos às mesmas condições estão mais expostos aos riscos de contaminação em áreas endêmicas. Os eqüinos RC (serviço) apresentaram as maiores prevalências. Tal fato pode ser explicado pelo que foi descrito por Kerber et al. (1999) e Heuchert et al. (1999) onde encontraram altas prevalências em eqüinos utilizados no manejo de bovinos e manutenção em campos considerados sujos e carrapateados. Segundo Friedhoff (1988), Knowles, Jr. et al. (1992) e Guimarães et al. (1998) existe relação entre a ocorrência de *Boophilus microplus*, como potencial vetor para a transmissão destes agentes.

Dentre os animais, positivos os títulos de anticorpos anti-*B. equi*, variaram entre 80 e 1280, com 60,8% dos títulos entre 320 e 640. O título mais freqüente foi o de 320 (32,2%), conforme Figura 5. Uma distribuição sorológica semelhante foi observada em Goiás por Linhares (1994), com eqüinos criados em regime extensivo e semiconfinado.

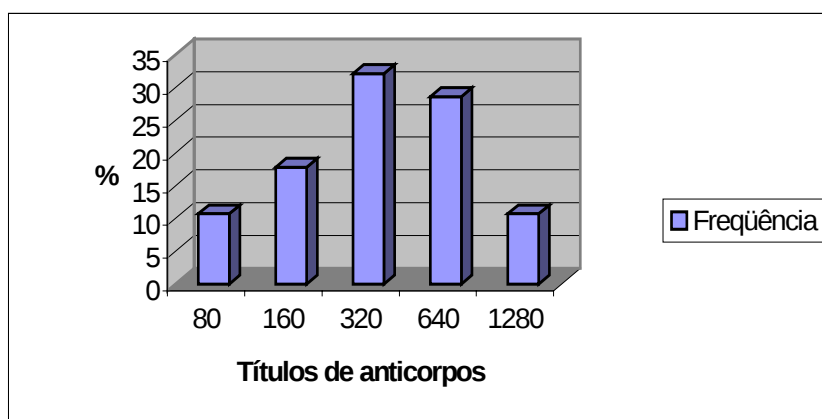


Figura 5 - Distribuição da frequência de títulos de anticorpos anti-*B. equi* em eqüinos positivos pela RIFI de um haras no Rio Grande do Sul, em fevereiro de 2002.

Os dados mostrados na Tabela 4 revelaram títulos de anticorpos anti-*B. equi* mais altos em eqüinos mais velhos (égua PSI e eqüinos RC). Nenhum potro apresentou títulos maiores ou iguais a 640. Estes achados têm sido descritos por Rehbein et al. (1983), que concordam que a produção de anticorpos é idade dependente, ou seja, à medida que os eqüinos tornam-se mais velhos, passam a apresentar uma resposta sorológica mais rápida, com títulos mais altos e por um período de tempo maior.

Tabela 4 - Frequência absoluta e relativa de títulos soropositivos para *B. equi*, pela reação de imunofluorescência indireta, em fevereiro de 2002.

TÍTULOS	CATEGORIAS						TOTAL	
	PSI (éguas)		PSI (potros)		RC (serviço)			
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
80	2	14,3	0	0	1	9,1	3	10,7
160	2	14,3	2	66,7	1	9,1	5	17,8
320	5	35,7	1	33,3	3	27,3	9	32,2
640	4	28,6	0	0	4	36,4	8	28,6
1280	1	7,1	0	0	2	18,1	3	10,7
TOTAL	14	100,0	3	100,0	11	100,0	28	100,0

5.3. Incidência da infecção na propriedade

A incidência em éguas de cria e eqüinos de serviço expostos ao risco de acometimento da doença foi nula no período de acompanhamento por 12 meses.

Baseado na ausência de carrapatos vetores, manutenção dos eqüinos em pastagens cultivadas, baixa unidade animal por hectare, rodízio de pastagens e roçadas freqüentes,

A ocorrência de babesiose fetal por transmissão intrauterina foi de 7,14%, considerando uma população de 14 éguas cronicamente infectadas, demonstradas por prova sorológica. Os exames clínicos revelaram que a égua parturiente apresentava condições clínicas normais enquanto que o potro apresentou, já ao nascer prostração, intensa icterícia, acentuada anemia, taquipnéia, taquicardia, subdesenvolvimento, atrofia muscular e dificuldade de manter-se de pé. Os exames laboratoriais revelaram, nested-PCR positivo, exame de esfregaço sanguíneo corado com parasitemia de 46% de *B. equi*, com predomínio de merozoítos intraeritrocitários na forma de “Cruz de Malta” (Figura 6). O hematócrito foi de 22% revelando estado de anemia com intensa bilirrubinemia.

Segundo De Waal (1992), a transmissão intrauterina de *B. equi* parece ser relativamente comum. Conforme Böse et al. (1995) os eritrócitos fetais apresentam-se parasitados já no momento do parto. Donatie et al. (1924) e Guimarães et al. (1954). observaram casos de babesiose congênita e sugeriram haver transmissão transplacentária da babesia. Du Plessis (1966) mostra a ocorrência de fetos abortados com icterícia e estado de anemia, ou potros prematuros e aqueles a termo que nascem doentes, mostrando sintomas como icterícia, anemia, prostração e relutância a amamentação. De Waal (1988) afirmou que as infecções intrauterinas ocorrem ao acaso em áreas endêmicas, geralmente no último trimestre da gestação, resultando em abortos, natimortos ou potros fracos que morrem logo após o nascimento.

Com base no exposto, a demonstração da infecção intrauterina em um potro dentre apenas 14 éguas parturientes indica a babesiose eqüina como uma doença fetal de alta transmissibilidade.

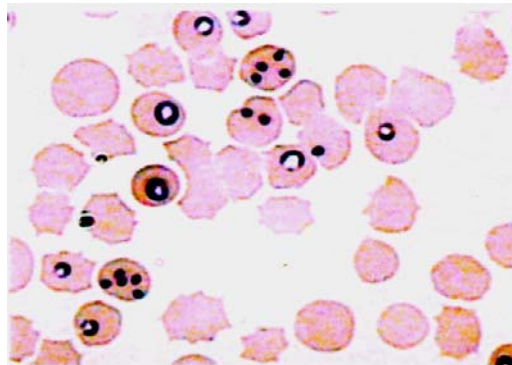


Figura 6 – Esfregaço corado por Giemsa, mostrando hemácias parasitadas por *B. equi*, em potro neonato.

5.4. Dinâmica de anticorpos em animais soropositivos

A análise da dinâmica de anticorpos anti-*B. equi*, pela RIFI durante o período de 12 meses, demonstrou oscilações discretas nas titulações, não apresentando diferença significativa entre os meses analisados conforme mostrado na Figura 7.

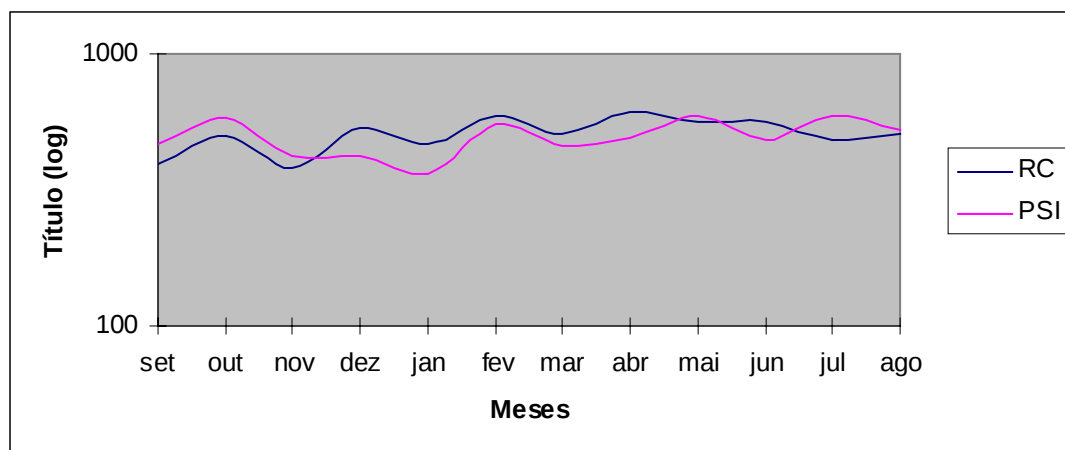


Figura 7 - Curva de anticorpos anti-*B. equi* durante o período de um ano em éguas PSI e eqüinos RC, em um haras no Rio Grande do Sul, de setembro de 2001 a agosto de 2002.

O título médio de anticorpos apresentado para éguas da raça PSI foi de 496,2 e os eqüinos RC de 509,5 (dados apresentados em logaritmo), a análise estatística através do teste de Tukey não apresentou diferença significativa entre as categorias.

Para Levine (1985), Schein (1988) e Kuttler et al. (1988) a dinâmica de anticorpos detectáveis por qualquer método sorológico na infecção por *B. equi* esta representada graficamente por uma curva gaussiana, já que aparecem aos 15-20 dias da primoinfecção, aumentando posteriormente. Os títulos tendem à manutenção em alta durante 6-10 meses começando decrescer até chegar a níveis basais indetectáveis, em muitas ocasiões, por alguns métodos sorológicos. Segundo Schein (1988), eqüinos infectados por *B. equi* desenvolvem uma sólida imunidade que protege contra a doença clínica no caso de re-exposições ao parasito. Esta proteção tem sido atribuída à contínua estimulação do sistema imune por parasitos que persistem no organismo durante a fase crônica da enfermidade, mesmo em baixas parasitemias. Para De Waal et al. (1988) um eqüino portador pode apresentar variações de títulos de anticorpos, justificáveis por ciclos de reagudização de parasitemia, condição física e estado fisiológico ou sanitário. Neste trabalho a ausência de oscilações no nível de anticorpos pode caracterizar a região como sendo de baixo desafio e baixo risco de infecção.

5.5. Alterações hematológicas em eqüinos naturalmente infectados e sadios

O estudo das alterações hematológicas demonstrou que não houve variações significativas de hematócrito e na contagem diferencial de leucócitos entre eqüinos infectados e sadios, acompanhados durante o período de doze meses. A curva dos hematócritos está mostrada na Figura 8.

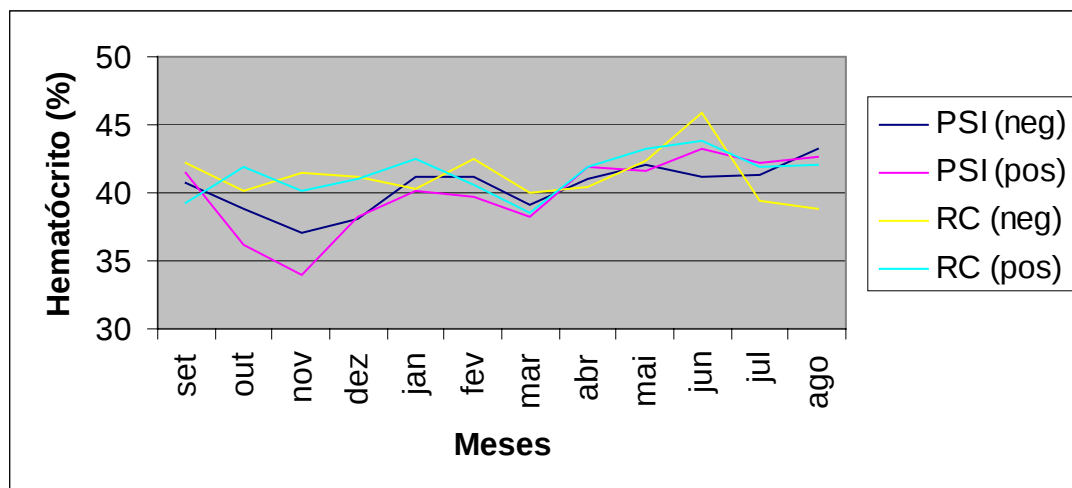


Figura 8 – Curva de hematócrito em eqüinos livres e portadores de *B. equi*, durante 12 meses em éguas PSI e em eqüinos RC.

Concordando com os achados apresentados acima, Hailat et al. (1997) também não encontraram diferença significativa entre o hematócrito de eqüinos portadores de *B. equi* e de eqüinos não infectados.

As contagens de diferenciais de leucócitos estão mostradas na Tabela 5.

Tabela 5 - Análise estatística do diferencial de leucócitos, hematócritos e PPT, de eqüinos naturalmente infectados.

Variável Categoria	Hematócrito	Linfócitos	Neutrófilos	PPT
PSI (neg)	40,43 a	29,70 a	63,17 a	6,36 a
PSI (pos)	39,90 a	29,94 a	62,63 a	6,41 a
RC (neg)	41,46 b	30,60 a	62,02 a	6,64 b
RC (pos)	41,46 b	29,56 a	62,08 a	6,69 b

Os resultados dos exames de diferenciais de leucócitos demonstraram padrões normais na comparação entre animais positivos e negativos. Este achado tem sido citado quando se trata de animais cronicamente infectados (Knowles, 1996), enquanto que animais com sintomatologia clínica da infecção demonstram alterações na série branca, principalmente em leucócitos conforme descrito por Rudolph et al. (1975) e Knowles (1996), onde os neutrófilos apresentam o principal papel na remoção de *B. equi* através da opsonização.

Segundo Knowles (1996) ainda não está bem definida como é a resposta imune mediada por células para o controle da parasitemia da *B. equi*, mas existe uma correlação estabelecida entre a inibição da migração de leucócitos e o grau de parasitemia. Adicionalmente, durante o início da infecção *B. equi* centra sua ação sobre o sistema mononuclear fagocítico (fase linfoproliferativa), para posteriormente provocar uma severa anemia, já que pode alcançar elevados níveis de parasitemia, próximos a 80% de eritrócitos parasitados. Em ambos casos estão presentes os processos auto-imunes manifestados com fenômenos de eritrofagocitose, descritos por Levine (1985) e Schein (1988).

Os dados permitiram concluir que não houve diferenças significativas entre as contagens diferenciais de leucócitos, hematócritos e PPT entre animais cronicamente infectados e sadios.

5.6. Resultados da técnica de PCR e a RIFI

Os resultados do teste direto (nested-PCR) para a detecção de DNA de *B. equi* e indireto (RIFI) para detecção de anticorpos anti-*B. equi* realizados em amostras de sangue de 108 eqüinos PSI e RC são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 – Resultados das técnicas de nested-PCR e RIFI para diagnóstico de *B. equi*, em outubro de 2001.

Testes/Resultados		RIFI		Total
		Positivo	Negativo	
NESTED-PCR	Positivo	13	3	16
	Negativo	11	81	92
Total		24	84	108

A sensibilidade e a especificidade da técnica da nested-PCR para a amplificação do gene EMA-1 de *B. equi* foram as mesmas obtidas por Nicolaiewsky et al. (2001).

Em 3 animais os resultados da técnica de nested-PCR foram positivos e os resultados de RIFI negativos, podendo-se supor que estes animais tenham sofrido uma infecção recente não tendo havido o tempo necessário para o organismo montar uma resposta imune à infecção ou os níveis de anticorpos sejam inferiores ao limite de positividade da técnica de RIFI. Schein (1988) e Kuttler et al. (1988) relatam que a dinâmica de anticorpos é representada por uma curva com distribuição normal, chegando a níveis basais indetectáveis por técnicas sorológicas. Weiland (1986) observou que cavalos artificialmente infectados com *B. equi* e *B. caballi* demoravam de 3 a 20 dias para produzirem anticorpos detectáveis. Em 11 animais foram observados resultados positivos para RIFI e negativos para a técnica de nested-PCR, supondo-se o que descrito por De Waal (1992), que estes eqüinos poderiam não estar mais na fase aguda da infecção ou por se tratar de eqüinos expostos a baixo desafio, mantendo baixas parasitemias, mas que ainda seguem portadores da infecção em níveis de parasitemia baixa, inferiores a sensibilidade da técnica da PCR, impedindo a detecção direta do parasita. Os achados permitem concluir que percentual considerável de animais sorologicamente positivos são portadores do agente, caracterizando a situação epidemiológica de animais persistentemente infectados mesmo com títulos consideráveis de anticorpos.

CONCLUSÕES

- A prevalência de eqüinos reagentes à *B. equi*, demonstrou que a região é uma área endêmica a babesiose;
- A incidência nula caracteriza a área como de baixo risco à infecção adquirida;
- Os níveis de anticorpos foram constantes em animais positivos, caracterizando ausência de reagudizações e reinfecções;
- A análise de diferencial de leucócitos não se constitui em parâmetro seguro para se discriminar positividade na fase crônica da infecção;
- A detecção do agente pelo método direto por PCR e pela RIFI, evidenciam a condição de animais persistentemente infectados que representam fonte de infecção efetiva para outros animais;

REFERÊNCIAS

ADAMS, L. G. Clinicopathological aspects of imidocarb dipropionate toxicity in horses. **Research in Veterinary Science**. v.31, p.54-61, 1981.

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

ALLSOPP, M. T.; CAVALIER-SMITH, T.; DE WAAL, D. T.; ALLSOPP, B. A. Phylogeny and evolution of the piroplasms. **Parasitology**, v.108, n.2, p.147-152, 1994.

AMBAWAT, H. K.; MALHOTRA, D. V.; KUMAR, S.; DHAR, S. Erythrocyte associated haemato-biochemical changes in *Babesia equi* infection experimentally produced in donkeys. **Veterinary Parasitology**, v.85, p.319-324, 1999.

AZEREDO, D. M.; CENTENO, L. B.; BARBOSA, R. S.; ARAÚJO, K. G. S.; DAMO, C.; DELLAGOSTIN, O.; ARNONI, J. V.; SILVA, S. S. Reações térmicas e hematológicas, durante a fase aguda e crônica, em eqüinos infectados experimentalmente com *Babesia equi*. Resumos...**9º Congresso de Iniciação Científica e 2º Encontro da Pós-graduação**, 2000, UFPel.

BATTSETSEG, B.; LUCERO, S.; XUAN, X.; CLAVERIA, F. G.; INOUE, N.; ALHASSAN, A.; KANNO, T.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; MIKAMI, T.; FUJISAKI, K. Detection of natural infection of *Boophilus microplus* with *Babesia equi* and *Babesia caballi* in Brazilian horses using nested polymerase chain reaction. **Veterinary Parasitology**, v.107, p.351-357, 2002.

BENET, Z. L.; KROETZ, L. D.; SHEINER, B. L. Pharmacokinetics: The dynamics of drug, absorption, distribution, and elimination. In: GOODMAN & GILMAN'S - The Pharmacological basis of therapeutics, 9.ed. International, 1996. 1793p.

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**, v.127, p.29-32, 2005.

- BÖSE, R.; JORGENSEN, W. K.; DALGLIESH, R. J.; FRIEDHOFF, K. T.; DeVOS, A. J. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Veterinary Parasitology**, v.57, p.61-74, 1995.
- BOTTEON, P. T.; BOTTEON, R. C. C. M.; LINHARES, G. F. C.; MASSARD, C. L.; LOSS, Z. G. Seroprevalencia de *Babesia equi* en tres diferentes sistemas de crianza de equinos de Brasil. **Parasitología Latinoamericana**, v.57, n.3-4, p.141-145, 2002.
- BROWN, W. C.; SUAREZ, C. E.; SHODA, L. K. M.; ESTES, D. M. Modulation of host immune responses by protozoal DNA. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.72, p.87-94, 1999.
- BRUNING, A. Equine piroplasmosis an update on diagnosis, treatment and prevention. **British Veterinary Journal**, v.152, p.139-151, 1996.
- CALLOW, L. L.; MCGREGOR, W.; RODWELL, B. J.; ROGERS, R. J.; FRASER, G. C.; MAHONEY, D. F.; ROBERTSON, G. M. Evaluation of an indirect fluorescent antibody test to diagnose *Babesia equi* infection in horses. **Australian Veterinary Journal**, v.55, p.555-559, 1979.
- CUNHA, C. W. **Babesiose Equina: Padronização da Reação de Imunofluorescência Indireta para sorodiagnóstico em eqüinos Puro Sangue Inglês**. 1993. 56f. Tese de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Veterinária - Área de Concentração em Sanidade Animal, UFPel, Pelotas.
- CUNHA, C. W.; SILVA, S. S.; OSÓRIO, B. L.; DUTRA, C. L. Alterações hematológicas e sorológicas em eqüinos experimentalmente infectados com *Babesia equi*. **Ciência Rural**, v.28, p.283-286, 1998.
- CUNHA, C. W.; SILVA, S. S.; PIMENTEL, C. A.; DAPPER, E. Avaliação da frequência de eqüinos soropositivos a *Babesia equi* no Jockey Clube de Pelotas e em dois haras da zona sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.5, p.119-122, 1996.
- CUNHA, C. W.; SILVA, S. S.; RODRIGUES, A. L.; GUERREIRO, G. Avaliação do efeito da esplenectomia em eqüinos portadores e livres de *Babesia* spp. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.6, p.157-160, 1997.
- CUNHA, C. W.; KAPPMAYER, L. S.; MCGUIRE, T. C.; DELLAGOSTIN, O. A.; KNOWLES, D. P. Conformational dependence and conservation of an immunodominant epitope within the *Babesia equi* erythrocyte-stage surface protein equi merozoite antigen 1. **Clinical and Diagnostic Laboratory immunology**, v.9, p.1301-1306, 2002.

DE WAAL, D. T.; VAN HEERDEN, J.; VAN DEN BERG, S. S.; STEGMANN, G.F.; POTGIETER, F.T. Isolation of pure *Babesia equi* and *Babesia caballi* organisms in horses splenectomized from endemic areas in South Africa. **Onderstepoort Journal Veterinary Research**, v.55, p.33-35, 1988.

DE WAAL, D.T. Equine piroplasmosis: A Review. **British Veterinary Journal**, v.148, p.6-14, 1992.

DE WAAL, D.T.; VAN HEERDEN, J.; POTGIETER, F.T. An investigation into the clinical pathological changes and serological response in horses experimentally infected with *Babesia equi* and *Babesia caballi*. **Onderstepoort Journal Veterinary Research**, v.54, p.561-568, 1987.

DONATIEN, A. L.; LESTOQUARD, F.; SAUSEAU, E.; MAUBARET, P. Transmission de *Piroplasma caballi* de la mere au foetus. **Bull. Soc. Path. Exot.**, v.27, p.433-435, 1924.

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 Animal Health and Production**, v.12, p.50-60, 1980.

DU PLESSIS, J. L.; BASSON, P. A. Babesiosis in aborted equine fetuses: a report on two cases in south Africa. **Journal of South African Veterinary Medical Association**, v.37, n.3, p.267-269, 1966.

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

FRIEDHOFF, K. T. Interaction between parasite and tick vector. **International Journal for Parasitology**, v.20, n.4, p.525-535, 1990.

FRIEDHOFF, K. T. Transmission of Babesia In: Ristic, M., **Babesiosis of Domestic Animals and Man**, Boca Raton, FL, CRC, 1988. p.23-52.

FRIEDHOFF, K. T.; SOULE, C. An account on equine babesioses. **Revue Scientifique et Technique**, v.15, p.1191-1201, 1996.

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

GAUTAM, O. P.; DWIVEDI, S. K. Equine babesiosis: A severe outbreak in a stud farm at Hissar. **Indian Veterinary Journal**, v.7, p.546-551, 1976.

GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J.; AGUIRRE, D. H.; et al. Vacunación simultánea con *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* atenuadas, congeladas en nitrógeno líquido con DMSO o glicerol como crioprotectores. **Revista de Medicina Veterinaria**, v.70, n.4, p.176-182, 1989.

GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J.; AGUIRRE, D. H.; et al. Vacunas congeladas contra la babesiosis y la anaplasmosis de los bovinos: viabilidad luego de la descongelación. **Revista Cubana de Ciencias Veterinarias**, v.22, n.3, p.233-240, 1991.

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

GUIMARÃES, A. M.; LIMA, J. D.; RIBEIRO, M. F. B.; CAMARGOS, E. R. S.; BOZZI, I. A. Ultrastructure of sporogony in *Babesia equi* in salivary glands of adult female *Boophilus microplus* ticks. **Parasitology Research**, v.84, p.69-74, 1998^a.

GUIMARÃES, A. M.; LIMA, J. D.; TAFURI, W. L.; RIBEIRO, M. F. B.; SCIAVICCO, C. J. S.; BOTELHO, A. C. C. Clinical and histopathological aspects of splenectomized foals infected by *Babesia equi*, **Journal of Equine Veterinary Science**, v.17, n.4, p.211-216, 1997.

GUIMARÃES, L. M.; ARAUJO, T. L.; SALLES GOMES, C. E. Nutaliose congenital em eqüinos puro-sangue de corridas no estado de São Paulo. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária de São Paulo**, v.5, n.2, p.183-186, 1954.

HAILAT, N. Q.; LAFI, S. Q.; AL-DARRAJI, A. M.; AL-ANI, F. K. Equine babesiosis associated with strenuous exercise: clinical and pathological studies in Jordan. **Veterinary Parasitology**, v.69, p.1-8, 1997.

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

HOLBROOK, A. A.; FRERICHS, W. M.; ALLEN, P. C. Laboratory diagnosis of equine piroplasmosis. **Proc. 3rd Int. Conf. Equine Infect. Dis.**, p.467-475, 1972.

HOLBROOK, A. A.; JOHNSON, A. J.; MADDEN, P. A. Equine Piroplasmosis: Intraerythrocytic development of *Babesia caballi* (Nuttall) and *Babesia equi* (Laveran). **American Journal Veterinary Research**, v.2, p.297-303, 1968.

IBANÉZ, E. A.; BETTIONOTTI, C. M.; MORETTI, O. F.; GIMÉNEZ, R. L.; MOREIRA, R.; BARGARDI, S.; BENÍTEZ, M. C. Piroplasmose Equina: comprobación de su existencia en la Republica Argentina (Corrientes), por observación del parásito, pruebas inmunológicas y transmisión experimental. **Gaceta Veterinaria**, v.36, p.65-85, 1974.

IBANÉZ, E. A.; GIMÉNEZ, R. L.; ZENOCRATI, L. G. R. Aspectos clínicos y morfológicos de la *Babesia caballi* y *Babesia equi*. **Gaceta Veterinária**, v.41, p.422-429, 1979.

IICA. Técnicas para el diagnóstico de Babesiosis y Anaplasmosis bovinas. Salud Animal: Publication Científica n°8. San Jose, Costa Rica, 1987. 79p.

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

JAIN, N. Essentials of Veterinary Hematology, Philadelphia: Lea and Febiger, 1993. 240p.

JENKINS, M. C. Advances and prospects for subunit vaccines against protozoa of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v.101, p.291-310, 2001.

JOYNER, L. P.; DONNELLY, J.; HUCK, R. A. Complement fixation tests for equine piroplasmosis (*Babesia equi* and *B. caballi*) performed in the UK during 1976 to 1979. **Equine Veterinary Journal**, v.13, p.103-106, 1981.

KATZER, F.; MCKELLAR, S.; KIRVAR, E.; SHIELS, B. Phylogenetic analysis of *Theileria* and *Babesia equi* in relation to the establishment of parasite populations within novel host species and the development of diagnostic tests. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.95, p.33-44, 1998.

KERBER, C. E.; FERREIRA, F.; PEREIRA, M. C. Control of equine piroplasmosis in Brazil. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.66, p.123-127, 1999.

KNOWLES, D. P., Jr. Control of *Babesia equi* parasitemia. **Parasitology Today**, v.12, p.195-198, 1996.

KNOWLES, D. P., Jr.; KAPPMAYER, L. S.; PERRYMAN, L. E. Specific immune responses are required to control parasitemia in *Babesia equi* infection. **Infection and Immunity**, v.62, p.1909-1913, 1994.

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

KNOWLES, R. C.; HOURRIGAN, J. L.; HOLBROOK, A. A. Equine Piroplasmosis. **Equine Practice**, v.2, n.1, p.10-14, 1980.

KNOWLES, R. C.; UNISS-FLOYD, R. Equine Piroplasmosis (Babesiosis) of the *Babesia caballi* type. **Equine Practice**, v.5, n.3, p.18-22, 1983.

KOHAYGAWA, A. **Hematologia Veterinária**, Resumos do Curso de Hematologia Veterinária, 1991. Curso de Pós Graduação em Veterinária, UFPel.

KUTTLER, K. L. Chemotherapy of babesiosis. In: Babesiosis of domestic animals and man. Florida: M. Ristic (ed.), CRC Press, 1988, p.227-243.

KUTTLER, K. L.; GOFF, W. L.; GIPSON, C. A.; BLACKBURN, B. O. Serologic response of *Babesia equi*-infected horses as measured by complement-fixation and indirect fluorescent antibody tests. **Veterinary Parasitology**, v.26, p.199-205, 1988.

KUTTLER, K. L.; GIPSON, C. A.; GOFF, W. L.; JOHNSON, M. S. Experimental *Babesia equi* infection in mature horses. **American Journal Veterinary Research**, v.8, p.1668-1670, 1986.

LEVINE, N. D. Apicomplexa. The Piroplasms. In: Veterinary Protozoology. Iowa State University Press. Ames, 1985, p.291-328.

LINHARES, G. F. C. **Aspectos Biológicos y epidemiológicos das babesioses de eqüídeos, com ênfase à microrregião de Goiânia, Goiás, Brasil**. 1994, 105p. Tese de Doutorado -Instituto de Parasitologia -Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

MAHONEY, D. F.; WRIGHT, I.G.; FRERICH, W.M.; GROENENDYK, S.; O'SULLIVAN, B.M.; ROBERTS, M.C.; WADDELL, A. M. The identification of *Babesia equi* in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v.53, p.461-464, 1977.

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

NICOLAIEWSKY, T. B. **Deteção de *Babesia equi* (Laveran, 1901) pela Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**. 1997, Dissertação. (Mestrado em Ciências Veterinárias) Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

NICOLAIEWSKY, T. B.; RICHTER, M. F.; LUNGE, V. R.; CUNHA, C. W.; DELAGOSTIN, O.; IKUTA, N.; FONSECA, A. S.; SILVA, S. S.; OZAKI, L. S. Deteccion of *Babesia equi* (Laveran, 1901) by nested polymerase chain reaction. **Veterinary Parasitology**, v.101, p.9-21, 2001.

NIZOLI, L. Q.; AZEREDO, D. M.; CENTENO, L. B.; PRADO, F. R. A.; SILVA, S. S. Alterações hematológicas e térmicas, durante a fase aguda e crônica de babesiose, em eqüinos infectados com *Babesia equi*. **Resumos do I Congresso Brasileiro de Especialidades em Medicina Veterinária**, Curitiba, 2002.

NOGUEIRA, C. E. W.; SILVA, S. S.; NIZOLI, L. Q.; RIBAS, L. M.; ALBUQUERQUE, L. P. A. N. Efeito quimioprolático do dipropionato imidocarb na prevenção da agudização de babesiose eqüina em cavalos portadores da infecção. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre-RS, *Trabalhos vencedores do 6º Prêmio Pesquisa Schering-Plough Coopers*, p.15-18, 2004.

OLADASU, L. A.; OLUFEMI, B. E. Hematology of experimental babesiosis and ehrlichiosis in steroid immunosuppressed horses. **Journal Veterinary Medicine B**, v.39, p.345-352, 1992.

OLADOSU, L. A. Effects of intravenous corticosteroid on the pathogenicity of *Babesia equi* infection of donkeys (*Equus asinus*). **Journal Veterinary Medicine B**, v.35, p.509-514, 1988.

PASSOS, L. M. F.; RIBEIRO, M. F. B.; ANDEREGG, P. I.; BÖSE, R. Serological diagnosis of *Babesia equi* and *B. caballi* in pregnant mares. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, p.527-530, 1999.

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

PHIPPS, L. P. Equine piroplasmiasis. **Equine Veterinary Education**, v.8, n.1, p.33-36, 1995.

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

RAMBERSAD, J.; CESAR, E.; CAMPBELL, M. D.; SAMLAL, M.; AMMONS, D. A field evaluation of PCR for the routine detection of *Babesia equi* in horses. **Veterinary Parasitology**, v.114, p.81-87, 2003.

REHBEIN, G.; HEIDRICH-JOSWIG, S. Use of schizont and piroplasm antigens of *Babesia equi* in the indirect fluorescent antibody and complement fixation tests. **Veterinary Parasitology**, v.12, p.135-144, 1983.

RIBAS, L. M.; SILVA, S. S.; NOGUEIRA, C. E. W.; NIZOLI, L. Q.; KRAUSE, L. E. Avaliação da eficácia terapêutica do dipropionato de imidocarb no tratamento de eqüinos durante infecção aguda por *Babesia equi*. **A Hora Veterinária**. Porto Alegre-RS, v.139, p.21-24, 2003.

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

RUDOLPH, W.; CORREA, J.; ZURITA, L. Equine piroplasmosis: leukocytic response to *Babesia equi* (Laveran, 1901) infection in Chile. **British Veterinary Journal**, v.131, n.5, p.601-609, 1975.

SACCO, A. M. S.; KESSLER, R. H.; MADRUGA, C. R. Cepas atenuadas de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e de *Anaplasma centrale* como imunógenos no controle da Tristeza Parasitária Bovina. **Ciência Rural**, v.31, n.5, p.849-855, 2001.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning**. A laboratory manual. 3rd ed., Cold Spring Harbor, New York, 2001.

SCHALM, O. W. **Veterinary Hematology**, Philadelphia: Lea and Febiger, 1975.

SCHEIN, E. Equine babesiosis In: Ristic, M., **Babesiosis of Domestic Animals and Man** Boca Raton, FL. CRC Press, Cap.12, p.197-208, 1988.

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

SCHELP, C.; BOSE, R.; MICHA, A.; HENTRICH, B. Cloning and expression of two genes from *Babesia equi* merozoites and evaluation of their diagnostic potential. **Applied Parasitology**, v.36, p.1-10, 1995.

SENGUPTA, P. P.; VIRMANI, N.; YADAV, M. P. Pathological changes in the donkeys experimentally infected with *Babesia equi*. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.69, p.169-170, 1999.

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

SIMPSON, C. F.; NEAL, F. C. Ultrastructure of *Babesia equi* in ponies treated with imidocarb. **American Journal Veterinary Research**, v.41, n.2, p.267-271, 1980.

SINGH, B.; BANERJEE, D. P.; GAUTAM, O. P.; GUPTA PAUL, R. K. Clinicopathological changes in splenectomised donkeys infected with *Babesia equi*. **Indian Journal Parasitology**, v.4, p.77-80, 1980.

SMITH, J. E.; ERICKSON, H. H.; DEBOWES, R.M.; CLARK, M. Changes in Circulation Equine Erythrocytes Induced by Brief High-Speed Exercise. **Equine Veterinary Journal**, v.21, n.6, p.444-446, 1989.

STATISTIX FOR WINDOWS, **Analytical Software**, v. 8.0, 2003.

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

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

TENTER, A. M.; FRIEDHOFF, K. T. Serodiagnosis of experimental and natural *Babesia equi* and *B. caballi* infections. **Veterinary Parasitology**, v.20, p.49-61, 1986.

WEILAND, G. Species-specific serodiagnosis of equine piroplasmas infections by means of complement fixation test (CFT), immunofluorescence (IIF), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Veterinary Parasitology**, v.20, p.43-48, 1986.

XUAN, X.; IGARASHI, I.; TANAKA, T.; FUKUMOTO, S.; NAGASAWA, H.; FUJISAKI, K.; MIKAMI, T. Detection of antibodies to *Babesia equi* in horses by a latex agglutination test using recombinant EMA-1. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.8, p.645-646, 2001.

XUAN, X.; NAGAI, A.; BATTSETSEG, B.; FUKUMOTO, S.; MAKALA, L. H.; INOUE, N.; IGARASHI, I.; MIKAMI, T.; FUJISAKI, K. Diagnosis of equine piroplasmosis in Brazil by serodiagnostic methods with recombinant antigens. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.63, p.1159-1160, 2001.

XUAN, X.; CHAHAN, B.; HUANG, X.; YOKOYAMA, N.; MAKALA, L.H.; IGARASHI, I.; FUJISAKI, K.; MARUYAMA, S.; SAKAI, T.; MIKAMI, T.; Diagnosis of equine piroplasmosis in Xinjiang province of China by the enzyme-linked immunosorbent assays using recombinant antigens. **Veterinary Parasitology**, v.108, p.179-182, 2002.

ZWART, D.; BROCKLESBY, D. W. Babesiosis: Non-specific Resistance, Immunological Factors and Pathogenesis. **Advances in Parasitology**, v.17, p.49-113, 1979.