



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

THÁLLITHA SAMIH WISCHRAL JAYME VIEIRA

**SOROEPIDEMIOLOGIA DA PIROPLASMOSE EQUINA EM  
EQUINOS DE ASSENTAMENTO RURAL E CARROCEIROS  
EM REGIÕES DO PARANÁ**

---

Londrina  
2013

THÁLLITHA SAMIH WISCHRAL JAYME VIEIRA

**SOROEPIDEMIOLOGIA DA PIROPLASMOSE EQUINA EM  
EQUINOS DE ASSENTAMENTO RURAL E CARROCEIROS  
EM REGIÕES DO PARANÁ**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Prof. Dr. Odilon Vidotto

Londrina  
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação -na-Publicação (CIP)**

V658s Vieira, Thállitha Samih Wischral Jayme.  
Soroepidemiologia da piroplasmose equina em equinos de assentamento rural e carroceiros em regiões do Paraná / Thállitha Samih Wischral Jayme Vieira. – Londrina, 2013.  
65 f. : il.

Orientador: Odilon Vidotto.  
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2013.  
Inclui bibliografia.

1. Cavalo – Doenças – Teses. 2. Babesiose em cavalo – Teses. 3. Protozoologia veterinária – Teses. 4. Doenças transmitidas por carrapato – Teses. I. Vidotto, Odilon. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619:636.1

THÁLLITHA SAMIH WISCHRAL JAYME VIEIRA

**SOROEPIDEMIOLOGIA DA PIROPLASMOSE EQUINA EM EQUINOS  
DE ASSENTAMENTO RURAL E CARROCEIROS EM REGIÕES DO  
PARANÁ**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de  
Mestre em Ciência Animal (Área de Concentração:  
Sanidade Animal) da Universidade Estadual de  
Londrina.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Odilon Vidotto  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Roberta Lemos Freire  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Selwyn Arlington Headley  
Universidade Norte do Paraná – UNOPAR

Londrina, 22 de fevereiro de 2013.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Protozoologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal), sob orientação do Prof. Dr. Odilon Vidotto.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento à pesquisa, abaixo relacionados:

- 1. CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico / MCT**
- 2. FAP/PR: Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná / SETI**

\*\*\*\*\*DEDICQ

---

À minha filha Júlia  
Ao meu esposo Rafael  
Aos meus pais Sergio e Lilliam

## AGRADECIMENTOS

---

A Deus, por sua constante presença, sempre me iluminando na direção correta.

Ao meu amado esposo Rafael Vieira, que me incentivou a seguir esse caminho com muito companheirismo e dedicação. Agradeço por estarmos sempre juntos dividindo momentos de indecisão, agústias e vitórias. Sem você nada disso seria possível. Amo muito você.

A minha filha Júlia Jayme, que tanto se conformou com minha ausência no decorrer de todo o percurso. Agradeço por seu amor, compreensão e paciência.

Aos meus pais, responsáveis por minha formação profissional e meu caráter. Agradeço por terem me mostrado os valores da vida.

À minha irmã Jamilah e meus padrinhos Rose e Amaral por estarem presentes em todas as minhas conquistas.

Ao meu orientador professor Dr. Odilon Vidotto, pelos ensinamentos e oportunidade de realizar este trabalho e, principalmente, pela confiança depositada em mim.

Ao professor Dr. Alexander Biondo, pelos grandes conselhos, amizade e preocupação com minha família.

Ao meu segundo pai professor Dr. Antonio Carlos Faria dos Reis, pelo enorme carinho e apoio profissional.

Aos meus sogros Luiz Carlos e Marilene, cunhada Bárbara Vieira (a mais linda cunha do meu core), sobrinha Gabriela Magalhães, tia Maria e Mila pelo apoio, preocupação e torcida.

Às minhas amigas: Ana Cláudia Gritz, Renata Tissi, Camila Marcon, Fernanda Ferraz e Patrícia Mara, que mesmo muito longe continuam torcendo por mim e que sempre estarão no meu coração.

À professora Dra. Daisy Pontes-Netto, por ter me lançando desafios necessários à minha formação profissional.

Aos meus colegas de Laboratório: Denise Nascimento, Jonatas Almeida, Aldair Matos, Dennys Higashi, Daniel Belussi e Rafaela Buosi, pela ajuda para concretizar este trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente tenham colaborado e apoiado para a realização deste trabalho.

---

VIEIRA, T.S.W.J. **Soroepidemiologia da piroplasmose equina em equinos de assentamento rural e carroceiros em regiões do Paraná.** 2013. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal, Área de Concentração: Sanidade Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2013.

A piroplasmose equina é causada por *Theileria equi* e *Babesia caballi*, que são importantes hemoprotozoários transmitidos por carrapatos, e causam impacto mundial na indústria equina. A enfermidade pode ocorrer de forma aguda, subaguda ou crônica. A infecção subclínica é frequente em áreas endêmicas e os animais que se recuperam da infecção primária usualmente tornam-se portadores e atuam como disseminadores da doença. Devido à importância dos cavalos na manutenção da piroplasmose equina, bem como o risco de introdução de tais organismos em zonas livres da enfermidade, o objetivo do presente estudo foi detectar anticorpos contra *T. equi* e *B. caballi* em populações de cavalos expostos a picadas de carrapatos na região norte e centro-sul do estado do Paraná, sul do Brasil. Assim, 198 amostras de soro de cavalos de diferentes raças, idades e sexos foram analisadas utilizando-se kit comercial de ELISA de competição (cELISA). Na região norte, foram coletadas amostras de sangue de 32 cavalos de uma assentamento rural e de 24 cavalos de carroceiros da cidade de Londrina. Na região centro-sul, foram coletadas 142 amostras de sangue de cavalos de carroceiros: Colombo (n = 48), Pinhais (n = 76) e Curitiba (n = 18). Um total de 193/198 (97,5%) cavalos foram soropositivos para pelo menos um piroplasma. Anticorpos anti-*T. equi* foram encontrados em 155/198 (78,3%) cavalos, 137/198 (69,2%) foram soropositivos para *B. caballi* e 99/198 (50,0%) para ambos patógenos. Cavalos que vivem em Colombo e Londrina apresentaram mais chances de serem soropositivos para *T. equi* que aqueles que vivem em Curitiba (p < 0,05). Além disso, cavalos > 10 anos e 5-10 anos apresentaram mais chance de serem soropositivos para *T. equi* do que aqueles <5 anos (p < 0,05). Não foi observada associação significativa entre sexo ou presença de carrapatos, e soropositividade para *T. equi* (p > 0,05). Concluindo, a alta soroprevalência de *T. equi* e *B. caballi* encontrada reforça a importância de programas de vigilância ativa em áreas endêmicas, uma vez que estes cavalos podem atuar como carreadores desses piroplasmas.

**Palavras-chave:** Equinos, babesiose, *Babesia caballi*, *Theileria equi*, cELISA, coinfeção

## ABSTRACT

---

VIEIRA, T.S.W.J. **Seroepidemiology of equine piroplasmosis in horses from a rural settlement and cart horses in regions of Paraná State.** 2013. 65p. Dissertation (Marter's Degree in Animal Science) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2013.

Equine piroplasmosis is caused by *Theileria equi* and *Babesia caballi*, which are important tick-borne hemoprotozoan, and cause impact to the equine industry worldwide. The disease can occur as an acute, subacute or chronic forms. Subclinical infection is common in endemic areas and animals that recover from primary infection usually become carriers and act as disseminate the disease. Due to the importance of horses in the maintenance of equine piroplasmosis, as well as the risk of introduction of these organisms into diseases-free areas, the aim of the present study was to detect antibodies against *T. equi* and *B. caballi* in a horse population highly exposed to tick bites in north and south-central region of Paraná State, southern Brazil. Thus, serum samples from 198 horse from different breeds, ages, and gender were analyzed by using a commercial competitive ELISA (cELISA) kit. In the north region, blood samples were collected from 32 horses from a rural settlement and 24 carthorses from Londrina city. In the south-central region, 142 blood samples from cart horses from: Colombo (n=48), Pinhais (n=76), and Curitiba city (n=18) were collected. A total of 193/198 (97.5%) horses were seropositive for at least one piroplasm. Antibodies anti-*T. equi* were found in 155/198 horses (78.3%), 137/198 (69.2%) were seropositives for *B. caballi* and 99/198 (50%) for both pathogens. Horses living in Colombo and Londrina were more likely to be seropositive for *T. equi* than those living in Curitiba ( $p < 0.05$ ). In addition, horses  $>10$  years and 5-10 years were more likely to be seropositive for *T. equi* than those  $<5$  years ( $p < 0.05$ ). No significant association was found between gender or presence of ticks, and seropositivity to *T. equi* ( $p > 0.05$ ). In conclusion, the high seroprevalence of *B. caballi* and *T. equi* found reinforce the importance of active surveillance programs in endemic areas, since these horses may act as carriers of these piroplasms.

**Keywords:** Equine, babesiosis, *Babesia caballi*, *Theileria equi*, cELISA, coinfection

**Introdução Geral**

**Figura 1.** Ciclo biológico de *Theileria equi*..... 17

**Seroepidemiological survey of equine piroplasmosis in horses from rural and urban areas of Paraná State, southern Brazil.**

**Fig. 1.** Geographical location used in the study: Alvorada do Sul county, Londrina, Colombo, Pinhais, Curitiba, State of Paraná, southern Brazil, 2011 .....49

**Seroepidemiological survey of equine piroplasmosis in horses from rural and urban areas of Paraná State, southern Brazil.**

**Table 1.** Serological prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses within each variable studied from Paraná State, southern Brazil, 2011  
.....50

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>14</b>
<b>PIROPLASMOSE</b> .....	<b>15</b>
Etiologia.....	15
Ciclo .....	16
Transmissão .....	17
Epidemiologia .....	18
Patogenia .....	20
Diagnóstico.....	21
Referências.....	23
<b>3. OBJETIVOS</b>	
3.1. Objetivo geral .....	36
3.2. Objetivos específicos .....	36
<b>4. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO</b>	
4.1. Seroepidemiological survey of <i>Theileria equi</i> and <i>Babesia caballi</i> in horses from rural and urban areas of Paraná State, southern Brazil.....	38
Abstract.....	38
Introduction .....	38
Material and Methods.....	40
Cross-sectional study .....	40
Samples .....	41
Detection of antibodies against <i>Theileria equi</i> and <i>Babesia caballi</i> .....	42
Statistical analysis.....	42
Results .....	42
Discussion .....	43
Conflict of interest statement .....	45
Acknowledgments.....	45
References .....	46
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>52</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>53</b>
ANEXO A .....	54
ANEXO B .....	56
ANEXO C: PROTOCOLO <i>THEILERIA EQUI</i> .....	57
ANEXO D: PROTOCOLO <i>BABESIA CABALLI</i> .....	59
<b>APÊNDICES</b> .....	<b>61</b>
APÊNDICE A: Questionários Epidemiológicos.....	62
APÊNDICE B: Mapas .....	625



## INTRODUÇÃO

---

A piroplasmose ou babesiose é uma enfermidade causada por protozoários de multiplicação intra-eritrocitária do gênero *Babesia* spp. Desde a descoberta do gênero no final do século XIX, várias espécies têm sido descritas em animais domésticos e silvestres e ocasionalmente no homem, com diversas espécies de carrapatos atuando como vetores (VIDOTTO et al., 1997; CHAUVIN, et al., 2009).

Em equídeos, *Babesia equi* e *Babesia caballi* são os agentes etiológicos da piroplasmose. Entretanto, devido a diferenças baseadas no modo de transmissão e nas células de multiplicação dentro do hospedeiro, foi proposta a reclassificação de *B. equi* no gênero *Theileria* e esta recebeu a nomenclatura de *Theileria equi* (MEHLHORN & SCHEIN, 1998).

A doença pode se apresentar de forma aguda a crônica e os animais que se recuperam tornam-se portadores. As manifestações clínicas mais graves são observadas na infecção por *T. equi*, que incluem anemia, hemoglobinúria, icterícia e variam em severidade dependendo do grau de hemólise (KNOWLES JR. et al., 1991; ROTHSCHILD; KNOWLES, 2007). Em animais imunossuprimidos ou expostos a estresse ocorre reagudização da doença e os equinos podem apresentar sinais clínicos (CUNHA et al., 1998; BOTTEON et al., 2005).

A América do Sul é considerada endêmica para a doença e a soroprevalência varia de 22,1 (NIZOLI et al., 2008) a 100% para *T. equi* (BALDANI et al., 2010) e 21,6 (KERBER et al., 2009) a 70.6% para *B. caballi* (MUJICA et al., 2011). No Brasil, os carrapatos vetores da babesiose equina são *Dermacentor (Anocenter) nitens* (BORGES et al., 2000; ROTHSCHILD; KNOWLES, 2007) e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (BATTSETSEG et al., 2002; UETI et al., 2008), porém acredita-se que *Amblyomma cajennense* também esteja envolvido na transmissão (KERBER et al., 2009).

A importância dos equinos no Brasil é decorrente das várias funções desempenhadas por esta espécie, tanto em áreas rurais como urbanas. Selecionado para auxílio da condução do gado em fazendas (MOTA et al., 2006) e esportes hípicas, principalmente para competições de salto, enduro e corridas, sua utilidade vem sendo aprimorada (SILVA et al., 2009). Dentre os grandes prejuízos causados pela babesiose, destaca-se a diminuição de desempenho e mortalidade dos animais, com conseqüente perda financeira (FRIEDHOFF et al., 1990). As maiores perdas econômicas e sanitárias são relacionadas à transferência de animais de áreas livres ou de instabilidade enzoótica para regiões endêmicas e a introdução de equinos carreadores em áreas com vetores competentes (SANTOS et al., 2011).

No Brasil poucos estudos envolvendo *T. equi* e *B. caballi* foram realizados e inexistem dados sobre a piroplasmose equina no estado do Paraná. Além disso, a abordagem na maioria das pesquisas epidemiológicas efetuadas até hoje, ocorreram com equinos de alto valor financeiro, não sendo conhecido o comportamento desses patógenos em equinos de carroceiros.



## PIROPLASMOSE

---

A piroplasmose ou babesiose equina, causada por hemoprotozoários das espécies *Babesia caballi* e *Theileria equi* (anteriormente *Babesia equi*) (NUTALL; STRICKLAND, 1912), está associada à distribuição dos carrapatos vetores, sendo endêmica na maioria das regiões tropicais, subtropicais e algumas regiões temperadas (ABUTARBUSH et al., 2012). A enfermidade acomete mundialmente equinos, asininos, muares e zebras e pode ocorrer de forma aguda, subaguda ou crônica (KUMAR et al., 2008). A severidade dos sinais clínicos é variável, porém nas regiões endêmicas a doença é frequentemente subclínica e os animais que se recuperam de uma infecção primária podem tornar-se carreadores por um longo período (GARCÍA-BOCANEGRA et al., 2012). Assim, o prejuízo acarretado é relacionado tanto à patogenia da doença como ao impacto econômico, devido aos custos com tratamento e à restrição do comércio internacional dos animais soropositivos (FRIEDHOFF et al., 1990).

### **Etiologia**

Anteriormente as espécies envolvidas na piroplasmose equina foram classificadas exclusivamente como membros do gênero *Babesia* (*B. equi* e *B. caballi*), filo Apicomplexa e família Piroplasmidae (URQUHART et al., 1990). *B. caballi*, inserida no grupo das "grandes babesias", é conhecida como verdadeira babesia, pois sua replicação ocorre exclusivamente dentro de eritrócitos. Apesar de *B. equi* anteriormente ser conhecida como "pequena babesia", estudos recentes baseados em diferenças biológicas desta espécie, como multiplicação primária em linfócitos, ausência de transmissão transovariana nos carrapatos e similaridades com membros do gênero *Theileria*, sugeriram sua reclassificação taxonômica como *T. equi* (MEHLHORN & SCHEIN, 1998). Entretanto, análises filogenéticas, utilizando subunidade de RNA ribossomal (rRNA) e proteínas de superfície de protozoários de ambas famílias,

indicam que *T. equi* pode representar um grupo distinto tanto de *Babesia* como de *Theileria* (KAPPMAYER et al., 1993; ALLSOPP et al., 1994; KATZER et al., 1998). Atualmente, foram identificados 50 genes que podem ser úteis para a classificação filogenética definitiva de *T. equi* (KAPPMAYER et al. 2012), assim, sua classificação permanece em discussão.

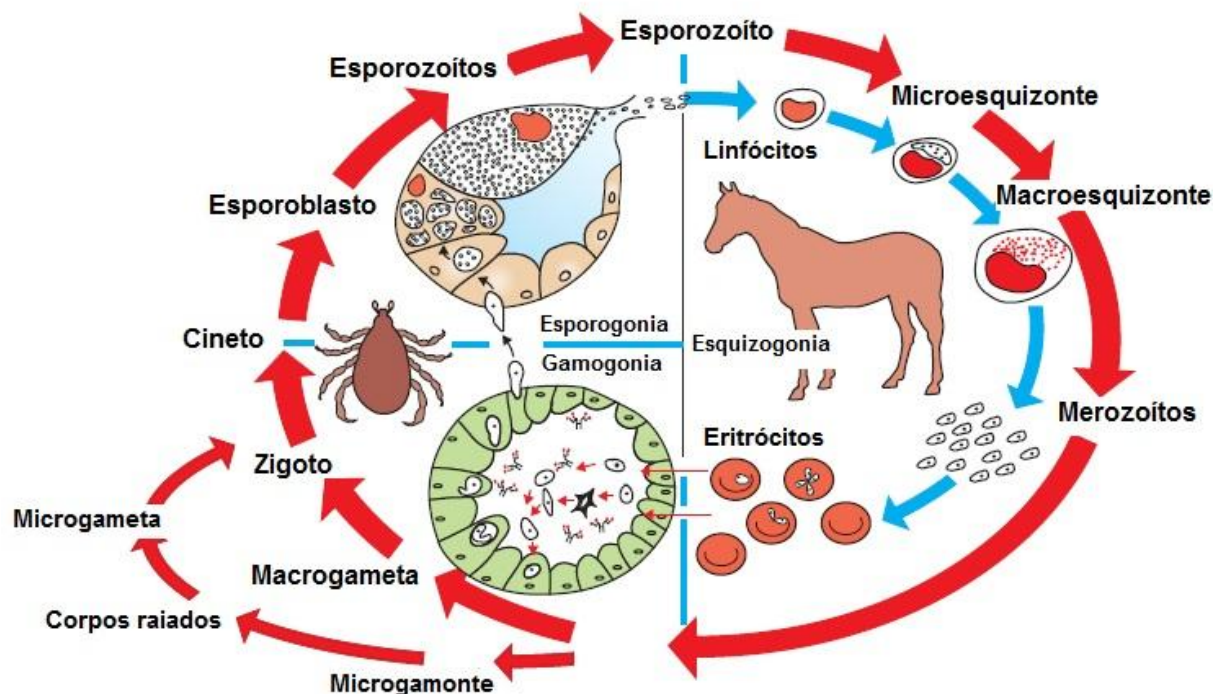
### **Ciclo**

O ciclo biológico da *B. caballi* é comum à maioria das espécies de *Babesia* e compreende três fases: esquizogonia, gametogonia e esporogonia. Na esquizogonia, os esporozoítos (forma infectante) inoculados por carrapatos ixodídeos durante o repasto sanguíneo, invadem os eritrócitos e desenvolvem-se em trofozoítos, os quais dividem-se por fissão binária gerando dois merozoítos piriformes que medem de 2 a 5  $\mu\text{m}$ . Após multiplicação e destruição eritrocitária, os merozoítos livres no plasma invadem novos eritrócitos (URQUHART et al., 1990). As fases de gametogonia e esporogonia ocorrem no interior do carrapato e iniciam após a ingestão dos eritrócitos infectados. A gametogonia ocorre no intestino com a multiplicação dos gametas para a formação de micro e macrogametas que se fundem originando os zigotos. No interior dos zigotos formam-se o cinetos, que são transportados através da hemolinfa e penetram nas glândulas salivares dos carrapatos originando os esporoblastos e, por fim, os esporozoítos que serão inoculados no hospedeiro (ROTHSCHILD; KNOWLES, 2007).

O ciclo de *T. equi* apresenta um estágio adicional, o qual inclui a invasão inicial dos linfócitos pelos esporozoítos formando macro e microesquizontes que evoluem para merozoítos (Figura 1). A esquizogonia intra-eritrocitária ocorre após a liberação dos merozoítos que desenvolvem organismos piriformes de 2 a 3  $\mu\text{m}$  e podem formar uma estrutura típica conhecida como “Cruz de Malta” (SCHEIN et al., 1981; FRIEDHOFF et al., 1990). O ciclo do parasito no carrapato é limitado a uma geração, fazendo com que equinos

portadores sejam o reservatório da infecção e os responsáveis pela manutenção de uma área endêmica.

O período de incubação é de 12 a 19 dias quando causado por *T. equi* e de 10 a 30 dias quando causado por *B. caballi* (ALLSOPP et al., 1994). A parasitemia normalmente não excede a 1% de eritrócitos parasitados no caso de *B. caballi* e dificilmente causa óbito dos animais (ROTHSCHILD; KNOWLES, 2007). No caso de *T. equi* a parasitemia pode variar de 7% a 80% de eritrócitos infectados (KERBER et al., 1999).



**Figura 1.** Ciclo biológico de *Theileria equi*.<sup>1</sup> (Adaptada de ROTHSCCHILD; KNOWLES, 2007).

### Transmissão

*T. equi* e *B. caballi* são transmitidas naturalmente através de carrapatos pertencentes à família Ixodidae por aproximadamente 14 espécies dos gêneros *Dermacentor*, *Rhipicephalus* e *Hyalomma* (MUJICA et al., 2011). *T. equi* e *B. caballi* compartilham muitos dos mesmos vetores e frequentemente equinos são co-infectados, porém algumas espécies de carrapatos

<sup>1</sup>O ciclo de *Babesia caballi* é similar exceto pelo estágio pré-eritrocitário em linfócitos

podem transmitir *B. caballi* por via transestadial e transovariana. Entretanto, os equinos são os únicos portadores de *T. equi* e sua transmissão ocorre somente via transestadial (ROTHSCHILD; KNOWLES, 2007).

No Brasil, *B. caballi* e *T. equi* são transmitidas pelos carrapatos das espécies *Anocentor nitens* (BORGES et al., 2000) e *Rhipicephalus microplus* (BATTSETSEG et al., 2002), respectivamente. Estudos soroepidemiológicos sugerem o envolvimento de *Amblyoma cajennense* na transmissão de *T. equi* (KERBER et al., 2009), contudo, esta transmissão não foi comprovada em estudos experimentais (RIBEIRO et al., 2011). Foi relatada a transmissão de *T. equi* pelo *A. cajennense* em equinos do estado do Texas, EUA (SCOLES et al., 2011).

Carrapatos da espécie *R. microplus* podem se infectar por *T. equi* em cavalos portadores com baixa parasitemia e transmití-los a cavalos suscetíveis. Nos vetores, a transmissão de *T. equi* é transestadial, não ocorrendo transmissão transovariana (UETI et al., 2008). *T. equi* pode também ser transmitida iatrogenicamente por fômites ou transmissão transplacentária (DE WALL, 1992; ALLSOPP et al., 2007). A transmissão de *B. caballi* pelo carrapato *A. nitens* ocorre pelas vias transovariana transestadial (FRIEDHOFF & SOULE, 1996; SCHWINT et al., 2006).

Estudos epidemiológicos em criações de equinos revelaram elevada infestação pelos carrapatos *A. nitens*, *A. cajennense* e *R. microplus* (LABRUNA et al., 2001). Além disso, altas prevalências de *T. equi* têm sido associadas com a criação conjunta de equinos e bovinos, devido a presença do *R. microplus* (KERBER et al., 1999; HEUCHERT et al., 1999).

## **Epidemiologia**

Vários estudos têm sido conduzidos a fim de elucidar a distribuição, transmissão e a prevalência da piroplamose equina, porém os resultados variam de acordo com tipo e tamanho

da amostra, fatores regionais e teste diagnóstico utilizado, assim, os dados devem ser cuidadosamente interpretados.

A distribuição geográfica e a prevalência de *B. caballi* e *T. equi* é determinada pela distribuição dos carrapatos vetores (KNOWLES JR et al., 1992). As duas espécies são endêmicas na maioria das regiões tropicais e subtropicais, incluindo partes da África, Oriente Médio, Ásia, América Central, América do Sul (exceto sul da Argentina e Chile) e em menor grau em algumas regiões temperadas, como partes da Europa (FRIEDHOFF & SOULE, 1996). Poucos países, como Austrália, Nova Zelândia, Canadá, Japão são considerados livres da doença. A piroplamose equina foi erradicada dos Estados Unidos na década de 1980, poucos casos foram relatados desde então, mas o risco de se tornar endêmica é constante devido à existência dos carrapatos vetores (OIE, 2008). Scoles et al., 201, descreveram a ocorrência de um surto de *T. equi* no Texas e 75.8% dos equinos testados foram considerados positivos. Para impedir a entrada de animais soropositivos são mantidas rigorosas medidas de controle, como uso de testes de diagnóstico, controle de carrapatos e quarentena (OIE, 2008).

Estudos prévios relatam que a soroprevalência para *T. equi* é maior do que para *B. caballi*. Assim, utilizando diferentes métodos sorológicos, anticorpos contra *T. equi* e *B. caballi* foram detectados, respectivamente, em 21,6% e 54,1% equinos em Israel (STEINMAN et al., 2012), 45,2% e 27,4% no México (CANTÚ-MARTÍNEZ et al., 2012), 14,6% e 0% na Jordânia (ABUTARBUSH et al., 2012), 50,3% e 70,6% na Venezuela (MUJICA et al., 2011), 8,2% e 0,3% na Itália (GRANDI et al., 2011), 56,1% e 13,2% na Espanha (GARCÍA-BOCANEGRA et al., 2012), e 40% e 24,3% na China (XUAN et al., 2002).

No Brasil, a maioria dos estudos abordam a soroprevalência de *T. equi* e demonstraram soropositividade em 73.6% a 100% de equinos avaliados no Rio de Janeiro (BARBOSA et al., 1995; BITTENCOURT, MASSARD, 1997; BOTTEON et al., 2002;

SANTOS et al., 2011), 22,1% a 57,89 no Rio Grande do Sul (CUNHA et al., 1996; GOLYNSKI et al., 2008; NIZOLI et al., 2008), 50,38% em Santa Catarina, 60,6% em Minas Gerais (RIBEIRO et al., 1999) e 100% em São Paulo (BALDANI et al., 2010). Outra pesquisa conduzida em São Paulo e Mato Grosso do Sul demonstraram que 81% dos equinos avaliados foram soropositivos para *T. equi* e 90% para *B. caballi* (XUAN et al., 2001), porém quando avaliado equinos somente do estado de São Paulo anticorpos contra *T. equi* foram encontrados em 21,6 a 28,5% dos equinos e 54,1 a 68,2% soropositivos para *B. caballi* (HEUCHERT et al., 1999; KERBER et al., 1999; KERBER et al., 2009).

### **Patogenia**

A enfermidade pode causar anemia, hemoglobinúria, icterícia, e estes sinais variam em severidade dependendo do grau de hemólise, sendo mais grave na infecção por *T. equi*. Na fase aguda da doença, os equinos suscetíveis, apresentam picos febris intermitentes, anemia, petéquias de mucosas, hemoglobinúria e icterícia, e em geral, os animais recuperam-se e permanecem portadores deste hemoparasita (KNOWLES JR. et al., 1991; ROTHSCHILD; KNOWLES, 2007).

Na fase crônica, a parasitemia é baixa e não há alteração significativa do hematócrito. Os sinais clínicos são inespecíficos e podem incluir inapetência, perda de peso e queda no desempenho físico e reprodutivo. A produção de anticorpos é idade dependente, ou seja, equinos mais velhos apresentam uma resposta sorológica mais rápida e com títulos mais altos (REHBEIN; HEIDRICH-JOSWIG, 1983). Entretanto, animais submetidos à imunossupressão podem apresentar reagudização da doença e apresentar sinais clínicos (CUNHA et al., 1997; BOTTEON et al., 2005).

A infecção por *B. caballi* é pouco estável e acredita-se que seja auto limitante com duração de até quatro anos após seu início. Já nas infecções por *T. equi*, os animais

provavelmente permanecem com o agente durante toda vida. Dessa forma, os animais representam um risco potencial da manutenção e disseminação dos parasitos (DE WALL; VAN HEERDEN, 1994).

### **Diagnóstico**

O diagnóstico é comumente realizado pela pesquisa dos piroplasmas no exame do esfregaço sanguíneo de rotina utilizando colorações do tipo Romanowsky (Giemsa, May-Grunwald-Giemsa, Wright, Wright-Giemsa e Panóptico Rápido) (BÖSE et al., 1995). Apesar desta técnica ser confirmatória e ser rotina clínico-laboratorial no Brasil, a citologia de esfregaço sanguíneo apresenta baixa sensibilidade, o que a torna ineficaz na fase crônica da enfermidade, quando os animais geralmente apresentam baixas parasitemias (DE WALL et al., 1987; CUNHA et al., 1998). Assim, a detecção de anticorpos específicos representa o parâmetro mais confiável para o diagnóstico, porém, em potros deve ser cautelosa, pois anticorpos maternos persistem de um a cinco meses para *T. equi* e de um a quatro meses para *B. caballi* (HEUCHERT et al., 1999).

A utilização de testes sorológicos para o diagnóstico de *T. equi* baseia-se no fato de que o título de anticorpos específicos é diretamente relacionado com a multiplicação do parasita, mesmo durante baixas parasitemias (CUNHA et al., 1998), porém apresentam algumas limitações (ROTHSCHILD; KNOWLES, 2007).

O teste de fixação de complemento (TFC) era considerado como o método de referência para a detecção de anticorpos anti-*T. 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 anticomplemento estão presentes no soro (KNOWLES JR et al., 1992).

A IFI (Imunofluorescência Indireta) é sensível e específica na detecção de anticorpos anti-*T. 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, testes de ELISA para o diagnóstico de *T. equi* têm apresentado limitada sensibilidade e alguns apresentam 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, testes de ELISA competitivo (cELISA) utilizando antígenos recombinantes (EMA-1 para *T. equi* e RAP-1 para *B. caballi*) e anticorpos monoclonais específicos (MAb 36/133.97 para *T. equi* e MAb 79/17.18.5 para *B. caballi*) foram desenvolvidos (KNOWLES JR et al., 1991; KAPPMAYER et al., 1999; CUNHA et al., 2002) e atualmente são recomendados como métodos de diagnóstico definitivo para piroplasmose equina pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2008).

Métodos moleculares (PCR, nested-PCR e PCR em tempo real) têm se mostrado uma ferramenta útil para a detecção do DNA de *B. caballi* e *T. equi* em amostras de sangue de equinos (NICOLAIEWSKY et al., 2001; RAMPERSAD et al., 2003; ALHASSAN et al., 2005), e apresentam maior sensibilidade e especificidade que os métodos sorológicos. Estas técnicas, no entanto, por envolverem equipamentos e pessoal especializados não são rotineiramente utilizadas em muitos laboratórios de diagnóstico.

## Referências

ABUTARBUSH, S.M.; ALQAWASMEH, D.M.; MUKBEL, R.M.; AL-MAJALI, A.M. Equine babesiosis: seroprevalence, risk factors and comparison of different diagnostic methods in Jordan. *Transboundary and Emerging Diseases*, v.59, p.72-78, 2012.

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

ALLSOPP, M.T.E.P.; LEWIS, B.D.; PENZHORN, B.L. Molecular evidence for transplacental transmission of *Theileria equi* from carrier mares to their apparently healthy foals. *Veterinary Parasitology*, v.148, p.130–136, 2007.

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.

BALDANI, C.D.; NAKAGHI, A.C.H.; MACHADO, R.Z. Occurrence of *Theileria equi* in horses raised in the Jaboticabal microregion, São Paulo State, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.19, n.4, p.228-232, 2010.

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

BATTSETSEG, B.; LUCERO, S.; XUAN, X.; CLAVERIA, F.G.; INOUE, N.; ALHSSAN, 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.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L. Aspectos epidemiológicos da babesiose equina na Microregião Fluminense do Grande Rio-Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, Niterói, v.4, n.1, p.13-17, 1997.

BORGES, L.M.F.; OLIVEIRA, P.R.; RIBEIRO, M.F.B. Seasonal dynamics of *Anocentor nitens* on horses in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.89, p.165–171, 2000.

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

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

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

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.

CANTÚ-MARTÍNEZ, M.A.; SEGURA-CORREA, J.; SILVA-PÁEZ, M.L.; AVALOS-RAMÍREZ, R.; WAGNER, G.G. Prevalence of antibodies to *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses from Northeastern Mexico. *The Journal of Parasitology*, v.98, n.4, p.869-870, 2012.

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

CUNHA, C.W.; KAPMEYER, 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. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v.9, p.1301-1306, 2002.

CUNHA, C.W.; SILVA, S.S.; OSÓRIO, B.L.; DUTRA, C.L. Alterações hematológicas e sorológicas em equinos experimentalmente infectados com *Babesia equi*. *Ciência Rural*, v.28, n.2, p.283-286, 1998.

CUNHA, C.W.; SILVA, S.S.; PIMENTEL, C.A.; DAPPER, E. Avaliação da frequência de equinos soropositivos a *Babesia equi* no Jockey Clube de Pelotas e em dois Haras da zona sul

do Rio Grande do Sul, RS. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.5, p.119-22, 1996.

CUNHA, C.W.; SILVA, S.S; RODRIGUES, A.L.; GUERREIRO, G. Avaliação do efeito da espelnectomia em equinos portadores e livres de *Babesia* spp. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.6, n.2, p.157-160, 1997.

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

DE WAAL, D.; VAN HEERDEN, J. Equine babesiosis. In: Coetzer, J., Thomson, G., Tustin, R. (Ed.) *Infectious diseases of livestock with special reference to south Africa*, vol 1. Oxford University Press, Cape Town, South Africa, pp. 293-304, 1994.

DE WALL, 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*. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v.54, n.4, p.561-568, 1987.

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.

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.; 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 in international trade of horses. *Revue Scintifique et Technique*, v.9, p.1187-1194, 1990.

GARCÍA-BOCANEGRA, I.; ARENAS-MONTES, A.; HERNÁNDEZ, E.; ADASZEK, L.; CARBONERO, A.; ALMERÍA, S.; JAÉN-TÉLLEZ, J.A.; GUTIÉRREZ-PALOMINO, P. Seroprevalence and risk factors associated with *Babesia caballi* and *Theileria equi* infection in equids. *The Veterinary Journal*, in press, 2012.

GOLYNSKI, A.A.; FERNANDES, K.R.; BALDANI, C.D.; GOLYNSKI, A.L.; MADEIRO, A.S.; MACHADO, R.Z.; BOTTEON, P.T.L.; MASSARD, C.L. Estudo soroepidemiológico da *Babesia equi* em equinos do estado do Rio Grande do Sul, Brasil determinado pelos testes de imunofluorescência indireta e ELISA. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.17, n.1, p.317-321. 2008.

GRANDI, G.; MOLINARI, G.; TITTARELLI, M.; SASSERA, D.; KRAMER, L.H. Prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infection in horses from Northern Italy. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v.11, n.7, p. 955-956, 2011.

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

JOYNER, L.P.; DONNELLY, J.; HUCK, R.A. Complement fixation tests for equine piroplasmiasis (*Babesia equi* and *B. caballi*) performed in the UK during 1976 to 1979. *Equine Veterinary Journal*, v.13, n.2, p.103-106, 1981.

KAPPMAYER, L.S.; PERRYMAN, L.E.; HINES, S.A.; BASZLER, T.V.; KATZ, J.B.; HENNAGER, S.G.; KNOWLES, D.P. Detection of equine antibody to *Babesia caballi* by recombinant *B. caballi* Rhostry-associated protein 1 in a competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, n.7., p.2285-2290, 1999.

KAPPMAYER, L.S.; PERRYMAN, L.E.; KNOWLES JR, D.P. A *Babesia equi* gene encodes a surface protein with homology to *Theileria* species. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.62, p.121-124, 1993.

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

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 piroplasmiasis in Brazil. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v.66, n.2, p.123-127, 1999.

KERBER, C.E.; LABRUNA, M.B.; FERREIRA, F.; DE WALL, D.T.; KNOWLES, D.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of equine piroplasmiasis and its association with tick infestation in the State of São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.18, n.4, p.1-8, 2009.

KNOWLES JR, D.P.; 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, n.12, p.3122-3126, 1992.

KNOWLES JR, D.P.; PERRYMAN, L.E.; KAPPMAYER, L.S.; HENNAGER, S.G. Detection of equine antibody to *Babesia equi* merozoite proteins by a monoclonal antibody-based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*, v.29, n.9, p.2056-2058, 1991.

KUMAR, S.; KUMAR, R.; GUPTA, A.K.; DWIVEDI, S.K. Passive transfer of *Theileria equi* antibodies to neonate foals of immune tolerant mares. *Veterinary Parasitology*, v.151, p.80-85, 2008.

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.

LABRUNA, M.B.; KERBER, C.E.; FERREIRA, F.; FACCINI, J.L.H.; DE WAAL, D.T.; GENNARI, S.M. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the state of São Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.97, p.1–14, 2001.

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

MOTA, M.D.S.; PRADO, R.S.A. ; SOBREIRO, J. Caracterização da população de cavalos Mangalarga no Brasil. *Archivos de Zootecnia*, v.55, n.209, p.31-37, 2006.

MUJICA, F.F.; PERRONE, T.; FORLANO, M.; CORONADO, A.; MELÉNDEZ, R.D.; BARRIOS, N.; ÁLVAREZ, R.; GRANDA, F. Serological prevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in hores of Lara State, Venezuela. *Veterinary Parasitology*, v.178, p.180-183, 2011.

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.; GÖTZE, M.M.; FÉLIX, S.R.; SILVA, S.S.; NOGUEIRA, C.E.W. Frequency of seropositive equines for *Theileria equi* in the Southern Rio Grande do Sul State, Brazil. *Parasitología Latinoamericana*, v.63, suppl.1/4, p.46-50, 2008.

NUTTALL, G.H.F.; STRICKLAND, C. On the occurrence of two species of parasites in equine piroplasmiasis or biliary fever. *Parasitology*, v.5, p.65-96, 1912.

OIE. Equine piroplasmiasis. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Disponível em: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.05.08\\_EQUINE\\_PIROPLASMOSIS.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.08_EQUINE_PIROPLASMOSIS.pdf) (accessed 06 November 2012).

RAMPERSAD, J.; CESAR, E.; CAMPBELL, M.D.; SAMLAL, M.; AMMONS, D. A field evaluation of PCR for the routine detection of *Babesia equi* in horses. *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, n.2, p.135-144, 1983.

RIBEIRO, M.F.B.; COSTA, J.O.; GUIMARÃES, A.M. Epidemiological aspects of *Babesia equi* in horses in Minas Gerais, Brazil. *Veterinary Research Community*, v.23, n.6, p.385-390, 1999.

RIBEIRO, M.F.B.; SILVEIRA, J.A.G.; BASTOS, C.V. Failure of the *Amblyomma cajennense* nymph to become infected by *Theileria equi* after feeding on acute or chronically infected horses. *Experimental Parasitology*, v.128, p.324–327, 2011.

ROTHSCHILD, C.M.; KNOWLES, D. P. Equine piroplasmiasis. In: SELTON; LONG. *Equine Infectious Diseases*. cap.60, p.465-473, 2007.

SANTOS, T.M.; ROIER, E.C.R.; SANTOS, H.A.; PIRES, M.S.; VILELA, J.A.R.; MORAES, L.M.B.; ALMEIDA, F.Q.; BALDANI, C.D.; MACHADO, R.Z.; MASSARD, C.L. Factors associated to *Theileria equi* in equids of two microregions from Rio de Janeiro, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.20, n.3, p.235-241, 2011.

SCHEIN, E.; REHBEIN, G.; VOIGT, W.P.; ZWEYGARTH, E. *Babesia equi* (Laveran 1901). Development in horses and in lymphocyte culture. *Tropenmed Parasitology*, v.32, n.4, 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.

SCHWINT, O.N; KNOWLES, D.P.; UETI, M.W.; KAPPMAYER, L.S.; SCOLES, G.A. Transmission of *Babesia caballi* by *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) is Restricted to one generation in the absence of alimentary reinfection on a susceptible equine host. *Journal of Medical Entomology*, v.45, n.6, p.1152-1155, 2008.

SCOLES, G.A.; HUTCHESON, H.J.; SCHLATER, J.L.; HENNAGER, S.G.; PELZEL, A.M.; KNOWLES, D.P. Equine piroplasmosis associated with *Amblyomma cajennense* ticks, Texas, USA. *Emerging Infectious Diseases*, v.17, n.10, p.1903-1905, 2011.

SHKAP, V.; COHEN, I.; LEBOVITZ, 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.

SILVA, M.A.G.; MARTINS, C.B.; GOMIDE, L.M.W.; ALBERNAZ, R.M.; QUEIROZ-NETO, A.; LACERDA-NETO, J.C. Determinação de eletrólitos, gases sanguíneos, osmolalidade, hematócrito, hemoglobina, base titulável e anion gap no sangue venoso de equinos destreinados submetidos a exercício máximo e submáximo em esteira rolante. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.61, n.5, p.1021-1027, 2009

SOUZA, A.P.; SARTOR, A.A.; BELLATO, V.; SILVA, A.B. Prevalência de anticorpos anti *Babesia equi* em equinos do Planalto Catarinense. *Ciência Rural*, v.30, n.1, p.119-120, 2000.

STEINMAN, A.; ZIMMERMAN, T.; KLEMENT, E.; LENSKY, I.M.; BERLIN, D.; GOTTLIEB, Y.; BANETH, G. Demographic and environmental risk factors for infection by *Theileria equi* in 590 horses in Israel. *Veterinary Parasitology*, v.6, p.558-562, 2012.

UETI, M.W.; PALMER, G.H.; SCOLES, G.A.; KAPPMAYER, L.S.; KNOWLES, D.P. Persistently infected horses are reservoirs for intrastadial tick-borne transmission of the apicomplexan parasite *Babesia equi*. *Infection and Immunity*, v.76, n.8, p.3525-3529, 2008.

URQUHART, G. M.; AEMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUN, A. M.; JENNINGS, F. W. *Parasitologia Veterinária*, Rio De Janeiro: Guanabara Koogan, 1998, p. 210-214.

VIDOTTO, O.; ANDRADE, G.M.; AMARAL, C.H.S.; BARBOSA, C.S.; FREIRE, R.L.; ROCHA, M.A.; VIDOTTO, M.C. Frequência de anticorpos contra *Babesia bigemina*, *B. bovis* e *Anaplasma marginale* em rebanhos leiteiros da região de Londrina, Paraná, *Artigo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.49, n.5, p.655-59, 1997.

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 immunorbent assays using recombinant antigens. *Veterinary Parasitology*, v.108, n.2, p.179-182, 2002.

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. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v. 63, n. 10, p.1159-1160, 2001.

WEILAND, G. Species-specific serodiagnosis of equi piroplasma infections by means of complement fixation test (CFT), immunofluorescence (IIF), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Veterinary Parasitology*, v.20, n.1-2, p.43-48, 1986.

**3. OBJETIVOS**

---

## OBJETIVOS

---

### 3.1. Objetivo geral

- Estudar aspectos epidemiológicos da piroplasmose em equinos do estado do Paraná.

### 3.2. Objetivos específicos

- Determinar a ocorrência de anticorpos contra *Theileria equi* e *Babesia caballi* em equinos de um assentamento rural da região norte e carroceiros das regiões norte e centro-sul utilizando um teste comercial de ELISA de competição (cELISA);
- Avaliar associação entre soropositividade para *T. equi* e *B. caballi* e variáveis de exposição;



#### 4.1. Seroepidemiological survey of equine piroplasmosis in horses from rural and urban areas of Paraná State, southern Brazil.

---

Artigo submetido ao periódico *Ticks and Tick-borne diseases*

##### Abstract

The aim of the present study was to evaluate seroepidemiological data of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in horses from a rural area (RA) and cart horses from urban areas (UA) of Paraná State, southern Brazil. A total of 198 horses, including 32 from RA and 166 from UA (Colombo, n=48, Pinhais, n=76, Londrina, n=24, and Curitiba, n=18) were sampled and tested using a commercial competitive inhibition ELISA (cELISA) test. One hundred ninety-three out of 198 (97.5%) horses were seropositive for at least one piroplasm. Antibodies for *T. equi* were found in 155/198 horses (78.3%), for *B. caballi* in 137/198 (69.2%) and for both in 99/198 (50.0%) horses. Horses living in Londrina and Colombo were more likely to be seropositive to *T. equi* than those living in Curitiba ( $p < 0.05$ ). Horses older than 10 years and 5-10 years were more likely to be seropositive for *T. equi* than those younger than 5 years ( $p < 0.05$ ). No significant association was found between gender or presence of ticks and seropositivity to *T. equi* ( $p > 0.05$ ). In conclusion, the high seroprevalence of *B. caballi* and *T. equi* found herein emphasized that active surveillance programs are crucial for monitoring animal health status, since particularly cart horses might act as urban disseminators of these piroplasms.

**Keywords:** *Theileria equi*, *Babesia caballi*, equine babesiosis, equine theileriosis, cELISA, co-infection

##### Introduction

Equine piroplasmosis (EP), caused by *Theileria equi* and *Babesia caballi*, is an important tick-borne disease which affects equids worldwide and cause significant impact to the equine

industry (Kerber et al., 2009; Mujica et al., 2011; Abutarbush et al., 2012; Rhalem et al., 2012; Short et al., 2012). The severity of clinical signs varies and might include fever, weight loss, anemia, hemoglobinuria, and jaundice in susceptible horses (Shein, 1988). Horses infected by *B. caballi* might spontaneously clear the organism, while this fact does not occur with *T. equi* organisms (De Waal et al., 1994). In endemic areas, horses with subclinical or those recovery from primary infection may become life-long carriers (De Waal, 1992), and thus, represent a risk of introduction of these organisms into disease-free areas. Alternatively, carrier horses may provide possibilities for these parasites to adapt and develop to new hosts, due to changes in distribution, population dynamics of ticks and their vertebrate host contact (Chauvin et al., 2009).

In Brazil, *B. caballi* is transmitted mainly by *Anocentor nitens* ticks (Roby et al., 1963), whereas *T. equi* is transmitted by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Battseg et al., 2002). In addition, evidences suggest that *Amblyomma cajennense* ticks are associated with *T. equi* infection in this country (Kerber et al., 2009). Serological surveys for *T. equi* and *B. caballi* have been conducted in horses from different countries with seroprevalence data, ranging, respectively, 21.6 and 54.1% in Israel (Steinman et al., 2012), 45.2 and 27.4% in Mexico (Cantú-Martinez et al., 2012), 8.2% and 0.3% in Italy (Grandi et al., 2011), 50.3 and 70.6% in Venezuela (Mujica et al., 2011) and 100% (Santos et al., 2011) and 90% (Xuan et al., 2001) in Brazil. However, seroprevalence data for both agents of EP in Brazil are still scarce and limited to few regions of the country (Heuchert et al., 1999; Xuan et al., 2001; Heim et al., 2007; Kerber et al., 2009). Thus, according to recommendations to identify EP carriers adopted by the World Organization for Animal Health (OIE, 2008), a commercial competitive enzyme-linked immunoabsorbent assay (cELISA) was used in the present study to determine the seroepidemiological data of *T. equi* and *B. caballi*, and possible associations

with presence of ticks, age and gender of horses from a rural settlement and cart horses from urban areas of Paraná State, southern Brazil.

## **Material and Methods**

The study was approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation and Animal Welfare at Universidade Estadual de Londrina (number 34/2011) and Universidade Federal do Paraná (number 027/2010), Paraná State, Brazil.

### **Study Design**

The study was carried out in five cities located in two regions (northern and south-central) of Paraná State, southern Brazil (Fig. 1).

In the northern region of Paraná, a rural settlement situated in Alvorada do Sul city (22° 54' 34.4" S 51° 13' 49.1" W), and an urban area of Londrina city (23° 08' 47" S e 51° 19' 11" W) were used. Both regions are subtropical climate, with rainfall throughout the year, but with a tendency of concentrating rains during the summer months and an average temperature of 25°C (INMET, 2011). The rural settlement is subdivided in 60 homesteads with an approximate area of 12 hectares each, totalizing 786 hectares. The area also comprises 20% of a native forest having a diverse fauna. In the urban area selected, cart horses live, rest, and graze next to an abandoned square, covered by a mixed overgrowth pasture composed by grass and undesired plants (bushes, scrubs) and a large number of ticks can be found throughout the year.

In the south-central region of Paraná, three urban areas were studied: Curitiba (25° 25' 47" S 49° 16' 19" O), Colombo (25° 17' 31" S, 49° 13' 26" W), and Pinhais (25° 26' 41" S 49° 11' 33" W). These cities are included in an extension project entitled 'Cart Horses' which target education activities for the prevention and control of zoonotic diseases.

These horses are used to pull carts and move around daily in the cities with their owners to collect recycling materials.

The sampling period was chosen based on the seasonal dynamics of adult *Amblyomma* ticks (Toledo et al., 2008). Thus, samples were collected during the early of the spring and to late of the summer, with the exception of samples from Curitiba, which were collected in the autumn.

### **Samples**

A total of 198 blood samples were collected from apparently healthy horses from different breeds, ages, and gender. In the northern region, a total population from a rural settlement were collected, totalizing 32 horses, and 24 cart horses were sampled from Londrina which . In the south-central region, 142 horses from urban areas: 48 from Colombo, 76 from Pinhais and 18 from Curitiba were sampled.

During the sampling, owners responded to an epidemiological questionnaire addressing: breed, age, gender, and presence of ticks. The age of the horses was stratified into groups of < 5 years, 5 –10 years and > 10 years (Abutarbush et al., 2012). From the total of 198 sampled horses, 108 were males and 90 females. Breeds included Appaloosa (1), Arabian (1), Crioulo (8), Mangalarga (13), Quarter Horse (2), Thoroughbred (2) and mixed breed (171) horses.

Blood samples (10 mL) were collected by venipuncture of jugular vein using a sterile vacuum tubes containing serum separator gel (BD, Vacutainer<sup>®</sup>, USA) and kept at room temperature (25°C) until visible clot retraction, centrifuged at 1500 g for 5 min and serum separated and stored at –20°C until serological analyses.

### **Detection of antibodies against *Theileria equi* and *Babesia caballi***

All 198 serum samples of horses were tested for *T. equi* and *B. caballi* using the commercial cELISA (VRMD Inc<sup>®</sup>, Pullman, WA, USA), which uses soluble antigens of *T. equi* and *B. caballi*. Optical density was measured using a wavelength of 630 nm and samples showing a percentage of inhibition  $\geq 40\%$  were considered positive.

### **Statistical analysis**

The Chi-square and/or Fisher's exact test was used for independent variables to determine the association between individual factors with seropositivity to *T. equi* and *B. caballi*. Odds ratio (OR), 95% confidence interval and *P* values were calculated separately for each variable. Results were considered significantly different when  $p < 0.05$ . Data were compiled and analyzed in Epi Info<sup>™</sup> Software (version 3.5.3).

### **Results**

A total of 193/198 (97.5%; 95% CI, 94.2 - 99.2%) horses were seropositive for at least one EP agent. Antibodies anti-*T. equi* and anti-*B. caballi* were found in 155/198 (78.3%; 95% CI: 71.9-83.8%) and 137/198 (69.2%; 95% CI: 62.3-75.5%) horses, respectively. Ninety-nine out of 198 (50.0%; 95% CI: 42.8-57.2%) horses were seropositive for both hemoparasites. Antibodies against *T. equi* were found in 27/32 (84.4%; 95% CI: 67.2 - 94.7%) of horses from RA, 22/24 (91.7%; 95% CI: 73.0 - 99.0%) from Londrina, 42/48 (87.5%; 95% CI: 74.8 - 95.3%) from Colombo, 53/76 (69.7%; 95% CI: 58.1 - 79.8) from Pinhais and 11/18 (61.1%; 95% CI: 35.7 - 82.7%) from Curitiba

Antibodies against *B. caballi* were found in 17/32 (53.1%; 95% CI: 34.7 - 70.9%) of horses from RA, 21/24 (87.5%; 95% CI: 67.6-97.3%) from Londrina, 32/48 (66.7%; 95% CI: 51.6 -79.6%) from Colombo, 53/76 (69.7%; 95%CI: 58.1 - 79.8%) from Pinhais and 14/18

(77.8%; 95% CI: 52.4 -93.6%) from Curitiba. Sixty-two of the 198 (31.3%; 95% CI; 24.9 - 38.3%) horses showed the presence of ticks. In addition, horses living in Londrina showed the highest percentage of tick infestation (100%) compared with Curitiba (27.8%) ( $p \leq 0.005$ ).

The seroprevalence of *T. equi* and *B. caballi* in horses within each variable studied are summarized in Table 1. Analyzing *T. equi* seropositive horses, it was observed that those living in Londrina and Colombo were 7 (95% CI: 1.24 - 39.49;  $p = 0.0221$ ) and 4.45 times (95% CI: 1.24 - 15.97;  $p = 0.0232$ ), respectively, more likely to be serologically positive to *T. equi* than horses living in Curitiba. Horses > 10 years ( $p = 0.0329$ ) and those 5 to 10 years ( $p = 0.0014$ ) were associated with seropositivity to *T. equi*. No significant association was found between gender ( $p = 0.0970$ ) or the presence of ticks ( $p = 0.8749$ ) and seropositivity for *T. equi*. Additionally, horses > 10 years ( $p = 0.0118$ ) and presence of ticks ( $p = 0.0428$ ) were associated with seropositivity for *B. caballi*.

## Discussion

Serological data on EP from Brazil have been focused on horse populations used for equestrian sports (Cunha et al., 1996), haras (Kerber et al., 2009), national or international trade (Ribeiro et al., 1999), and farmer horses (Souza et al., 2000; Golynski et al., 2008). This is the first study to determine seroepidemiological data on EP in cart horses in Brazil, and provides insight into the epidemiology and distribution of *T. equi* and *B. caballi* in four urban areas and one rural area of Paraná State, southern Brazil. Horses selected for this study are overexposed to ticks and move around daily with their owners collecting recycling materials, which might increase the dissemination of these pathogens.

In this study, 97.5% of horses were seropositive for at least one EP agent. In Brazil, few serological surveys have investigated both agents, and showed seroprevalence data ranging from 21.6 and 54.1% (Kerber et al., 2009), 81 and 90% (Xuan et al., 2001), and 28.5

and 68.2% (Heuchert et al., 1999) for *T. equi* and *B. caballi*, respectively. Moreover, it was observed that horses living in Londrina (OR= 7.00) and Colombo (OR = 4.45) were more likely to be seropositive for *T. equi* than those living in Curitiba city. Besides a higher percentage of tick infestation has been found in horses from Londrina than those from Curitiba ( $p < 0.05$ ), which may explain the seroprevalence difference, association between seropositivity to *T. equi* and presence of ticks was not observed ( $p = 0.0970$ ). In addition, horses  $>10$  years, and those 5 to 10 years of age were more likely to be seropositive for *T. equi* than those  $<5$  years. Previous studies have not found association between age and seropositivity to *T. equi* (Golynski et al., 2008; Grandi et al., 2011; Santos et al., 2011; Abutarbush et al., 2012). The differences found might be due to climatic variation, horse population studied, and diagnostic test used.

Herein, 69.2% of horses were seropositive for *B. caballi*. In a study conducted in horses from stud farms in the State of São Paulo, southeast Brazil, 69.6% were seropositive for *B. caballi* using the same cELISA method (Kerber et al., 2009). Both data are in disagreement to a previous study, which suggested that seroprevalence of *B. caballi* declines from the northern to southern Brazil, due to the biology of *A. nitens* ticks (Heuchert et al., 1999). In addition, it was found an association between seropositivity to *B. caballi* and presence of ticks ( $p = 0.0428$ ). Moreover, horses  $>10$  years of age were 0.37 times less likely to be seropositive for *B. caballi* than those  $<5$  years. Corroborating with a previous study which found a decrease in seroprevalence of horses between 11 and 16 years old. (Avarzed et al. 1997). Other study has not found association between age and seropositivity to *B. caballi* (García-Bocanegra et al., 2012). Besides this later study have used the same diagnostic method, mule and donkeys were also evaluated, and animals were divided in different age classes ( $< 5$  years, 5-14 years,  $> 14$  years), which might explain the difference found.

The overall seropositivity to *T. equi* (78.3%) was higher than those to *B. caballi* (69.2%), in agreement to data reported by others, which tested horses from Minas Gerais State, southeast Brazil (Heim et al., 2007). However, in horses from Curitiba city the seroprevalence to *B. caballi* (77.8%) was higher than to *T. equi* (61.1%). In general, previous studies have also reported higher number of *B. caballi* seropositive horses (Heuchert et al., 1999; Xuan et al. 2001; Kerber et al., 2009). Differences found might be due to the distribution and exposition of competent tick vectors, or simply by fact that in some regions *B. caballi* is more frequent than *T. equi* (Mujica et al., 2011). Moreover, 50% of horses were seropositive to both piroplasms, showing that in endemic areas horses must be tested for both of EP agents.

In conclusion, a elevated seroprevalence of *T. equi* and *B. caballi* was found in rural and cart horses from Paraná State, southern Brazil. Our findings indicates that active surveillance programs are crucial for monitoring animal health status, since particularly cart horses might act as urban disseminators of these piroplasms.

#### **Conflict of interest statement**

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organizations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

#### **Acknowledgments**

This study was part of a Master degree of Thállitha Vieira at Universidade Estadual de Londrina. Thállitha Vieira was sponsored by a fellowship from the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) at the time of research. This study was supported by *Fundação Araucária do Paraná* and CNPq.

## References

- Abutarbush, S.M., Alqawasmeh, D.M., Mukbel, R.M., Al-Majali, A.M. 2012. Equine babesiosis: seroprevalence, risk factors and comparison of different diagnostic methods in Jordan. *Transboundary and Emerging Diseases* 59(1), 72-78.
- Battsetseg, B., Lucero, S., Xuan, X., Claveria, F.G., Inoue, N., Alhassan, A., Kanno, T., Igarashi, I., Nagasawa, H., Mikami, T., Fujisaki, K. 2002. Detection of natural infection of *Boophilus microplus* with *Babesia equi* and *Babesia caballi* in Brazilian horses using nested polymerase chain reaction. *Veterinary Parasitology* 107(4), 351-357.
- Baldani, C.D., Nakaghi, A.C.H., Machado, R.Z. 2010. Occurrence of *Theileria equi* in horses raised in the Jaboticabal microregion, São Paulo State, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 19(4), 228-232.
- Baldani, C.D., Hilario, E., Nakaghi, A.C.H., Bertolini, M.C., Machado, R.Z. 2011. Production of recombinant EMA-1 protein and its application for the diagnosis of *Theileria equi* using an enzyme immunoassay in horses from São Paulo State, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 20(1), 54-60.
- Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O., Malandrin, L. 2009. Babesia and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Veterinary Research* 40(2), 37.
- Cunha, C.W., da Silva, S.S., Pimentel, C.A., Dapper, E. 1996. Avaliação da frequência de equinos soropositivos a *Babesia equi* no Jóquei Clube de Pelotas e em dois Haras da zona sul do Rio Grande do Sul, RS. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 5, 119-22.
- De Waal, D.T. 1992. Equine piroplasmiasis: a review. *British Veterinary Journal* 148(1), 6-14.
- De Waal, D., Van Heerden, J. 1994. Equine babesiosis. In: Coetzer, J., Thomson, G., Tustin, R. (Ed.) *Infectious diseases of livestock with special reference to south Africa*, vol1. Oxford University Press, Cape Town, South Africa, pp. 293-304.
- García-Bocanegra, I., Arenas-Montes, A., Hernández, E., Adaszek, L., Carbonero, A., Almería, S., Jaén-Téllez, J.A., Gutiérrez-Palomino, P., Arenas, A. 2012. Seroprevalence and risk factors associated with *Babesia caballi* and *Theileria equi* infection in equids. *Veterinary Journal* in press. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2011.03.031>
- Golynski, A.A., Fernandes, K.R., Baldani, C.D., Golynski, A.L., Madeiro, A.S., Machado, R.Z., Botteon, P.T.L., Massard, C.L. 2008. Estudo soroepidemiológico da *Babesia equi* em equinos do estado do Rio Grande do Sul, Brasil determinado pelos testes de imunofluorescência indireta e ELISA. *Revista Brasileira Parasitologia Veterinária* 17(1), 317-321.
- Grandi, G., Molinari, G., Tittarelli, M., Sasser, D., Kramer, L.H. 2011. Prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infection in horses from northern Italy. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 11(7), 955-956.

Heim, A., Passos, L.M.F., Ribeiro, M.F.B., Costa-Júnior, L.M., Bastos, C.V., Cabral, D.D., Hirzmann, J., Pfister, K. 2007. Detection and molecular characterization of *Babesia caballi* and *Theileria equi* isolates from endemic areas of Brazil. *Parasitology Research* 102(1), 63-68.

Heuchert, C.M.S., Giulli Jr, V., Athaide, D.F., Bose, R., Friedhoff, K.T. 1999. Seroepidemiologic studies on *Babesia equi* and *Babesia caballi* in Brazil. *Veterinary Parasitology* 85(1), 1-11.

INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. Available at: [http://www.inmet.gov.br/html/prev\\_tempo.php](http://www.inmet.gov.br/html/prev_tempo.php) (accessed 17 August 2012).

Kerber, C.E., Labruna, M.B., Ferreira, F., De Wall, D.T., Knowles, D.P., Gennari, S.M. 2009. Prevalence of equine piroplasmiasis and its association with tick infestation in the State of São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira Parasitologia Veterinária* 18(4), 1-8.

Mujica, F.F., Perrone, T., Forlano, M., Coronado, A., Meléndez, R.D., Barrios, N., Álvarez, R., Granda, F. 2011. Serological prevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in horses of Lara State, Venezuela. *Veterinary Parasitology* 178(1/2), 180-183.

Nizoli, L.Q., Götze, M.M., Félix, S.R., Silva, S.S., Nogueira, C.E.W. 2008. Frequency of seropositive equines for *Theileria equi* in the Southern Rio Grande do Sul State, Brazil. *Parasitología Latinoamericana* 63(1/4), 46-50.

OIE. Equine piroplasmiasis. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Available at: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.05.08\\_EQUINE\\_PIROPLASMOSES.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.08_EQUINE_PIROPLASMOSES.pdf) (accessed 30 August 2012).

Rhalem, A., Sahibi, H., Lasri, S., Johnson, W.C., Kappmeyer, L.S., Hamidouch, A., Knowles, D.P., Goff, W.L. 2001. Validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosing *Babesia equi* infections of Moroccan origin and its use in determining the seroprevalence of *B. equi* in Morocco. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 3(3), 249-251.

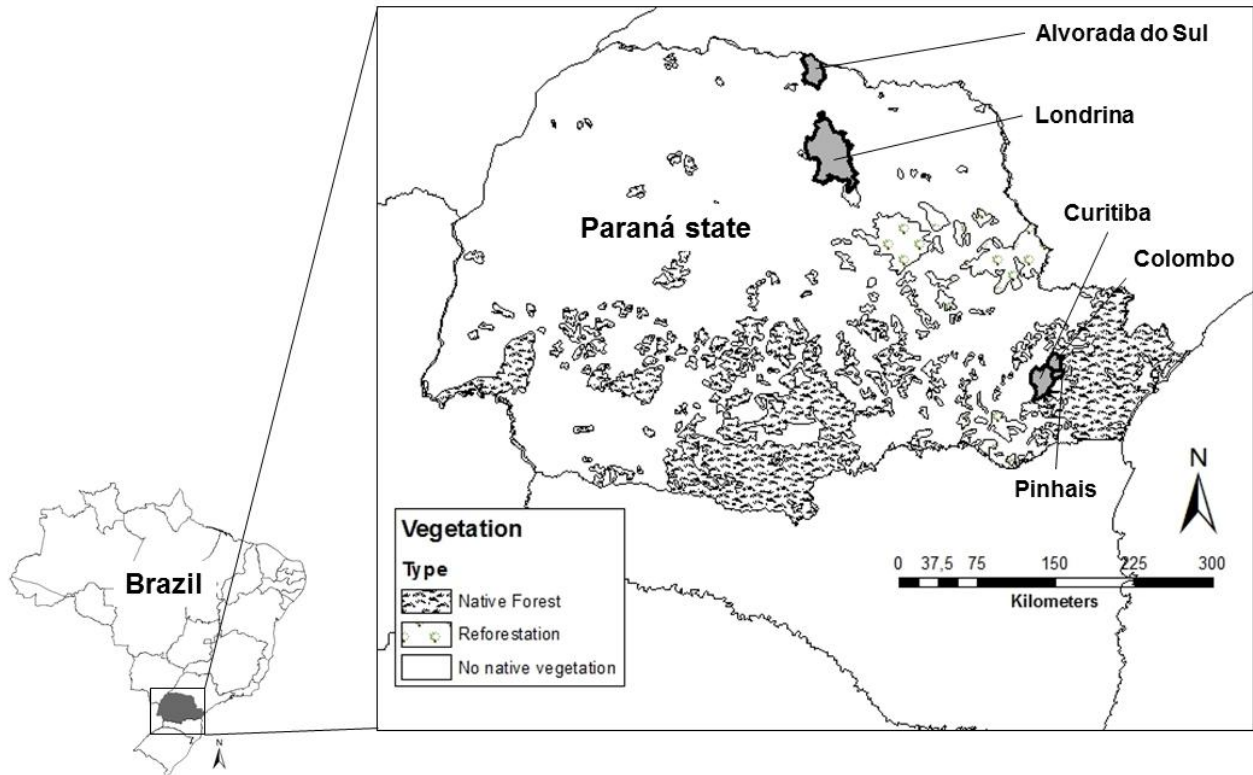
Ribeiro, M.F.B., Costa, J.O., Guimarães, A.M. 1999. Epidemiological aspects of *Babesia equi* in horses in Minas Gerais, Brazil. *Veterinary Research Community* 23(6), 385-390.

Roby, T.O., Anthony, D.W. 1963. Transmission of equine piroplasmiasis by the tropical tick *Dermacentor nitens* (Neumann). *Journal of American Veterinary Medical Association* 1963; 142: 768-769.

Santos, T.M., Roier, E.C.R., Santos, H.A., Pires, M.S., Vilela, J.A.R., Moraes, L.M.B., Almeida, F.Q., Baldani, C.D., Machado, R.Z., Massard, C.L. 2011. Factors associated to *Theileria equi* in equids of two microregions from Rio de Janeiro, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 20(3), 235-241.

Schein, E. 1998. Equine babesiosis. In: Ristic, M. (Ed.) *Babesiosis of domestic animals and man*. Boca Raton: CRS Press, pp.197-208.

- Short, M.A., Clark, C.K., Harvey, J.W., Wenzlow, N., Hawkins, I.K., Allred, D.R., Knowles, D.P., Corn, J.L., Grause, J.F., Hennager, S.G., Kitchen, D.L., Traub-Dargatz, J.L. 2012. Outbreak of equine piroplasmosis in Florida. *Journal of American Veterinary Medical Association* 240(5), 588-595.
- Souza, A.P., Sartor, A.A., Bellato, V., Silva, A.B. 2000. Prevalência de anticorpos anti *Babesia equi* em equinos do Planalto Catarinense. *Ciência Rural* 30(1), 119-120.
- Steinman, A., Zimmerman, T., Klement, E., Lensky, I.M., Berlin, D., Gottlieb, Y., Baneth, G. 2012. Demographic and environmental risk factors for infection by *Theileria equi* in 590 horses in Israel. *Veterinary Parasitology* 187(3/4), 558-562.
- Toledo, R.S., Tamekuni, K., Haydu, V.B., Vidotto, O. 2008. Dinâmica sazonal de carrapatos do gênero *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) em um parque urbano da cidade de Londrina-PR. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 17(1), 50-54.
- Xuan, X., Nagai, A., Battsetseg, B., Fukumoto, S., Makala, L.H., Inoue, N., Igarashi, I., Mikami, T., Fujisaki, K. 2001. Diagnosis of equine piroplasmosis in Brazil by serodiagnostic methods with recombinant antigens. *The Journal of Veterinary Medical Science* 63(10), 1159-1160.



**Fig. 1.** Geographical location used in the study: Alvorada do Sul county, Londrina, Colombo, Pinhais, Curitiba, State of Paraná, southern Brazil, 2011.

**Table 1.** Serological prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses within each variable studied from Paraná State, southern Brazil, 2011.

Variable	<i>Theileria equi</i>					<i>Babesia caballi</i>				
	+/N	(%)	OR	95% CI	P-value	+/N	(%)	OR	95% CI	P-value
<b>Place</b>										
Alvorada do Sul	27/32	84.4	3.43	0.89 - 13.18	0.0679	17/32	53.1	0.32	0.09 - 1.20	0.0847
Londrina	22/24	91.7	7.00	1.24 - 39.49	0.0221	21/24	87.5	2.00	0.39 - 10.33	0.3349
Colombo	42/48	87.5	4.45	1.24 - 15.97	0.0232	32/48	66.7	0.57	0.16 - 2.02	0.3817
Pinhais	53/76	69.7	1.46	0.50 - 4.26	0.4802	53/76	69.7	0.65	0.19 - 2.21	0.4978
Curitiba	11/18	61.1				14/18	77.8			
<b>Presence of Ticks</b>										
Yes	53/62	85.5	1.9	0.87 - 4.39	0.0970	49/62	79.0	2.05	1.01 - 4.16	0.0428
No	102/136	75.0				88/136	64.7			
<b>Age (Years)</b>										
>10	40/48	83.3	2.60	1.06 - 6.36	0.0329	27/48	56.3	0.37	0.16 - 0.81	0.0118
5-10	65/74	87.8	3.75	1.61 - 8.72	0.0014	51/74	68.9	0.63	0.30 - 1.32	0.2276
<5	50/76	65.8				59/76	77.6			
<b>Gender</b>										
Male	85/108	78.7	1.05	0.53 - 2.07	0.8749	74/108	68.5	0.93	0.50 - 1.71	0.8221
Female	70/90	77.8				63/90	70.0			

+, Number of positive animals; N, number of samples; 95% CI, 95% confidence interval.



## CONCLUSÕES

---

- Uma alta soroprevalência para *Theileria equi* e *Babesia caballi* foi encontrada em cavalos de área rural e cavalos de carroceiros do Paraná.
- Equinos residentes nas cidades de Londrina e Colombo apresentaram mais chance de serem soropositivos para *T. equi* do que aqueles da cidade de Curitiba.
- Foi observada uma associação positiva entre presença de carrapatos e anticorpos contra *B. caballi*.
- Equinos maiores que 5 anos apresentaram maior chance de serem soropositivos para *T. equi*
- Equinos maiores que 10 anos apresentaram menor soroprevalência para *Babesia caballi*
- 50 % da população testada foi soropositiva para *T. equi* e *B. caballi*, assim, em regiões endêmicas ambos agentes devem ser testados.





Universidade  
Estadual de Londrina

**COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

OF. CIRC. CEEA Nº 34/2011

Londrina, 03 de junho de 2011

Prezado Pesquisador

O CEEA/UEL, reunido aos 12 de abril do ano corrente, avaliou o projeto de pesquisa intitulado "**Epidemiologia de patógenos das Famílias Rickettsiaceae, Anaplasmataceae, Babesidae, Spirochaetaceae e Mycoplasmataceae em carrapatos da Família Ixodidae, animais e humanos em assentamentos rurais e áreas urbanas da Região Norte do Estado do Paraná**", registrado no CEEA sob o nº 23/11, pesquisa do Centro de Ciências Agrárias, desenvolvido sob sua responsabilidade. Esclarecidos os aspectos metodológicos solicitados, o projeto está *aprovado* para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizadas amostras de sangue de 100 cães e 40 eqüinos da área rural e 384 cães de área urbana, divididos em 2 grupos, com total de 324 animais com procedência de assentamentos rurais e área urbanas da Região Norte do Estado do Paraná. Serão coletados amostras de sangue e carrapatos dos animais nas propriedades dos respectivos assentamentos. As amostras serão enviadas ao Laboratório de Protozoologia Veterinária da UEL para processamento. Será realizada a identificação das espécies de carrapatos, pesquisa de infecção por rickettsias do grupo da febre maculosa e outros agentes (teste da Hemofilina para rickettsias do grupo da febre maculosa, PCR dos carrapatos para Rickettsias do grupo febre maculosa, *Borrelia SP*, *Anaplasma SP*, *Ehrlichia SP*, *Babesia sp*, *Mycoplasma sp*), pesquisa de anticorpos anti-rickettsias do grupo febre maculosa, anti-*Borrelia burgdorferi*, anti-*Anaplasma phagocytophilum*, anti-*Ehrlichia sp* e anti-*Babesia sp*, pesquisa de *Leishmania sp* (pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania sp*, PCR para *Leishmania sp*). O projeto está previsto para ser desenvolvido entre o segundo semestre de 2011 e segundo semestre de 2013..

Ilmo. Sr.

**Prof. Dr. Odilon Vidotto**

**Coordenador do Projeto**

**Departamento de Medicina Veterinária Preventiva**

**Centro de Ciências Agrárias**

Com cópia para Srª Égle Maria de Sousa (Chefe da DCA/PROPPG).



Universidade  
Estadual de Londrina

Cumprindo orientar que caso se pretendam quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação do CEEA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Sem mais para o momento, subscrevo-me.

Cordialmente,

Prof. Dra. Mirian Siliane Batista de Souza  
Coordenadora do CEEA/UEL

## ANEXO B



Universidade Federal do Paraná  
Setor de Ciências Agrárias  
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA SCA

## CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo no. 027/2010, referente ao projeto “Leptospirose em cavalos de tração na região metropolitana de Curitiba-PR”, sob a responsabilidade de Mariane Angelica Pommerening Finger foi apresentado, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, em reunião realizada dia 23 de Agosto de 2010. Este certificado expira em 23 de agosto de 2011.

## CERTIFICATE

We certify that the protocol number 027/2010, regarding the project “Leptospirosis in cart horses from Curitiba arounds”, in charge of Mariane Angelica Pommerening Finger, in the terms it was presented, was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of the State of Paraná, Southern Brazil) during session on August 2010. This certificate expires on August, 2011.

Curitiba, 23 de agosto de 2010.

Geraldo Camilo Alberton  
Presidente

Patrick Schmidt  
Vice-Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais  
Setor de Ciências Agrárias  
Universidade Federal do Paraná.

## ANEXO C: PROTOCOLO *THEILERIA EQUI*

### Test Validation

- The mean of the Negative Controls must have an optical density  $\geq 0.300$  and  $\leq 2.000$ .
- The mean of the Positive Controls must have an inhibition of  $\geq 40\%$ .

### Interpreting the Results

- If a test sample produces  $\geq 40\%$  inhibition, it is positive.
- If a test sample produces  $< 40\%$  inhibition, it is negative.

### Precautions

Kit components should be handled and disposed of as potentially hazardous. Do not eat, drink, or smoke where serum samples and kit reagents are handled. Do not pipette by mouth. Some reagents may be harmful if ingested. If ingested, seek medical attention. Do not use expired or contaminated reagents, or reagents from other kits or serials. Do not mix reagents from different serials of this same product.

Component B, Positive Control, contains ProClin 300 as a preservative.

Component C, Negative Control, contains ProClin 300 as a preservative.

Component D, 100X Primary Antibody, contains ProClin 300, methylisothiazolone, and bromonitrodioxane as preservatives.

Component E, 100X Secondary Antibody-Peroxidase Conjugate, contains methylisothiazolone, bromonitrodioxane, and thimerosal as preservatives.

Component F, Antibody Diluting Buffer, contains methylisothiazolone and bromonitrodioxane as preservatives.

Component G, Serum Diluting Buffer, contains ProClin 300 as a preservative.

Component J, Stop Solution, contains sodium fluoride.

USDA Veterinary License No. 332

Version 120806



FOR VETERINARY USE ONLY

USDA Product Code 501A.20

## BABESIA CABALLI ANTIBODY TEST KIT, CELISA

Assay instructions for catalog numbers: 273-2 and 273-5

### General Description

This competitive, enzyme-linked, immunosorbent assay (cELISA) detects *B. caballi* antibodies in equine sera. Sample serum *B. caballi* antibody inhibits binding of primary monoclonal antibody. The binding of primary monoclonal antibody to the antigen-coated plate is detected with HRP-labeled secondary antibody. Finally, the presence of HRP-labeled secondary antibody is quantified by the addition of enzyme substrate and subsequent color product development. Strong color development indicates little or no inhibition of primary monoclonal antibody binding and therefore the absence of *B. caballi* antibody in sample sera. Weak color development due to inhibition of the primary monoclonal antibody binding to the antigen on the solid phase indicates the presence of *B. caballi* antibodies in sample sera.

### Kit Contents

Component	273-2	273-5
A Antigen-Coated Plates	2 plates	5 plates
B Positive Control	2 ml	4 ml
C Negative Control	2 ml	4 ml
D 100X Primary Antibody	0.3 ml	0.5 ml
E 100X Secondary Antibody-Peroxidase Conjugate	0.3 ml	0.5 ml
F Antibody Diluting Buffer	60 ml	120 ml
G Serum Diluting Buffer	10.5 ml	25ml
H 10X Wash Solution Concentrate	120 ml	2 x 120 ml
I Substrate Solution	30 ml	60 ml
J Stop Solution	30 ml	60 ml
This insert		

### Materials Required But Not Included in the Test Kit

Single and multichannel adjustable-volume pipettors and disposable plastic tips, test tubes or non-antigen-coated transfer plate(s), ELISA microplate reader or spectrophotometer with 620, 630 or 650 nm filter, deionized or distilled water, paper towels, graduated cylinder, timer, multichannel pipettor reservoirs, wash bottle, manual multichannel washing device or automatic plate washer

### Storage and Stability

Store all reagents at 2-7°C. Do not freeze. Reagents will remain stable until the expiration date when stored as instructed. Do not use test kit past the expiration date printed on the box.

### Preparation

- a. **Warm reagents:** Bring the serum samples, reagents and plate(s) to room temperature (23 ± 2°C) prior to starting the test.
- b. **Prepare controls and samples:** The Positive and Negative Controls (B & C) and test serum samples must be diluted 1/2 with Serum Diluting Buffer (G) for use in the test. It is recommended that these dilutions be made in a non-antigen-coated transfer plate. Load Positive Control (B) in duplicate and Negative Control (C) in triplicate, regardless of the number of serum samples to be tested. When whole plates are used, it is best to put the controls in wells on different areas of the plate. Controls must be loaded on every plate.
- c. **Prepare plates:** Remove the plate(s) from the foil pouch(es) (A). If applicable: Return any unused strips to the pouch and securely seal it. Extra pouches and seals are available from VMRD. Place strips to be used in the frame and number the top of each strip to maintain orientation. Always mark the strips in case they dislodge from the frame during washing.
- d. **Prepare primary antibody:** Prepare 1X Primary Antibody by diluting 1 part of the 100X Primary Antibody (D) with 99 parts of Antibody Diluting Buffer (F). Example: For 96 wells, mix 60 µl of 100X Primary Antibody (D) with 5.940 ml of Antibody Diluting Buffer (F) to yield 6 ml of 1X Primary Antibody. Fifty microliters (50 µl) are needed per well.
- e. **Prepare secondary antibody-peroxidase conjugate:** Prepare 1X Secondary Antibody-Peroxidase Conjugate by diluting 1 part of the 100X Secondary Antibody-Peroxidase Conjugate (E) with 99 parts of Antibody Diluting Buffer (F). Example: For 96 wells, mix 60 µl of 100X Secondary Antibody-Peroxidase Conjugate (E) with 5.940 ml of Antibody Diluting Buffer (F) to yield 6 ml of 1X Secondary Antibody-Peroxidase Conjugate. Fifty microliters (50 µl) are needed per well.
- f. **Prepare wash solution:** Prepare 1X Wash Solution by diluting 1 part of the 10X Wash Solution Concentrate (H) with 9 parts of deionized or distilled water. Approximately 1.8 ml are needed per well. Allow extra quantity for reservoirs, tubing, pipetting, etc.

### Test Procedure

1. **Load controls and serum samples:** Using a pipettor set at 50 µl, transfer diluted controls and serum samples into the Antigen-Coated Plate (A). Serum samples and controls should be loaded into the Antigen-Coated Plate (A) as quickly as possible. When running more than two strips, we recommend that the serum samples and controls be first loaded into a transfer plate and then transferred to the Antigen-Coated Plate (A) using multi-channel pipetting equipment. The sample volume in the transfer plate

must be in excess of 50 µl in order to transfer 50 µl from it. Tap the side of the loaded assay plate several times to make sure the samples coat the bottom of the wells. Use care not to spill samples from well to well. Incubate the plate 30 minutes at room temperature (23 ± 2°C).

2. **Wash wells:** After the 30-minute incubation, wash the plate 3 times: *If an automatic washer is used,* place the plate on the washing apparatus and wash plate 3 times, filling the wells each time with 1X Wash Solution. *If manual washing is used,* dump contents of the wells into a sink and remove the remaining sera and controls by sharply striking the inverted plate 4 times on a clean paper towel, striking a clean area each time. Immediately fill each well with 1X Wash Solution using a multichannel pipettor, wash bottle or a syringe with a manifold. Dump out the Wash Solution and strike the inverted plate sharply on a clean paper towel as above. Repeat the washing procedure 2 more times (3 washes total).
3. **Add primary antibody:** Add 50 µl of diluted (1X) Primary Antibody to each well. Tap the side of the loaded assay plate several times to make sure the primary antibody coats the bottom of the wells. Incubate for 30 minutes at room temperature (23 ± 2°C).
4. **Wash wells:** After the second 30-minute incubation, wash the plate 3 times as in Step 2.
5. **Add secondary antibody-peroxidase conjugate:** Add 50 µl of diluted (1X) Secondary Antibody-Peroxidase Conjugate to each well. Tap the side of the loaded assay plate several times to make sure the conjugate coats the bottom of the wells. Incubate for 30 minutes at room temperature (23 ± 2°C).
6. **Wash wells:** After the third 30-minute incubation, wash the plate 3 times as in Step 2.
7. **Add substrate solution:** Add 50 µl of Substrate Solution (I) to each well. Tap the side of the loaded assay plate several times to make sure the substrate coats the bottom of the wells. Incubate 15 minutes at room temperature (23 ± 2°C). Avoid leaving the plate in direct sunlight. *Do not empty wells.*
8. **Add stop solution:** Add 50 µl of Stop Solution (J) to each well. Tap the side of the loaded assay plate several times to mix the Substrate Solution and the Stop Solution. *Do not empty wells.*
9. **Read and record the test results:** Immediately after adding the Stop Solution, the plate should be read on a microplate absorbance spectrophotometer. Set the optical density (O.D.) reading wavelength to 620, 630 or 650 nm. Blank the instrument on air and read plate(s). Some readers require an empty well on the plate for blanking. In this case, no reagents should be added to this well.
10. Return all remaining kit reagents to 2-7°C for storage.

### Calculation of % Inhibition (% I):

$$\% I = 100 [1 - (\text{Sample O.D.} \div \text{NC O.D.})]$$

## ANEXO D: PROTOCOLO *BABESIA CABALLI*

### Test Validation

- The mean of the Negative Controls must have an optical density >0.300 and <2.000.
- The mean of the Positive Controls must have an inhibition of  $\geq 40\%$ .

### Interpreting the Results

- If a test sample produces  $\geq 40\%$  inhibition, it is positive.
- If a test sample produces < 40% inhibition, it is negative.

### Precautions

Kit components should be handled and disposed of as potentially hazardous. Do not eat, drink, or smoke where serum samples and kit reagents are handled. Do not pipette by mouth. Some reagents may be harmful if ingested. If ingested, seek medical attention. Do not use expired or contaminated reagents, or reagents from other kits or serials. Do not mix reagents from different serials of this same product.

Component B, Positive Control, contains ProClin 300 as a preservative.

Component C, Negative Control, contains ProClin 300 as a preservative.

Component D, 100X Primary Antibody, contains ProClin 300, methylisothiazolone, and bromonitrodioxane as preservatives.

Component E, 100X Secondary Antibody-Peroxidase Conjugate, contains methylisothiazolone, bromonitrodioxane, and thimerosal as preservatives.

Component F, Antibody Diluting Buffer, contains methylisothiazolone and bromonitrodioxane as preservatives.

Component G, Serum Diluting Buffer, contains ProClin 300 as a preservative.

Component J, Stop Solution, contains sodium fluoride.

USDA Veterinary License No. 332

Version 120806

PO Box 502  
Pullman, WA 99163 USA

P: 509.334.5815  
F: 509.332.5356

techserve@vmrd.com  
www.vmrd.com



FOR VETERINARY USE ONLY

USDA Product Code 501B.20

## BABESIA EQUI ANTIBODY TEST KIT, cELISA

Assay instructions for catalog numbers: 274-2 and 274-5

### General Description

This competitive, enzyme-linked, immunosorbent assay (cELISA) detects *B. equi* antibodies in equine sera. Sample serum *B. equi* antibody inhibits binding of primary monoclonal antibody. The binding of primary monoclonal antibody to the antigen-coated plate is detected with HRP-labeled secondary antibody. Finally, the presence of HRP-labeled secondary antibody is quantified by the addition of enzyme substrate and subsequent color product development.

Strong color development indicates little or no inhibition of primary monoclonal antibody binding and therefore the absence of *B. equi* antibody in sample sera. Weak color development due to inhibition of the primary monoclonal antibody binding to the antigen on the solid phase indicates the presence of *B. equi* antibodies in sample sera.

### Kit Contents

Component	274-2	274-5
A Antigen-Coated Plates	2 plates	5 plates
B Positive Control	2 ml	4 ml
C Negative Control	2 ml	4 ml
D 100X Primary Antibody	0.3 ml	0.5 ml
E 100X Secondary Antibody-Peroxidase Conjugate	0.3 ml	0.5 ml
F Antibody Diluting Buffer	60 ml	120 ml
G Serum Diluting Buffer	10.5 ml	25ml
H 10X Wash Solution Concentrate	120 ml	2 x 120 ml
I Substrate Solution	30 ml	60 ml
J Stop Solution	30 ml	60 ml
This insert		

### Materials Required But Not Included in the Test Kit

Single and multichannel adjustable-volume pipettors and disposable plastic tips, test tubes or non-antigen-coated transfer plate(s), ELISA microplate reader or spectrophotometer with 620, 630 or 650 nm filter, deionized or distilled water, paper towels, graduated cylinder, timer, multichannel pipettor reservoirs, wash bottle, manual multichannel washing device or automatic plate washer

### Storage and Stability

Store all reagents at 2-7°C. Do not freeze. Reagents will remain stable until the expiration date when stored as instructed. Do not use test kit past the expiration date printed on the box.

### Preparation

- a. **Warm reagents:** Bring the serum samples, reagents and plate(s) to room temperature (23 ± 2°C) prior to starting the test.
- b. **Prepare controls and samples:** The Positive and Negative Controls (B & C) and test serum samples must be diluted 1/2 with Serum Diluting Buffer (G) for use in the test. It is recommended that these dilutions be made in a non-antigen-coated transfer plate. Load Positive Control (B) in duplicate and Negative Control (C) in triplicate, regardless of the number of serum samples to be tested. When whole plates are used, it is best to put the controls in wells on different areas of the plate. Controls must be loaded on every plate.
- c. **Prepare plates:** Remove the plate(s) from the foil pouch(es) (A). If applicable: Return any unused strips to the pouch and securely seal it. Extra pouches and seals are available from VMRD. Place strips to be used in the frame and number the top of each strip to maintain orientation. Always mark the strips in case they dislodge from the frame during washing.
- d. **Prepare primary antibody:** Prepare 1X Primary Antibody by diluting 1 part of the 100X Primary Antibody (D) with 99 parts of Antibody Diluting Buffer (F). Example: For 96 wells, mix 60 µl of 100X Primary Antibody (D) with 5.940 ml of Antibody Diluting Buffer (F) to yield 6 ml of 1X Primary Antibody. Fifty microliters (50 µl) are needed per well.
- e. **Prepare secondary antibody-peroxidase conjugate:** Prepare 1X Secondary Antibody-Peroxidase Conjugate by diluting 1 part of the 100X Secondary Antibody-Peroxidase Conjugate (E) with 99 parts of Antibody Diluting Buffer (F). Example: For 96 wells, mix 60 µl of 100X Secondary Antibody-Peroxidase Conjugate (E) with 5.940 ml of Antibody Diluting Buffer (F) to yield 6 ml of 1X Secondary Antibody-Peroxidase Conjugate. Fifty microliters (50 µl) are needed per well.
- f. **Prepare wash solution:** Prepare 1X Wash Solution by diluting 1 part of the 10X Wash Solution Concentrate (H) with 9 parts of deionized or distilled water. Approximately 1.8 ml are needed per well. Allow extra quantity for reservoirs, tubing, pipetting, etc.

### Test Procedure

1. **Load controls and serum samples:** Using a pipettor set at 50 µl, transfer diluted controls and serum samples to the Antigen-Coated Plate (A). Serum samples and controls should be loaded into the Antigen-Coated Plate (A) as quickly as possible. When running more than two strips, we recommend that the serum samples and controls be first loaded into a transfer plate and then transferred to the Antigen-Coated Plate (A) using multi-channel pipetting equipment. The sample volume in the transfer plate must be in excess of

50 µl in order to transfer 50 µl from it. Tap the side of the loaded assay plate several times to make sure the samples coat the bottom of the wells. Use care not to spill samples from well to well. Incubate the plate 30 minutes at room temperature (23 ± 2°C).

2. **Wash wells:** After the 30-minute incubation, wash the plate 3 times: *If an automatic washer is used*, place the plate on the washing apparatus and wash plate 3 times, filling the wells each time with 1X Wash Solution. *If manual washing is used*, dump contents of the wells into a sink and remove the remaining sera and controls by sharply striking the inverted plate 4 times on a clean paper towel, striking a clean area each time. Immediately fill each well with 1X Wash Solution using a multichannel pipettor, wash bottle or a syringe with a manifold. Dump out the Wash Solution and strike the inverted plate sharply on a clean paper towel as above. Repeat the washing procedure 2 more times (3 washes total).
3. **Add primary antibody:** Add 50 µl of diluted (1X) Primary Antibody to each well. Tap the side of the loaded assay plate several times to make sure the primary antibody coats the bottom of the wells. Incubate for 30 minutes at room temperature (23 ± 2°C).
4. **Wash wells:** After the second 30-minute incubation, wash the plate 3 times as in Step 2.
5. **Add secondary antibody-peroxidase conjugate:** Add 50 µl of diluted (1X) Secondary Antibody-Peroxidase Conjugate to each well. Tap the side of the loaded assay plate several times to make sure the conjugate coats the bottom of the wells. Incubate for 30 minutes at room temperature (23 ± 2°C).
6. **Wash wells:** After the third 30-minute incubation, wash the plate 3 times as in Step 2.
7. **Add substrate solution:** Add 50 µl of Substrate Solution (I) to each well. Tap the side of the loaded assay plate several times to make sure the substrate coats the bottom of the wells. Incubate 15 minutes at room temperature (23 ± 2°C). Avoid leaving the plate in direct sunlight. *Do not empty wells.*
8. **Add stop solution:** Add 50 µl of Stop Solution (J) to each well. Tap the side of the loaded assay plate several times to mix the Substrate Solution and the Stop Solution. *Do not empty wells.*
9. **Read and record the test results:** Immediately after adding the Stop Solution, the plate should be read on a microplate absorbance spectrophotometer. Set the optical density (O.D.) reading wavelength to 620, 630 or 650 nm. Blank the instrument on air and read plate(s). Some readers require an empty well on the plate for blanking. In this case, no reagents should be added to this well.
10. Return all remaining kit reagents to 2-7°C for storage.

### Calculation of % Inhibition (% I):

$$\% I = 100 [1 - (\text{Sample O.D.} \div \text{NC O.D.})]$$



**APÊNDICE A: Questionários Epidemiológicos**

---

**PROJETO ASSENTAMENTO**

Laboratório de Protozoologia Veterinária – CCA/DMVP – UEL

**QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO - EQUINOS**

Cidade: \_\_\_\_\_ Propriedade nº \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Proprietário: \_\_\_\_\_ Fone: \_\_\_\_\_

Nº \_\_\_\_\_ 1) Nome: \_\_\_\_\_ 2) Idade: \_\_\_\_\_ 3) Sexo: ( ) M ( ) F

4) Quanto tempo mora no assentamento? \_\_\_\_\_

5) Visita área de mata ciliar: ( ) Sim ( ) Não

6) Presença carrapatos: ( ) Sim ( ) Não

7) Época do ano que aparecem: ( ) primavera – ( ) verão – ( ) outono – ( ) inverno  
( ) ano todo

8) Controle de carrapatos: ( ) Sim ( ) Não 8.1) Qual produto? \_\_\_\_\_

9) Frequência controle carrapatos: ( ) Semestral ( ) Anual

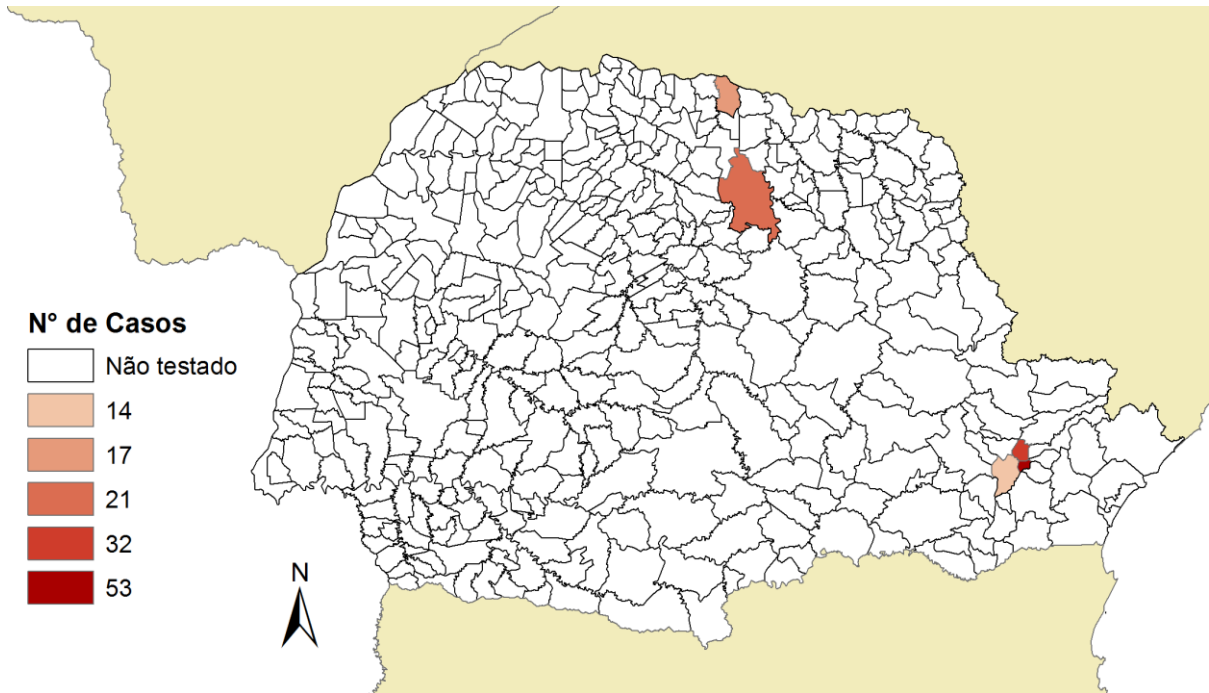


### FICHA DE CADASTRO PROJETO CARROCEIROS

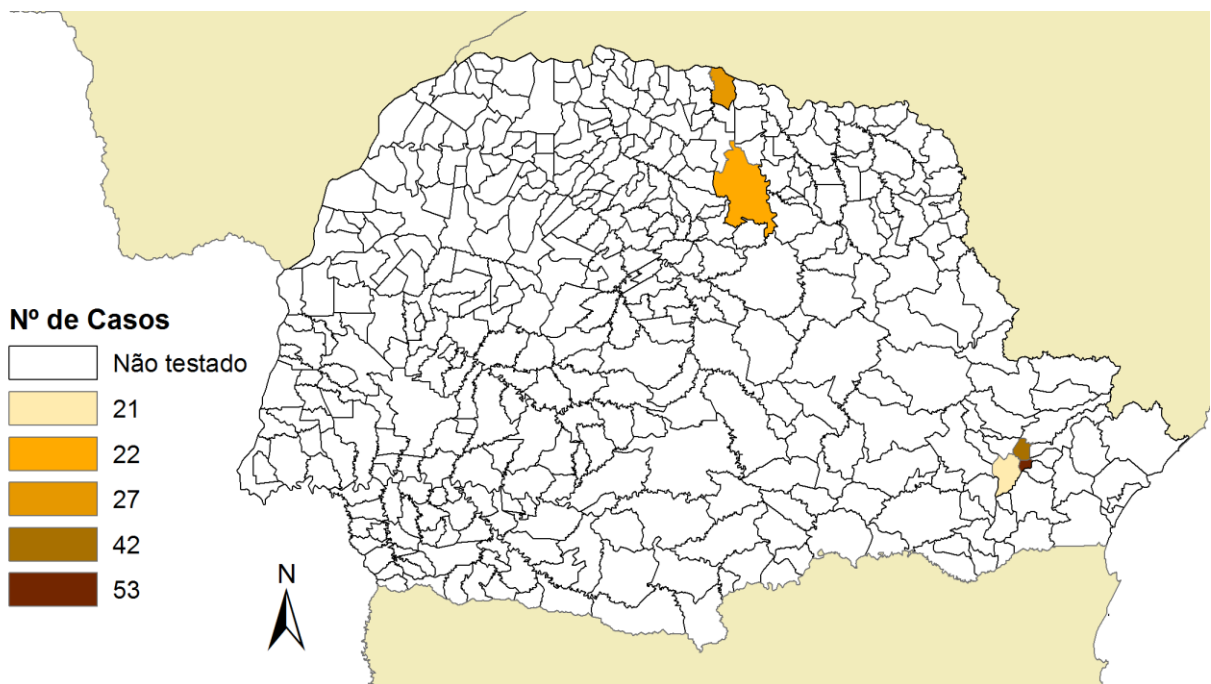
<b>SOBRE O PROPRIETÁRIO</b>		Nº: ____/____.
Nome:		
Endereço:		Nº:
Complemento:		Bairro:
Cidade:		É dono da carroça: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não
Telefone: ( )		<input type="checkbox"/> próprio <input type="checkbox"/> p/
recados		
É dono do animal: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não		Qtos cavalos tem?      Qtas horas o animal trabalha p/ dia?
Percurso:		Peso da carga:
Qtas cargas por dia:      Qto recebe pela carga: R\$		Carroça: <input type="checkbox"/> 1 eixo <input type="checkbox"/> 2 eixos
Como adquiriu o animal:		
Usa as fezes como adubo? <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não Se sim, trata as fezes <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não Qual?		
Se houver um programa de assistência veterinária, levaria seu animal? <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não		
Se houver curso de casqueamento, o Sr. Participaria? <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não		
Qual o maior problema enfrentado pelo Sr. no município?		
<b>SOBRE O ANIMAL</b>		
Nome do animal:		Raça:
Sexo: <input type="checkbox"/> fêmea <input type="checkbox"/> macho Macho: <input type="checkbox"/> castrado <input type="checkbox"/> inteiro Fêmea: <input type="checkbox"/> ã prenhe <input type="checkbox"/> prenhe <input type="checkbox"/> lactente		
Idade aproximada:		Peso:      Altura:      Pulso: <input type="checkbox"/> fraco <input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> forte
FC:      bpm FR:      mpm TPC:      seg. Temperatura:      °C		
Desidratação: <input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> leve <input type="checkbox"/> moderada <input type="checkbox"/> grave		
Mucosas: <input type="checkbox"/> róseas <input type="checkbox"/> pálida <input type="checkbox"/> icterica <input type="checkbox"/> congesta <input type="checkbox"/> outro:		
Escore nutricional: <input type="checkbox"/> caquético <input type="checkbox"/> magro <input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> obeso <input type="checkbox"/> outro:		
Presença de ectoparasitos: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não		Quais:      Coletados: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não
Casco: <input type="checkbox"/> normal <input type="checkbox"/> achinelado <input type="checkbox"/> encastelado <input type="checkbox"/> rachaduras <input type="checkbox"/> outros:		
Lesões de pele: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não Onde:		Quais:
Vermífugo: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não Princípio:		Vacina: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não Qual:
Ectoparasiticida: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não Qual a frequência:		Qual medicamento:
Durante o trabalho: se alimenta: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não bebe água: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não Qto:		
Alimentação: <input type="checkbox"/> pasto <input type="checkbox"/> capim picado <input type="checkbox"/> farelo de trigo <input type="checkbox"/> milho <input type="checkbox"/> ração <input type="checkbox"/> sal <input type="checkbox"/> outros:		
Casqueamento: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não Frequência:		Quem faz: <input type="checkbox"/> proprietário <input type="checkbox"/> ferrador <input type="checkbox"/> outros
Onde fica a noite: <input type="checkbox"/> baia <input type="checkbox"/> amarrado <input type="checkbox"/> solto <input type="checkbox"/> outros:		
Teve alguma doença: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não Qual:		Qdo:

Sangramento nasal: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não Se sim, durante o trabalho: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não			
<b>EXAMES COMPLEMENTARES</b>			
Hemograma:	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	Hematócrito:	PPT: Fibrinogênio:
Urinalise:	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	Coproparasitológico:	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não OPG:
Coprocultura:	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não		

## APÊNDICE B: Mapas



Mapa 1. Soroprevalência de *Babesia caballi* por município



Mapa 1. Soroprevalência de *Theileria equi* por município