

PIROPLASMOSE EQUINA: DIAGNÓSTICO MOLECULAR E AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS EM CAVALOS COM DOENÇA CLÍNICA E SUBCLÍNICA

Ricardo Alexandre Cavaco Angeiras

Enfermagem Veterinária

2024

Ricardo Alexandre Cavaco Angeiras

Piroplasmose Equina: Diagnóstico Molecular e Avaliação de Alterações Hematológicas em Cavalos Com doença Clínica e Subclínica

Relatório de estágio curricular do tipo II – Introdução às Atividades de I&DE, apresentado para obtenção do grau de licenciado em Enfermagem Veterinária conferido pelo Instituto Politécnico de Portalegre

Orientador interno: Jacinto José Carneiro Gomes

Orientador Externo: Paula Alexandra Botelho Garcia Andrade Pimenta Tilley

Arguente: Sheila de Matos David Granadeiro

Presidente do Júri: Carolina Maria Balão da Silva

Classificação: 17 Valores

Escola Superior de Biociências de Elvas

2024

Relatório de estágio.

Durante o estágio na Faculdade de Medicina Veterinária Equina, sob a orientação externa da Professora Paula Tilley e a orientação interna do Professor Jacinto Gomes, foram encontrados vários casos desafiadores. Destacam-se algumas situações que se revelaram particularmente significativas e envolventes, contribuindo para o desenvolvimento das competências na área de enfermagem veterinária equina.

Um caso notável envolveu um cavalo que apresentava sinais de disfunção cardíaca. Após a realização de um eletrocardiograma e um ecocardiograma, foi diagnosticada uma condição complexa, caracterizada por insuficiência cardíaca tanto à esquerda quanto à direita, fibrilação, arritmias e insuficiência valvular com regurgitação em todas as quatro válvulas. Esta avaliação diagnóstica abrangente foi essencial para facilitar o tratamento adequado e garantir o bem-estar do paciente equino, que, neste caso, foi exclusivamente paliativo.

Outro caso interessante foi o de uma égua que sofreu de retenção de placenta pós-parto, complicada por um histórico de laminite. Para abordar este problema, foram realizadas lavagens uterinas durante três dias consecutivos para prevenir complicações adicionais e promover a recuperação completa da égua.

Além disso, foi encontrado um burro recém-nascido com deformidades flexurais nos esporões e metacarpos dos membros anteriores, provavelmente devido a uma relação desfavorável entre o tamanho da mãe e o do filhote. Neste caso, foi necessária uma intervenção cirúrgica, envolvendo o corte do tendão flexor digital superficial para corrigir as deformidades e assegurar o desenvolvimento adequado do animal.

Um caso desafiador envolveu um equino com claudicação em ambos os lados, tanto no membro anterior quanto no posterior. Um raio-X confirmatório revelou osteocondrose, uma condição que afeta o desenvolvimento das articulações. A resolução cirúrgica foi realizada através de artroscopia, permitindo a remoção de fragmentos articulares e resultando num prognóstico positivo para o paciente.

Outro caso significativo foi o de um equino com massas oculares, inicialmente suspeitas de sarcoides, após um ultrassom ocular. Embora se tenha tentado a remoção cirúrgica, o resultado não foi o esperado, levando a complicações adicionais e infeção no olho direito.

Foi também investigada uma égua com diminuição no desempenho atlético, através de uma endoscopia dinâmica, que revelou uma displasia do quarto arco branquial, condição que poderia inibir a capacidade do animal de respirar adequadamente durante o esforço físico.

Além disso, houve um desafio com um potro macho que apresentava hérnia inguinal recorrente. Após tentativas de redução manual por meio de massagem inguinal e assistência com ecografia abdominal, foi necessária uma intervenção cirúrgica para corrigir o problema.

Por último, tratou-se uma égua com laminite, uma condição dolorosa e debilitante que afeta os cascos equinos, exigindo cuidados intensivos e tratamento especializado para aliviar o desconforto e prevenir complicações adicionais.

Estes casos exemplificam a complexidade e a variedade de desafios encontrados na enfermagem veterinária equina, destacando a importância de uma abordagem multidisciplinar e individualizada para cada paciente. A experiência adquirida durante este estágio foi inestimável para o desenvolvimento profissional inicial, aprimorando a compreensão das condições médicas e cirúrgicas comuns em equinos.

Resumo

A piroplasmose equina é uma doença parasitária transmitida por carraças, causada pelos protozoários *Babesia caballi*, *Theileria equi* e pela nova espécie *Theileria haneryi*, manifestando-se clinicamente com uma ampla variedade de sintomas, que podem ir desde formas subclínicas a formas graves, como febre, anemia hemolítica, icterícia e insuficiência renal. A gravidade da infeção depende da espécie do parasita e da resposta imunológica do hospedeiro, sendo que animais infetados podem tornar-se reservatórios a longo prazo; *Babesia caballi* pode autolimitar-se ao fim de quatro anos, enquanto *Theileria equi* pode persistir durante toda a vida do equino. A disseminação da doença é condicionada pela distribuição dos vetores, condições ambientais e presença de hospedeiros suscetíveis, tendo um impacto económico significativo, especialmente em zonas endémicas, onde o comércio de equídeos pode ser prejudicado. O diagnóstico precoce é fundamental para o controlo da doença e a prevenção de complicações graves, sendo que métodos moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) demonstram ser mais eficazes na deteção precoce e precisa dos parasitas, comparativamente às técnicas tradicionais, como a observação de esfregaços sanguíneos. Este estudo, desenvolvido na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa durante o estágio realizado entre 12/02/2024 e 10/06/2024, teve como objetivo investigar a piroplasmose equina integrando dados hematológicos, com uma análise a 28 equídeos, dos quais 6 testaram positivo para *Theileria equi* e 0 para *Babesia caballi*. Os animais foram divididos em dois grupos (positivos e negativos para piroplasmose), e as médias dos parâmetros hematológicos de ambos foram comparadas. As alterações hematológicas nos equídeos infetados incluíram um aumento discreto dos neutrófilos e uma leucopénia acentuada. Esta análise das alterações hematológicas visa melhorar o diagnóstico e contribuir para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes de tratamento e prevenção, promovendo um controlo mais eficiente da piroplasmose equina.

Palavras-chave: Piroplasmose equina, *Babesia caballi*, *Theileria equi*, Carraças, Diagnóstico molecular, PCR, ELISA, Alterações hematológicas.

Abstract

Equine piroplasmosis is a tick-borne parasitic disease caused by the protozoa *Babesia caballi*, *Theileria equi* and the new species *Theileria haneryi*. It manifests clinically with a wide variety of symptoms, which can range from subclinical to severe forms such as fever, haemolytic anaemia, jaundice and kidney failure. The severity of the infection depends on the species of parasite and the host's immune response, and infected animals can become long-term reservoirs; *Babesia caballi* can self-limit after four years, while *Theileria equi* can persist throughout the equine's life. The spread of the disease is conditioned by the distribution of vectors, environmental conditions and the presence of susceptible hosts, and has a significant economic impact, especially in endemic areas, where the equine trade can be jeopardised. Early diagnosis is fundamental for controlling the disease and preventing serious complications. Molecular methods such as polymerase chain reaction (PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) have proved to be more effective in detecting parasites early and accurately than traditional techniques such as looking at blood smears. This study, carried out at the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Lisbon during my internship between 12/02/2024 and 10/06/2024, aimed to investigate equine piroplasmosis by integrating haematological data, with an analysis of 28 horses, 6 of which tested positive for *Theileria equi* and 0 for *Babesia caballi*. The animals were divided into two groups (positive and negative for piroplasmosis), and the averages of the haematological parameters of both were compared. Haematological changes in the infected horses included a slight increase in neutrophils and marked leukopenia. This analysis of haematological changes aims to improve diagnosis and contribute to the development of more effective treatment and prevention strategies, promoting more efficient control of equine piroplasmosis.

Keywords: Equine piroplasmosis, *Babesia caballi*, *Theileria equi*, Ticks, Molecular diagnosis
Molecular diagnosis, PCR, ELISA, Haematological changes.

Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

CMSP – células mononucleares do sangue periférico

DTV – As doenças transmitidas por vetores.

DL50 – Dose Letal Para 50% Dos Casos.

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético.

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática.

IFI – imunofluorescência indireta

INIAV – Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária.

PE – Piroplasmose Equina.

qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa.

WOAH – Organização Mundial De Saúde Animal.

Índice Geral

Relatório de estágio	I
Resumo.....	3
Abstract.....	4
Abreviaturas, Siglas e Acrónimos.....	5
Índice Geral.....	6
Índice de Quadros	7
Índice de Figuras.....	8
1. Introdução e Objetivos.....	9
1.1. Introdução.....	9
1.2. Objetivos	10
2. Revisão Bibliográfica	12
2.1 Nota história.....	12
2.2 Taxonomia e ciclo de vida.....	13
2.3 Vetores e transmissão.....	16
2.4 Epidemiologia.....	21
2.5 Sinais clínicos e resposta do sistema imunitário	24
2.6 Profilaxia e Tratamento	27
2.7 Diagnóstico	28
3. Materiais e Métodos	30
3.1. Amostras	30
3.2 Extração e quantificação de DNA.....	31
3.3 PCR e Esfregaços sanguíneos	31
3.4 Análise estatística.....	32
4. Resultados e Discussão.....	33
5. Conclusões.....	40
6. Bibliografia.....	42
7. Anexos	48

Índice de Quadros

Quadro I - Valores Das Plaquetas	39
--	----

Índice de Figuras

Figura 1 - Esfregaço sanguíneo de <i>Theileria Equi</i> (A) e <i>Babesia Caballi</i> (B)	12
Figura 2 - ciclo de vida de <i>theileria Equi</i>	14
Figura 3 - ciclo de vida de <i>Babesia Caballi</i>	15
Figura 4 – Exemplar de <i>Hyalomma</i>	17
Figura 5 – Exemplar de <i>Dermacentor</i>	17
Figura 6 – Exemplar de <i>Rhipicephalus</i>	17
Figura 7 - Rotas de transmissão possíveis da piroplasmose equina	19
Figura 8 - Principais regiões de ocorrência dos ixodídeos.....	20
Figura 9 - Mapa mundial de ocorrência de <i>T. equi</i>	22
Figura 10 – Mapa Mundial de ocorrência de <i>B. caballi</i>	23
Figura 11 - Exemplos de sinais clínicos da PE.	24
Figura 12 - Esquema da patogenia do quadro Agudo da PE	26
Figura 13 - Diagnóstico/ Motivo para a análise	33
Figura 14 - Comparação das contagens de eritrócitos entre grupos	34
Figura 15 – Comparação das contagens de Leucócitos entre grupos	35
Figura 16 – Comparação das contagens de Neutrófilos entre grupos	35
Figura 17 – Comparação das contagens de Linfócitos entre grupos	37

I. Introdução e Objetivos

I.1. Introdução

A piroplasmose equina (PE) é uma doença parasitária transmitida por vetores, sendo as as carraças dos géneros *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Hyalomma*, *Ixodes* e *Amblyomma* as de maior relevância. Esta doença representa uma preocupação considerável para a saúde dos equinos a nível mundial. É causada por parasitas protozoários como *Babesia caballi*, *Theileria equi* de distribuição mundial e a recentemente identificada *Theileria haneyi* nos Estados Unidos, não tendo sido registados casos na União Europeia até à data (Wise et al., 2014). A propagação da doença é afetada pela distribuição geográfica dos vetores naturais, pelas condições ambientais que suportam a sua sobrevivência e pela presença de hospedeiros suscetíveis, particularmente equinos não imunizados (Scoles & Ueti, 2015). Os cavalos infetados podem servir de reservatórios para *B. caballi* durante vários anos. A investigação sugere que a doença pode tornar-se autolimitada após quatro anos de infeção, ao passo que os cavalos infetados com *T. equi* podem permanecer infetados durante toda a vida (Zweygarth et al., 2002).

A piroplasmose equina é uma preocupação constante para os criadores, veterinários e tratadores de cavalos devido ao seu impacto no bem-estar dos animais, implicações económicas e *performance* desportiva. A presença da doença em áreas endémicas complica ou mesmo impede a venda de cavalos, tanto a nível nacional como internacional (Wise et al., 2014). A doença pode manifestar-se desde uma forma clínica grave a casos subclínicos em que os sinais clínicos são mínimos ou inexistentes. Os casos podem variar de agudos a subagudos, crónicos e assintomáticos. As manifestações clínicas podem incluir febre, anemia hemolítica, icterícia, trombocitopenia, leucopenia, insuficiência renal e outras anomalias relacionadas com as células sanguíneas. Foram documentados casos de transmissão trans-placentária de éguas para potros, que podem resultar em aborto ou morte peri-natal se não forem diagnosticados e tratados rapidamente (Rüegg et al., 2020).

Nos casos subclínicos, os animais podem estar infetados sem apresentarem sinais clínicos óbvios, o que torna o diagnóstico e as medidas de controlo particularmente difíceis. A deteção rápida e sensível da doença é crucial para gerir os surtos a nível regional e para prevenir o seu aparecimento em áreas não endémicas (Scoles & Ueti, 2015).

Uma compreensão abrangente das alterações hematológicas na piroplasmose equina é crucial não só para o diagnóstico e monitorização da doença, mas também para fornecer informações sobre a resposta imunitária do hospedeiro ao parasita, a progressão e a gravidade da infeção, além de contribuir para o desenvolvimento de estratégias eficazes de prevenção, diagnóstico e tratamento (Zweygarth et al., 2002). A dinâmica de transmissão, a epidemiologia, e a suscetibilidade ao tratamento variam consoante o hemoparasita específico envolvido, sendo que o diagnóstico precoce desta doença é vital para orientar intervenções terapêuticas adequadas e minimizar o risco de complicações graves. Recentemente, os métodos de diagnóstico molecular tornaram-se instrumentos inestimáveis para a deteção precoce de infeções e para a diferenciação precisa entre as espécies *Babesia caballi* e *Theileria equi*, permitindo não só a identificação da presença do parasita, mas também a avaliação da diversidade genética dentro das populações do parasita e a sua relação com a resistência ao tratamento, facilitando assim uma compreensão mais profunda da epidemiologia e patogénese da piroplasmose equina (Scoles & Ueti, 2015).

Estes avanços contribuem para uma identificação mais rápida e exata das infeções e podem fornecer informações valiosas sobre a distribuição geográfica das espécies de parasitas e a prevalência da doença em várias regiões (Scoles & Ueti, 2015). A deteção direta de parasitas através de esfregaços de sangue, biópsias de linfonodos ou exames histológicos também pode ajudar na deteção rápida; no entanto, este método tem limitações significativas e não é tão fiável como a PCR ou o ELISA, sendo este último considerado o teste de referência pela WOA (Wise et al., 2014).

1.2. Objetivos

Este estudo tem como objetivo explorar não só o diagnóstico molecular da piroplasmose equina, mas também as alterações hematológicas associadas. Ao tentar identificar padrões de alterações em cavalos com doença clínica e subclínica através de uma abordagem interdisciplinar, pretendemos melhorar a compreensão atual da epidemiologia, patogénese e impacto clínico desta doença. Ao integrar dados moleculares e hematológicos, esta investigação contribuirá para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes de diagnóstico, tratamento, controlo e prevenção. Deste modo, os objetivos específicos são:

- Determinar, através de técnicas moleculares, a infecção por *Theileria equi* e *Babesia caballi* num grupo de animais admitidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária;
- Analisar, determinar e comparar as alterações hematológicas nos vários grupos de animais;

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Nota história.

A doença foi documentada pela primeira vez em 1883 por Wiltshire, que a denominou "febre do carbúnculo" em cavalos (Wiltshire, 1883). Em 1901, Arnold Theiler distinguiu a pleuropneumonia equina da piroplasmose equina (De Waal & Potgieter, 1987). Nesse mesmo ano, Laveran identificou o parasita como *Piroplasma* após o ter descoberto no sangue de cavalos (Laveran, 1901), por esfregaço sanguíneo como podemos observar na Figura 1.

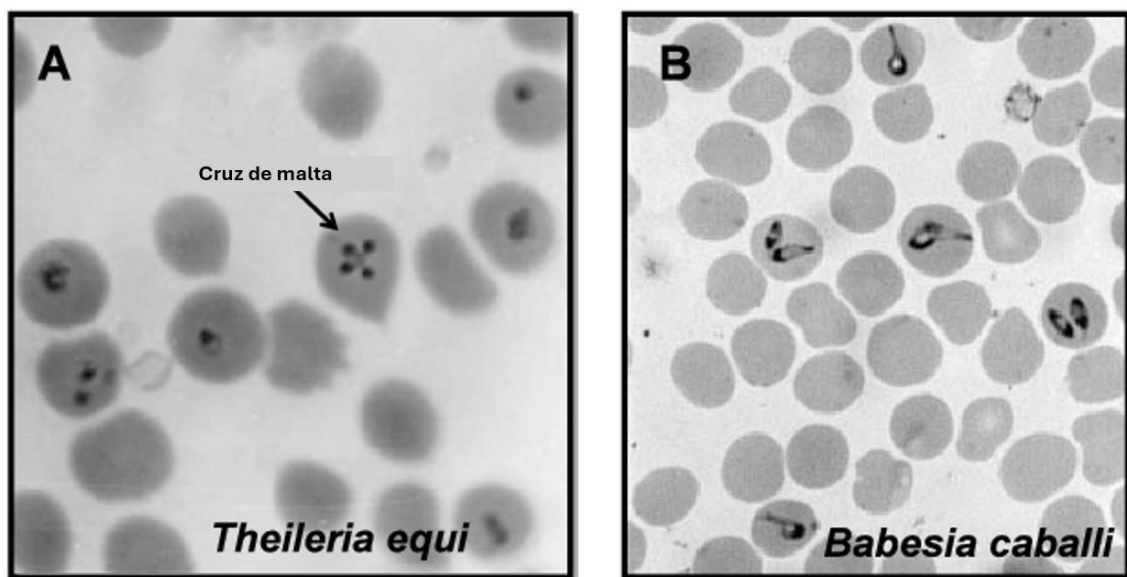


FIGURA 1 - ESFREGAÇO SANGUÍNEO DE *THEILERIA EQUI* (A) E *BABESIA CABALLI* (B)

(Nizoli, L. Q, 2016)

De seguida, foram identificadas duas variantes diferentes, classificando-se como *Piroplasma equi* e *Piroplasma caballi*. No entanto, *Piroplasma equi* foi posteriormente reclassificado como *Theileria equi*, com base nas suas características genéticas e ciclo de vida, enquanto *Piroplasma caballi* passou a ter o nome *Babesia caballi* (Salim et al., 2010).

Há indicações de que a doença pode ter sido observada em animais na Indochina Francesa e na Sardenha, em Itália, no início do século XIX (Schein, 1917). Os primeiros relatos de casos no Hemisfério Ocidental ocorreram em 1913 e 1917, no Canal do Panamá e em Barbados, respetivamente. Inicialmente, o parasita foi classificado como *Piroplasma equi* devido à sua semelhança com infeções de malária humana (Theiler, 1903; Sumbria, Moudgil, & Singla, 2014). Desde então, foram documentados casos em várias

regiões do mundo (Battsetseg et al., 2002; Apanaskevich & Horak, 2008; Onyiche et al., 2019). Eventualmente, reconheceu-se que dois agentes patogénicos distintos estavam envolvidos (Bhoora et al., 2010; Scoles & Ueti, 2015).

Desde a sua descoberta (Laveran, 1901), a taxonomia destes parasitas enfrentou vários desafios, levando a múltiplas renomeações e reclassificações. Atualmente, *B. caballi* é reconhecido como uma "verdadeira Babesia", enquanto *T. equi* foi categorizado como *Theileria* com base no seu estágio de vida extra-eritrocitário em linfócitos e na ausência de transmissão transovariana em carraças (Mehlhorn & Schein, 1998). Investigações moleculares sugerem que a *Theileria haneyi* exibe características tanto de *Babesia* quanto de *Theileria*, potencialmente colocando-a entre os dois géneros (Allsopp et al., 1994; Tirosch-Levy et al., 2020).

2.2. Taxonomia e ciclo de vida

A piroplasmose é uma doença transmitida por carraças, causada pelos hemoprotozoários *Theileria equi* e *Babesia caballi* (Guidi, 2015), bem como pela espécie recentemente identificada *Theileria haneyi* encontrada na América do Norte (Knowles et al., 2018), que ainda não foi relatada na Europa (Knowles et al., 2018). Estes parasitas são classificados como organismos intracelulares obrigatórios, pertencentes ao filo Apicomplexa, ordem Piroplasmida (Kappmeyer et al., 2012). Os géneros *Theileria* e *Babesia* estão classificados nas famílias Theileriidae e Babesiidae, respetivamente. As espécies de parasitas responsáveis pela PE têm ciclos de vida que, embora complexos, são fundamentalmente semelhantes, apresentando, no entanto, algumas diferenças. Esses ciclos incluem uma fase haploide assexuada e uma fase sexual diploide. O ciclo de vida de *T. equi* e *B. caballi* foi descrito em detalhes por vários autores, incluindo Moltmann (1983), Mehlhorn e Schein (1984), Schein (1988) e Zapf e Schein (1994).

Um ciclo de vida típico dos apicomplexa destes dois géneros consiste em três fases distintas que ocorrem tanto no hospedeiro como nas carraças. Estas fases incluem: uma fase de reprodução assexuada nas glândulas salivares (esporogonia), uma fase de reprodução assexuada no hospedeiro vertebrado (merogonia ou esquizogonia), e uma fase de reprodução sexual que envolve a formação e fusão de gâmetas no intestino da carraça (gametogonia) (Ueti & Knowles, 2018). Além disso, *T. equi* engloba uma fase adicional, na qual ocorre multiplicação extraeritrocítica, resultando num total de quatro

fases no seu ciclo de vida, que inclui a esquizogonia que ocorre nas células mononucleares do sangue periférico (CMSP) (Onyiche, 2019).

Quando os vetores adequados ingerem sangue com eritrócitos infectados, o parasita sofre uma transformação nas suas formas sexuais no lúmen do intestino médio. Os gametas fundem-se então para criar um zigoto diploide, que penetra nas células epiteliais do intestino médio e se desenvolve em oocinetes (zigotos móveis) (Mehlhorn & Schein, 1998). No caso do *T. equi*, estes oocinetes saem das células epiteliais do intestino médio e navegam através da hemocélio da carraça, acabando por chegar às glândulas salivares, onde sofrem meiose para se transformarem em esporozoítos haploides. Estes esporozoítos, que são a forma infecciosa para os cavalos, e são libertados na saliva durante o processo de alimentação da carraça, ocorrendo assim a transmissão biológica (Schein, 1917) (Ueti, Palmer, Kappmeyer, Statfield, Scoles, & Knowles, 2005) (Figura 2).

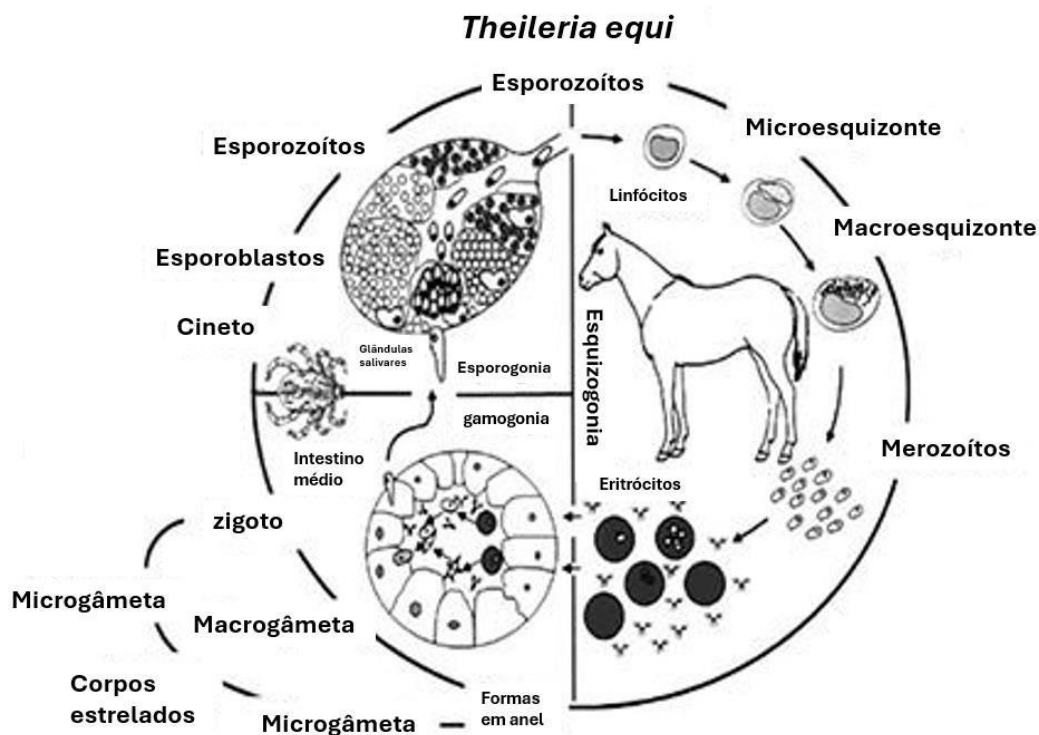


FIGURA 2 - CICLO DE VIDA DE *THEILLERIA EQUI*

(Díaz-Sánchez et al., 2020)

Em contrapartida, na *B. caballi*, os oocinetes infectam vários órgãos internos da carraça à medida que se deslocam através da hemolinfa, incluindo os ovários, permitindo a transmissão vertical ao infectar os ovos da carraça (Figura 3).

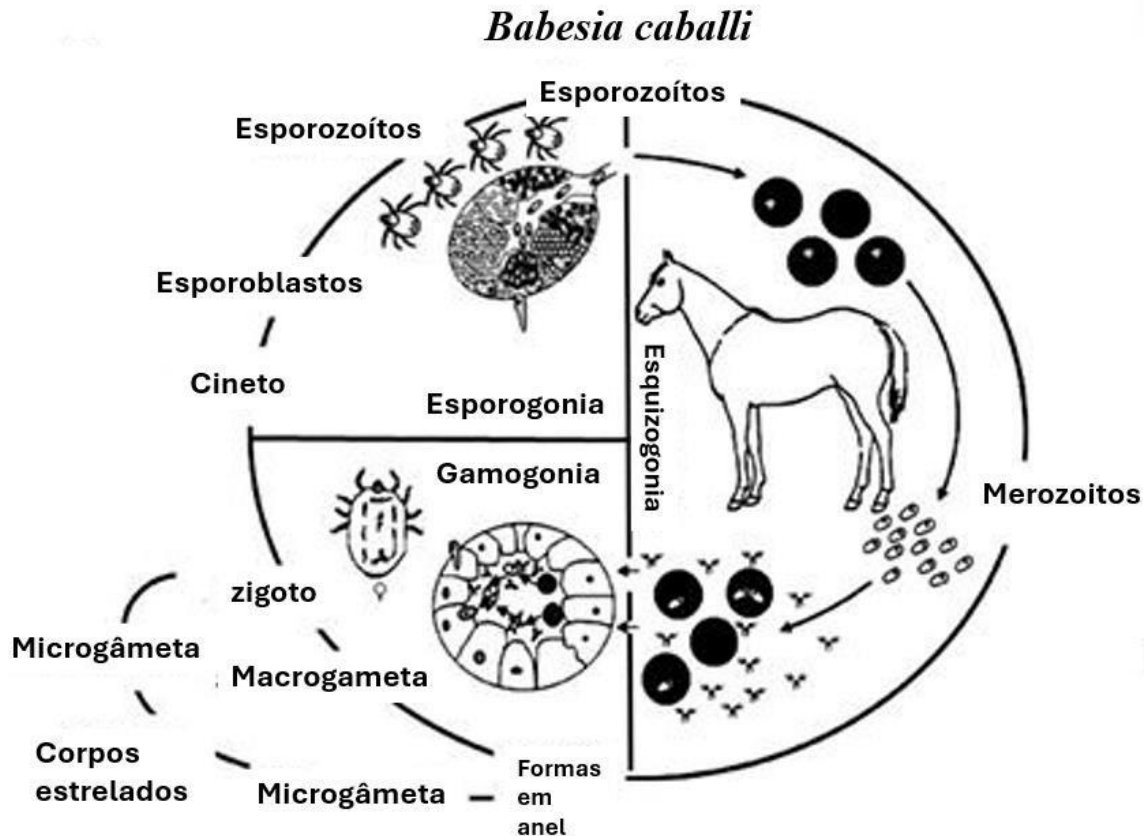


FIGURA 3 - CICLO DE VIDA DE *BABESIA CABALLI*

(Díaz-Sánchez et al., 2020)

Da mesma forma que na *T. equi*, os oocinetos, também invadem as glândulas salivares. No caso da reprodução assexuada do *T. equi*, esta ocorre inicialmente nos linfócitos, onde se multiplicam assexuadamente para formar esquizontes e, por fim, merozoítos. Estes merozoítos são então libertados na circulação sistêmica e começam a invadir os eritrócitos, um processo partilhado por ambos os parasitas (Tamzali, 2013), resultando na aparência distinta em forma de gota das fases intra-eritrocitárias destes parasitas (merozoítos). A replicação dentro dos eritrócitos resultará na lise celular e na subsequente libertação de merozoítos, que depois invadem novas células-alvo (Scoles & Ueti, 2015; Tirosh-Levy et al., 2020).

Os eritrócitos infetados que circulam na corrente sanguínea podem ser consumidos durante a alimentação por ixodídeos, aumentando significativamente a população de vetores naturais capazes de transmitir a doença. Após a ingestão de merozoítos de *B. caballi* e/ou merozoítos e gametócitos de *T. equi*, algumas dessas formas persistem no abdômen das carraças e sofrem reprodução assexuada em gametócitos, que

posteriormente se reproduzem sexualmente, formando zigotos (Rothschild, 2013). Este processo inicia novamente o ciclo.

2.3. Vetores e transmissão

As carraças servem como hospedeiros para *T. equi* e *B. caballi*, uma vez que os parasitas completam o seu desenvolvimento sexual dentro da carraça, cumprindo assim o seu ciclo de vida. Esta relação está intimamente entrelaçada e coadaptada, o que significa que a associação vetor-hospedeiro é limitada a algumas poucas espécies de carraças que são competentes (Mehlhorn & Schein, 1984; Zapf & Schein, 1994). Dada a importância desta relação vetorial na epidemiologia destes parasitas, enfatizamos o entendimento atual da ecologia das carraças relacionada com estes patógenos equinos transmitidos por carraças, focando-nos na transmissibilidade das carraças e explorando possíveis medidas de controlo para mitigar a sua propagação (Scoles & Ueti, 2015).

Ao examinar uma doença transmitida por vetores, uma perspetiva eco-epidemiológica é essencial para uma compreensão completa de como o patógeno circula entre as populações. O leque de hospedeiros da piroplasmose equina (PE) inclui cavalos, burros, mulas e zebras. Diversos estudos epidemiológicos têm-se concentrado na prevalência de PE em equídeos, dando maior ênfase aos cavalos em comparação com burros e mulas (Onyiche et al., 2019; Fuehrer et al., 2020).

Consequentemente, a PE representa uma preocupação significativa para a saúde animal e resulta em perdas económicas substanciais para a indústria equina, incluindo a diminuição do desempenho dos cavalos, os custos de tratamento e a exigência de resultados negativos em testes de diagnóstico para exportações internacionais de cavalos (Camino et al., 2020). Assim, a PE é uma grande preocupação para todo o setor equino, exigindo medidas globais para controlar a propagação da doença, especialmente porque atualmente não existe uma vacina disponível para prevenir infeções causadas por *B. caballi* e *T. equi*. As carraças desempenham um papel crucial na manutenção da estabilidade e na transmissão natural dos piroplasmas associados à piroplasmose equina. A distribuição global e a propagação desta doença dependem da presença de vetores competentes que possam transportar estes patógenos. Vários esforços têm sido feitos para identificar as espécies de carraças que são capazes e, portanto, responsáveis pela transmissão dos parasitas da piroplasmose equina em equídeos (Rothschild, 2013; Scoles & Ueti, 2015; Walker, Keirans, & Horak, 2005).

Seis géneros foram considerados como possíveis vetores competentes para *B. caballi*, *T. equi*, ou ambos: *Amblyomma*, *Dermacentor*, representado na figura 5, *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, representado na figura 4, e *Rhipicephalus*, representado na figura 6, (Scoles & Ueti, 2015) e mais de 30 espécies de carraças (Allsopp, Lewis, & Penzhorn, 2007)



Figura 5 – Exemplar de *Dermacentor*
(ESCCAP UK & Ireland, 2011)



FIGURA 4 – Exemplar de *Hyaloma*
(ESCCAP UK & Ireland, 211)



Figura 6 - Exemplar de *Rhipicephalus*
(ESCCAP UK & Ireland, 2011))

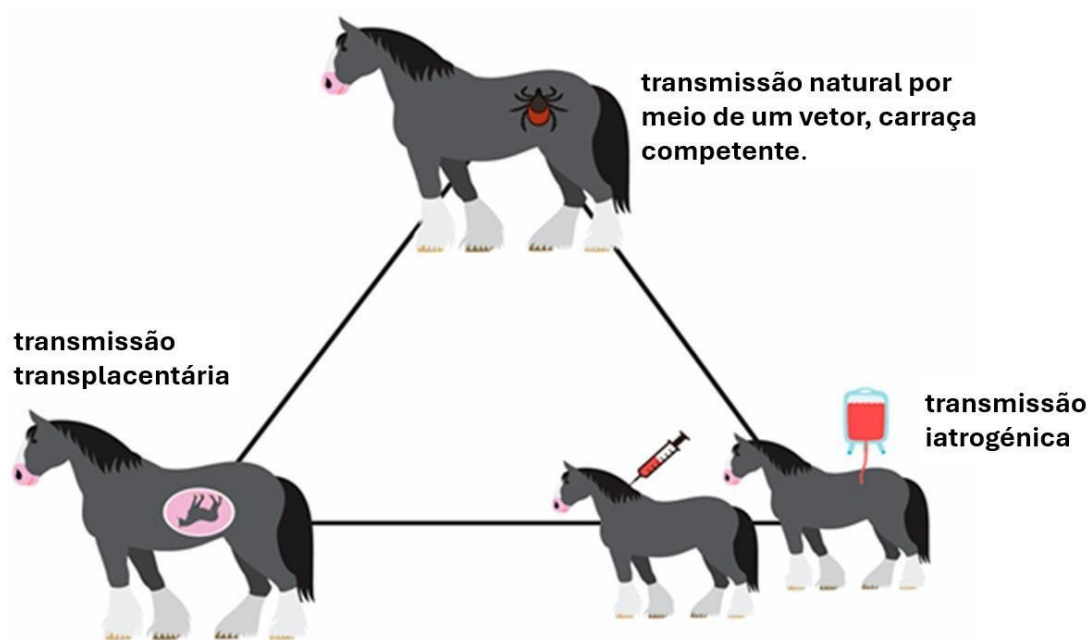
No entanto, há literatura que apoia a noção de existirem espécies adicionais de carraças envolvidas (Onyiche et al., 2019), considerando que a maioria das pesquisas realizadas se concentrou em carraças com uma forte associação aos equídeos, resultando em

informações limitadas ou inexistentes sobre outras espécies. As carrças dos géneros *Hyalomma*, *Dermacentor* e *Rhipicephalus* são reconhecidas como vetores biológicos de *T. equi* e *B. caballi* (De Waal, 1992; Stiller, Goff, Johnson, & Knowles, 2002). Outros géneros de carrças, como *Amblyomma*, *Haemaphysalis* e *Ixodes*, são considerados vetores potenciais, embora isso ainda não tenha sido confirmado (Scoles & Ueti, 2015). A manutenção estável de qualquer parasita dentro de um ciclo de transmissão endémico natural não pode ocorrer sem vetores. Consequentemente, a distribuição global da piroplasmose equina (PE) está intimamente associada à distribuição de carrças vetoras competentes (Zapf & Schein, 1994).

Para compreender a transmissão de doenças transmitidas por vetores, é essencial distinguir entre competência vetorial e capacidade vetorial.

Competência vetorial refere-se à capacidade da carrça de transmitir um patógeno, o que ocorre quando o parasita é capaz de se desenvolver e/ou propagar dentro do vetor. Em contraste, capacidade vetorial mede a eficiência geral da transmissão, incorporando vários fatores adicionais. Para que uma carrça seja um vetor eficaz, deve possuir competência vetorial e uma combinação de outros fatores que contribuem para a sua capacidade vetorial (Rosa e Pugliese, 2007). Sem competência vetorial, a transmissão não pode ocorrer.

Devido às variações nos seus ciclos de vida, os dois parasitas utilizam métodos distintos de transmissão como demonstrado figura 7 (Scoles & Ueti, 2015). A transmissão pode ocorrer por via transplacentária, transstadial ou intrastadial. No caso de *T. equi*, as infeções in útero podem levar a abortos, nascimentos de potros mortos ou potros vivos com piroplasmose neonatal (Allsopp et al., 2007). Transmissões verticais de infeções por *Theileria equi* foram documentadas por vários pesquisadores em cavalos de países como África do Sul, Trinidad e Índia (Chhabra et al., 2012), bem como em mulas no Brasil (Françoso et al., 2018). Esta transmissão é influenciada pela genética individual do cavalo ou estirpe (Wise et al., 2013). A transmissão transplacentária de *Babesia caballi* foi reportada apenas em Trinidad (Sant et al., 2016). Assim, segundo o conhecimento dos autores, este pode representar o primeiro relato de transmissão transplacentária de *B. caballi* na Europa, observado exclusivamente através de protocolos de PCR em tempo real (Bartolomé del Pino et al., 2023).



**FIGURA 7 - ROTAS DE TRANSMISSÃO POSSÍVEIS DA PIROPLASMOSE EQUINA
(Scoles & Ueti, 2015)**

Por outro lado, *B. caballi* é tipicamente transmitida por via transovarial, onde a infecção migra do intestino médio para os ovários, infiltrando os ovos e, conseqüentemente, a prole, embora também se observe transmissão intrastadial. As diferenças nos ciclos de vida levam a padrões distintos de endemicidade para cada espécie de parasita.

Em regiões endêmicas, os animais frequentemente encontram ambos os parasitas desde uma idade jovem, desenvolvendo subsequentemente imunidade. A infecção por *T. equi* geralmente persiste ao longo da vida do animal, levando a uma prevalência crescente com a idade. Em contraste, a prevalência de *B. caballi* não se correlaciona com a idade e é mais alta em animais mais jovens (De Waal, 1992; Scoles & Ueti, 2015; Tirosh-Levy et al., 2020). Globalmente, *T. equi* tem uma prevalência maior do que *B. caballi* (Prasad, Kumar, & Kumar, 2019), o que pode ser atribuído a variações na biologia dos vetores e diferenças na persistência do parasita no hospedeiro equino (Scoles & Ueti, 2015).

Segundo Bravo-Barriga et al. (2022), o principal modo de transmissão de *B. caballi* é através da disseminação transovarial pelos vetores, enquanto para *T. equi*, a transmissão transplacentária pode ocorrer, tornando os animais infectados os principais veículos de disseminação da doença (Bravo-Barriga et al., 2022).

Além disso, a transmissão iatrogénica pode ocorrer através da reutilização de agulhas ou materiais contaminados com o sangue de animais infetados, embora este modo de transmissão seja raro e estudos sugiram que não contribui significativamente para a propagação da doença; no entanto, continua a ser um fator a considerar (Bajer et al., 2022).

O local primário de infestação é a região perineal, na crina e entre os membros posteriores, embora também possa se fixar no divertículo nasal, na cavidade auricular (Labruna et al., 2002).

A elevada concentração de ectoparasitas observada na figura 8 representa uma ocorrência rara.



Figura 8 - Principais regiões de ocorrência dos ixodídeos: A- Pavilhão auricular, B – Região perineal, C – Região da Crina

(Labruna et al., 2002)

Todas as espécies equinas são suscetíveis à infeção, embora haja poucos relatos clínicos da doença em burros, mulas e zebras (Tamzali, 2013; Barros et al, 2018). A doença crónica é principalmente documentada em burros (Tirosh-Levy et al., 2020).

2.4.Epidemiologia

À medida que as doenças transmitidas por vetores (VBD) têm sido cada vez mais relatadas em cavalos a nível global (Brown & Torres, 2008), várias VBDs equinas têm uma importância zoonótica, com os cavalos a atuarem potencialmente como sentinelas para infeções humanas. Apesar da sua distribuição cosmopolita, *T. equi*, *B. caballi* e os seus vetores naturais são endémicos em climas tropicais e subtropicais (de Waal, 1992), especialmente no sul da Europa, Médio Oriente, Ásia, África e América Latina (Organização Mundial de Saúde Animal [OIE], 2018). Nas regiões endémicas, infeções latentes, com ambos os parasitas, são frequentemente observadas em cavalos, tornando os portadores assintomáticos uma fonte de infeção capaz de transmitir a doença (Chauvin et al., 2009). A piroplasmose equina é reconhecida como endémica em vários países de África, Ásia e Américas (Onyiche, Taioe, et al., 2020; Rothschild, 2013), especialmente na bacia do Mediterrâneo, na Europa (Camino et al., 2018; Zanet et al., 2017). Esta ampla distribuição é provavelmente sustentada, em parte, pelo movimento internacional de animais cronicamente infetados.

Estima-se que 90% da população global de cavalos resida em áreas endémicas de PE, o que levou à realização de numerosos estudos sobre a ocorrência, prevalência, fatores de risco e características destes parasitas em várias regiões do mundo. Nessas áreas endémicas, a maioria dos equídeos é exposta ao agente patogénico desde o primeiro ano de vida, com uma taxa de mortalidade associada que varia entre 5% e 10%. Por outro lado, a introdução de cavalos infetados em regiões não endémicas onde existem vetores competentes (João Gil de Barros, 2018) frequentemente resulta em taxas de mortalidade superiores a 50% (Rothschild, 2013), uma vez que a distribuição e disseminação de patógenos transmitidos por vetores são influenciadas pela presença de artrópodes vetores competentes, ou seja, capazes de transmitir esses patógenos (Fuehrer et al., 2020).

Com a globalização crescente da indústria equina, surgiram preocupações sobre a propagação geográfica da Piroplasmose Equina (PE) e a transmissão dos seus vetores naturais em áreas não endémicas. Esta situação é agravada pelas alterações climáticas, medidas de monitorização insuficientes e as barreiras entre certos países (Wise, Kappmeyer, Mealey & Knowles, 2013).

Em 2013, a população global de equídeos domésticos era de cerca de 112 milhões, com muitos destes animais encontrados em países em desenvolvimento onde são amplamente utilizados como animais de trabalho. Notavelmente, cerca de 23,7% da população equina doméstica mundial vive na África, onde frequentemente coexistem de perto com reservatórios selvagens (Phipps & Otter, 2004; Silva et al., 2017). Embora a PE seja significativamente relevante em regiões onde os cavalos ainda são uma fonte crítica de força de tração, o seu impacto económico principal reside nas implicações para o movimento internacional de cavalos para fins comerciais e participação em eventos desportivos globais (Bartolomé del Pino, Meana, Zini, & Cersini, 2023).

Os países que afirmam ter status livre de PE impõem restrições à entrada de cavalos infectados com base em testes sorológicos. Tirosh-Levy, Gottlieb, Fry, Knowles e Steinman (2020) realizaram uma análise da prevalência global da piroplasmose equina e da sua distribuição pelos continentes. Este estudo baseou-se numa média ponderada da prevalência relatada, derivada de artigos relevantes que abrangeram os anos de 2000 a 2019. A análise foi realizada separadamente para cada parasita, fornecendo dados que facilitaram a criação de mapas de distribuição representados nas Figuras 9 e 10.

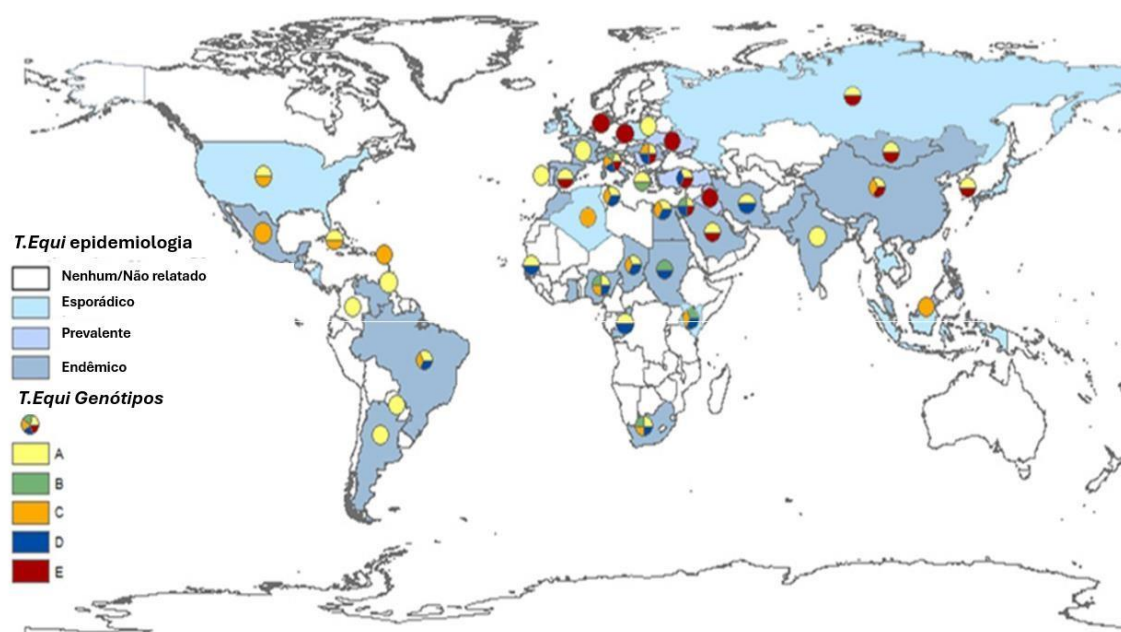


FIGURA 9 - MAPA MUNDIAL DE OCORRÊNCIA DE *T. EQUI*. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS PUBLICADOS ENTRE 2000 E 2019. Endêmica: MAIS DE 30%, PREVALENTE: 10–29%, ESPORÁDICA: MENOS DE 10% OU SURTOS SINGULARES (Onyiche et al., 2019)

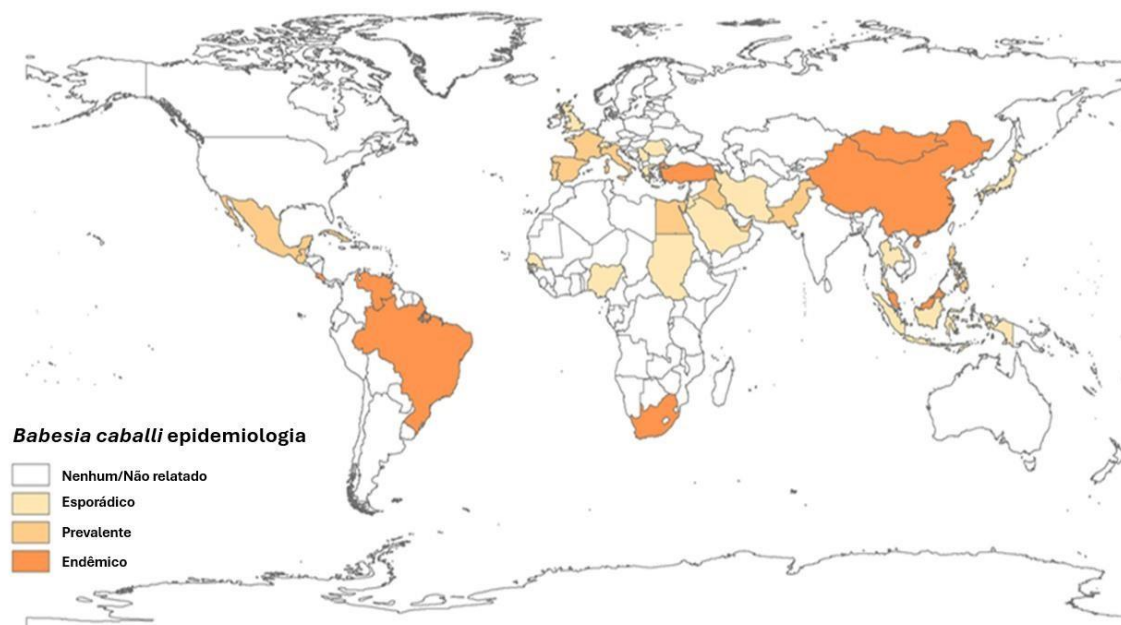


Figura 10 – Mapa Mundial de ocorrência de *B. caballi*. o mapa foi construído com base em dados epidemiológicos publicados entre 2000 e 2019. Endêmica: mais de 30%, prevalente: 10–29%, esporádica: menos de 10% ou surtos singulares. (Onyiche et al., 2019)

Embora os dados sobre a prevalência da Piroplasmose Equina (PE) em Portugal sejam limitados, estima-se que tenha permanecido relativamente estável nas últimas décadas, variando entre 45% e 65% da população equina. Isto posiciona o país como tendo um status endêmico para a doença (Sabino-Serra, da Fonseca, de Carvalho & CarvalhoVarela, 1993; Vinhas, 2014). A piroplasmose equina está amplamente distribuída e continua a expandir-se para regiões mais temperadas que anteriormente eram consideradas livres do parasita (Tirosh-Levy, Gottlieb, Fry, Knowles, & Steinman, 2020). De acordo com dados da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, aproximadamente 90% da população equina doméstica global (cavalos, burros e mulas) reside em áreas onde a doença é endêmica. Em regiões endêmicas, as taxas de infecção em equídeos domésticos frequentemente ultrapassam 60%, e em algumas áreas, mais de 90% dos animais estão infetados com um ou ambos os parasitas.

Existem casos documentados da doença em humanos, particularmente na França, Alemanha e Reino Unido (Hildebrandt et al., 2021). A abordagem One Health tem sido utilizada na investigação desta doença (por exemplo, Sevestre et al., 2021; Markowicz et al., 2021). Observações atuais indicam uma crescente exposição dos humanos na Europa, atribuída ao aumento da proximidade com os vetores e ao crescente número de portadores assintomáticos (Bajer et al., 2022).

2.5. Sinais clínicos e resposta do sistema imunitário.

Os sintomas clínicos associados a ambas as infecções parasitárias apresentam semelhanças, variando desde casos assintomáticos até manifestações agudas, subagudas e crônicas. Em casos graves, a infecção pode ser fatal. No entanto, estudos sugerem que *T. equi* tende a exibir maior agressividade em relação ao hospedeiro. A maioria dos cavalos infetados permanece assintomática (Bajer et al., 2022). Há uma evidência crescente de que a co-infecção com *B. caballi* e *T. equi*, juntamente com outras doenças transmitidas por carraças, pode agravar o curso da doença em indivíduos afetados (Tirosh-Levy et al., 2020). A infecção manifesta-se com graus variados de anemia hemolítica, insuficiência multiorgânica e sinais sistêmicos associados, figura 11 (Reed, Bayly, & Sellon, 2017; Bravo-Barriga et al., 2022).



Figura 11 - Exemplos de sinais clínicos da PE.

A forma crônica da piroplasmose equina é mais comumente observada em burros do que em cavalos, apresentando-se como uma redução no apetite e perda de peso. No entanto, tanto em cavalos quanto em burros, foram reportados casos de aborto e mortalidade neonatal (De Waal & van Heerden, 2004; Laus et al., 2015; Nadal, Bonnet, & Marsot, 2021).

A doença aguda é caracterizada por sintomas como febre, mal-estar, diminuição do apetite, aumento das taxas cardíaca e respiratória, anorexia, obstipação seguida de diarreia, taquicardia, petéquias, esplenomegalia, trombocitopenia e anemia hemolítica, que pode levar a hemoglobínúria e icterícia (Rothschild, 2013; Wise, Kappmeyer, Mealey, & Knowles, 2013).

A anemia hemolítica autoimune e a hemólise intravascular resultam da infecção dos eritrócitos pelos parasitas. Durante esta infecção, ocorrem alterações na estrutura das

proteínas da membrana das células vermelhas do sangue, bem como mudanças no conteúdo lipídico, levando à redução do fluxo sanguíneo nos pequenos vasos (Wise, Kappmeyer, Mealey, & Knowles, 2013).

Este processo também leva ao aumento dos níveis de subproduto da peroxidação lipídica, que contribuem para a acumulação de iões oxidativos, causando mais danos às células vermelhas do sangue e resultando na sua rotura (hemólise) (Ambawat, Malhotra, Kumar, & Dhar, 1999). A hemólise contínua desencadeia uma série de eventos, incluindo redução do volume sanguíneo, presença de hemoglobina na urina (hemoglobinúria) e coloração amarela da pele e mucosas (icterícia). Estes efeitos estão comumente associados à infecção por *T. equi*.

Por outro lado, na infecção por *B. caballi*, ocorre obstrução dos pequenos vasos sanguíneos devido à agregação de células vermelhas do sangue parasitadas. Além disso, a infecção por ambos os parasitas está associada à trombocitopenia, caracterizada por níveis reduzidos de plaquetas no sangue e tempos de coagulação prolongados (Allen, Frerichs, & Holbrook, 1975). Embora os mecanismos exatos permaneçam pouco claros, acredita-se que a trombocitopenia possa resultar da destruição das plaquetas pelo sistema imunitário ou da sua retenção no baço (Wise, Kappmeyer, Mealey & Knowles, 2013).

O quadro agudo da doença é marcado por anemia hemolítica de gravidade variável e sinais clínicos pouco específicos. Como demonstrado na figura 12.

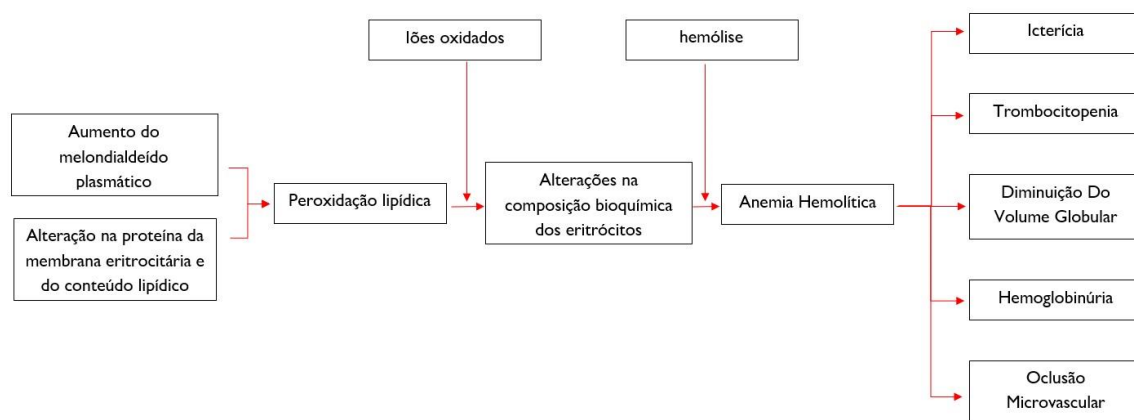


Figura 12 - Esquema da patogenia do quadro Agudo da PE (Rothschild, 2013)

No entanto, muitos dos animais infetados manifestam uma doença subclínica, tornando-se portadores assintomáticos que servem como reservatórios para a transmissão da infeção a animais não infetados (Rothschild, 2013).

A resposta do sistema imunológico às infeções por *T. equi* e *B. caballi* é crucial para o controlo da doença e para a manutenção do estado de portador assintomático. A resposta imunológica dos equinos à infeção por estes protozoários é complexa e abrangente. Em regiões onde a piroplasmose equina é endémica, a baixa parasitémia nos animais favorece uma estimulação contínua do sistema imunológico, aumentando a resistência ao aparecimento de sintomas clínicos (Tamzali, 2013). Os anticorpos são detetados entre 7 a 11 dias após a infeção, atingindo um pico entre 30 e 54 dias após a infeção.

Após a infeção por *T. equi* ou *B. caballi*, os cavalos desenvolvem uma imunidade protetora, tornando-se portadores, embora possam permanecer assintomáticos enquanto o sistema imunológico controla a parasitose (Rothschild, 2013). Não há imunidade cruzada entre os parasitas, o que permite a coexistência de infeções (Maurer, 1962). A imunidade inata, envolvendo macrófagos, neutrófilos e células *natural killer* (NK), desempenha um papel vital, embora o mecanismo preciso de controlo dos parasitas permaneça incompletamente compreendido (Ahmed, 2002).

A resposta imunológica adaptativa é essencial, particularmente contra *T. equi*, embora as funções específicas das células T e B não estejam totalmente esclarecidas (Knowles et al., 1994). Além disso, existe uma correlação direta entre os níveis de anticorpos e a quantidade de parasitas na corrente sanguínea dos cavalos infetados com *T. equi*. A imunoglobulina G equina desempenha um papel significativo na resposta imunitária, com várias subclasses aumentando durante diferentes estágios da infeção por *T. equi* (Cunha et al., 2006). A imunidade protetora contra *B. caballi* é menos bem compreendida, embora pareça que a imunidade mediada por células e as citocinas desempenham um papel importante (Wise et al., 2013). Os anticorpos maternos oferecem proteção para os potros jovens, mas a sua diminuição torna os potros vulneráveis à infeção (Onyiche et al., 2019).

2.6. Profilaxia e Tratamento

Na sua investigação inicial sobre a piroplasmose equina (PE), Zasukhin (1935) propôs métodos para gerir infestações de carrças, incluindo a imersão de cavalos em soluções acaricidas, a queima de pastagens e a utilização de gado antes da colocação de equinos em pastagens com o objetivo de diminuir a disponibilidade dos vetores para infetarem equídeos. Também enfatizou a importância da vigilância epidemiológica na compreensão da distribuição da PE e na identificação de áreas endémicas (Scoles & Ueti, 2015).

A vigilância engloba a recolha de dados sobre a prevalência da doença e a monitorização dos vetores. A monitorização ativa de carrças em regiões endémicas é crucial para identificar espécies de vetores, taxas de infeção e fatores de risco. Além disso, a vigilância passiva através de relatórios clínicos reforça estes esforços.

As estratégias de controlo visam minimizar a exposição dos equídeos às carrças e interromper o ciclo de transmissão, envolvendo a aplicação de repelentes e práticas de gestão sanitária, tanto das infraestruturas que albergam como dos animais, a monitorização regular da saúde dos equinos e através da realização de exames clínicos e testes laboratoriais que são vitais para a deteção precoce de infeções e a prevenção de complicações. Embora a vacinação esteja disponível em algumas regiões, a sua eficácia pode variar, sendo recomendada principalmente em áreas endémicas como parte de uma estratégia de controlo.

O dipropionato de imidocarb é o medicamento mais comumente utilizado para o tratamento da piroplasmose equina (Rothschild, 2013). O tratamento veterinário sugerido envolve a administração desta substância, com dosagens e frequência ajustadas ao tipo específico de parasita. Segundo Frerichs e Holbrook (1974), a dosagem recomendada para tratar *B. caballi* é de 2 mg/kg, administrada em duas doses espaçadas 24 horas. Para *T. equi*, a dosagem é de 4 mg/kg, fornecida em quatro doses com intervalos de 72 horas (Knowles, Hourrigan, & Holbrook, 1980; Onyiche et al., 2019)

A *T. equi* é considerado mais resistente ao tratamento em comparação com *B. caballi*, exigindo doses aumentadas e protocolos de tratamento mais longos (Hines et al., 2015). Embora este medicamento seja a terapia preferida, possui limitações, como efeitos secundários como atonia intestinal, cólica e toxicidade, que podem reduzir a sua eficácia

em áreas endêmicas. Além disso, há sinais de desenvolvimento de resistência ao tratamento (Tirosh-Levy et al., 2020).

É crucial reconhecer que a dose máxima segura está próxima da dose letal para 50% dos casos (DL50), o que pode levar a toxicidade grave, incluindo mortalidade, especialmente em burros, que são mais suscetíveis do que os cavalos (Onyiche et al., 2019). Devido ao risco de cólica após a administração de 4 mg/kg de imidocarb dipropionato, é prática comum fornecer tratamento concomitante com flunixin meglumine ou buscopan para mitigar estes efeitos adversos.

Embora seja geralmente viável eliminar completamente o parasita, múltiplos ciclos de tratamento são frequentemente necessários (Schwint et al., 2009). Além disso, foram observados casos de parasitas resistentes ao dipropionato de imidocarb (Hines et al., 2015).

Diversos tratamentos alternativos têm sido investigados, mas os resultados têm sido inconsistentes e variados. Estes incluem amicarbalide (De Waal, 1992), diminazene aceturato (Wise et al., 2013) e oxitetraciclina (Zobba et al., 2008). Embora não estejam atualmente em uso, certos compostos mostraram eficácia em inibir o crescimento dos parasitas da piropilose equina em estudos *in vitro*. Esses compostos incluem clotrimazol, cetoconazol e clodinafop-propargil (Bork et al., 2003); artesunato, pirimetamina e primaquina (Nagai et al., 2003); assim como cloridrato de nitidina e camptotecina (Tayebwa et al., 2018).

2.7. Diagnóstico

São utilizados vários métodos de diagnóstico, abrangendo técnicas serológicas, moleculares assim como as técnicas clássicas, cada uma com vantagens e desvantagens distintas (Büscher & Otim, 2019).

No diagnóstico serológico, a identificação de anticorpos específicos contra *B. caballi* e *T. equi* é realizada utilizando métodos como o *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e o *Indirect Immunofluorescence Assay* (IFA) (Salim et al., 2013). Estes testes são preferidos devido à sua capacidade de detectar infecções crônicas e à sua elevada sensibilidade. No entanto, também enfrentam desafios significativos, como o potencial de reatividade

cruzada com outros agentes patogénicos e a dificuldade em distinguir entre infeções atuais e passadas, complicando o processo de diagnóstico (Wise et al., 2014).

As técnicas moleculares, em particular a reação em o PCR, provaram ser especialmente eficazes no diagnóstico da piroplasmose equina, proporcionando maior sensibilidade e especificidade em comparação com os métodos serológicos (Battsetseg et al., 2002). O PCR permite a deteção direta do ADN do parasita em amostras de sangue, facilitando a identificação precoce de infeções e a diferenciação entre *B. caballi* e *T. equi* (Salim et al., 2013). Além disso, a PCR em tempo real, uma versão avançada da técnica, permite a quantificação da carga parasitária, crucial para monitorizar a progressão da doença e avaliar a eficácia do tratamento (Terkawi et al., 2011)

O método do esfregaço de sangue é uma abordagem de diagnóstico tradicional que envolve o exame microscópico de amostras de sangue para detetar a presença de parasitas (Büscher & Otim, 2019), continua a ser relevante, sobretudo em zonas com recursos limitados. Embora seja uma técnica simples e económica, a sua sensibilidade é frequentemente limitada, especialmente em casos de baixa carga parasitária (Battsetseg et al., 2002).

3. Materiais e Métodos

3.1. Amostras

O procedimento experimental foi realizado com uma amostragem de 28 equinos, constituída por 27 cavalos e 1 asinino, 7 fêmeas (25%), e 21 machos (75%), e 1 asinino macho.

Foram colhidas amostras de equídeos que preenchiam um dos critérios de inclusão previamente estabelecidos antes da condução do estudo, com vista à análise laboratorial subsequente:

- 1) Cavalos que apresentavam sintomatologia associada à Piroplasmose Equina (PE).
- 2) Equinos assintomáticos suspeitos de PE devido à exposição a vetores naturais em regiões de alta endemicidade da doença, cuja infeção foi posteriormente confirmada por meio de análise de Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR).
- 3) Cavalos com temperatura retal superior a 38,5°C nas últimas 72 horas.

A recolha das amostras decorreu desde o dia 06/03/2024 a dia 02/05/2024.

As amostras sanguíneas de todos os cavalos, incluídos neste estudo, foram submetidas a hemograma. O sangue foi colhido das veias jugulares de cavalos que deram entrada na Unidade de Equinos do Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa.

Foram recolhidas apenas amostras de cavalos que satisfaziam um dos critérios de inclusão mencionados anteriormente. Foram retirados 3 ml de sangue, os quais foram imediatamente colocados num tubo contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), devidamente identificado. Adicionalmente, foi conduzido um inquérito ao veterinário responsável pela colheita da amostra ou aos proprietários dos equinos, com o intuito de registar o sexo, idade, estado reprodutivo, condições de alojamento ou manejo, histórico de viagens ou transporte, coloração das mucosas no momento da colheita, outros sinais clínicos presentes, bem como eventuais problemas médicos prévios ou atuais.

Foram realizadas colheitas de sangue para realização de esfregaços sanguíneos, para tanto, foram recolhidos 5 mL de sangue da veia jugular em tubo sem anticoagulante, aguardou-se a formação do coágulo, para a realização do esfregaço pelo método de esfregaço de sangue da veia jugular (Dantas et al. 2011).

Todas as recolhas realizadas foram acompanhadas da realização de um hemograma, e os dados foram colocados numa tabela para facilitar a sua análise e leitura. Para manter a confidencialidade dos dados dos proprietários os nomes dos animais incluídos no estudo foram substituídos por códigos numéricos.

3.2.Extração e quantificação de DNA

O procedimento experimental passou pela realização de extração de DNA a partir de amostras sanguíneas, realização de PCR para verificar a presença de DNA correspondente ao dos parasitas.

Para a realização da extração de DNA foi utilizado o kit *DNA Isolation* kit da NZYtech sendo que todo o procedimento e outras indicações do fabricante foram devidamente seguidas.

Após a realização das extrações foi feita a medição da concentração de ácido nucleico e da pureza das amostras de ácido nucleico com a utilização um espectrofotómetro UVVIS de varrimento spectral, *Nanodrop*.

3.3.PCR e Esfregaços sanguíneos

Para identificação molecular por PCR, utilizou-se o método descrito por Georges, 2001, que amplifica a região hipervariável V4 do gene 18S rRNA. A mistura de reação PCR utilizada continha todos os componentes necessários para a amplificação, incluindo desoxinucleótidos (dNTPs), tampão de reação e Taq DNA Polimerase (NZYTaq MIX, NZYTech, Portugal). Como controlos positivos da reação foram utilizadas amostras positivas a *T. equi* e *B. caballi* e como controlo negativo foi utilizada água ultrapura.

Na etapa de preparação de esfregaços sanguíneos, foram empregues lâminas de vidro para a distribuição uniforme das amostras de sangue. As pipetas de 3 mL foram utilizadas para a aplicação precisa das amostras e reagentes sobre as lâminas. Para a coloração dos esfregaços, foi adotada a técnica de coloração de Giemsa, utilizando azul de metileno e eosina como corantes primários, e etanol como fixador e agente de lavagem.

3.4. Análise estatística.

Na análise estatística foram calculadas as médias de cada parâmetro do hemograma, para os dois grupos, o positivo para *T. equi* e o negativo para PE. De seguida as médias foram comparadas entre si e com os valores de referência, e foram analisados os desvios para perceber se eram desvios significativos Foi efetuada em Excel Microsoft.

4. Resultados e Discussão

Com base nos hemogramas realizados ao longo do estudo, foi possível compilar uma tabela com todos os dados obtidos, conforme apresentado no Anexo I. A pesquisa analisou um total de 27 equinos e 1 asinino. Entre os equinos, 6 testaram positivos para a presença de *T. equi* utilizando a técnica de PCR, o que corresponde a 21,42% do total analisado. Em contraste, durante a realização do estudo nenhum dos animais testados demonstrou, por PCR, infecção por *B. caballi*. O baixo número de casos observados não condiz com a prevalência conhecida da Piroplasmose Equina (PE) em Portugal, que se estima ter permanecido relativamente estável nas últimas décadas, variando entre 45% e 65% da população equina (Sabino Carvalho & Carvalho-Varela, 1993; Vinhas, 2014). No entanto, esta discrepância pode ser atribuída ao tamanho reduzido da amostra e ao facto de serem amostras de animais admitidos no hospital veterinário por diversos motivos, e não a uma amostra aleatória da população equina.

Embora o PCR tenha detetado a presença de parasitas em alguns equinos, a análise de esfregaços sanguíneos não revelou as formas típicas da piroplasmose equina (PE). Esta dificuldade pode ser explicada pela baixa parasitémia nos animais positivos, o que frequentemente impede a deteção microscópica direta do parasita. Este aspeto pode indicar que existe uma estratégia preventiva eficaz, através de investimento dos proprietários na vacinação, desparasitação e resguardo dos animais em alturas de maior número de vetores, embora não deixe de ser essencial continuar a monitorizar a situação para evitar surtos. A técnica de PCR revelou-se fundamental neste contexto, pois permite a identificação de parasitas em animais com baixa parasitémia, onde métodos tradicionais, como a microscopia, falham em fornecer resultados fiáveis. Esta capacidade torna o PCR uma ferramenta indispensável, tanto em termos clínicos como epidemiológicos, auxiliando na deteção precoce e na implementação de medidas de controlo apropriadas.

As causas de ingresso dos equinos incluídos no estudo foram diversas conforme ilustrado na Figura 13, que apresenta os diagnósticos ou motivos para a avaliação dos cavalos. É interessante e relevante para a compreensão da doença notar que apenas um dos equinos, representando 4%, foi alvo de análise por demonstrar sinais clínicos compatíveis com a PE, durante o estudo.

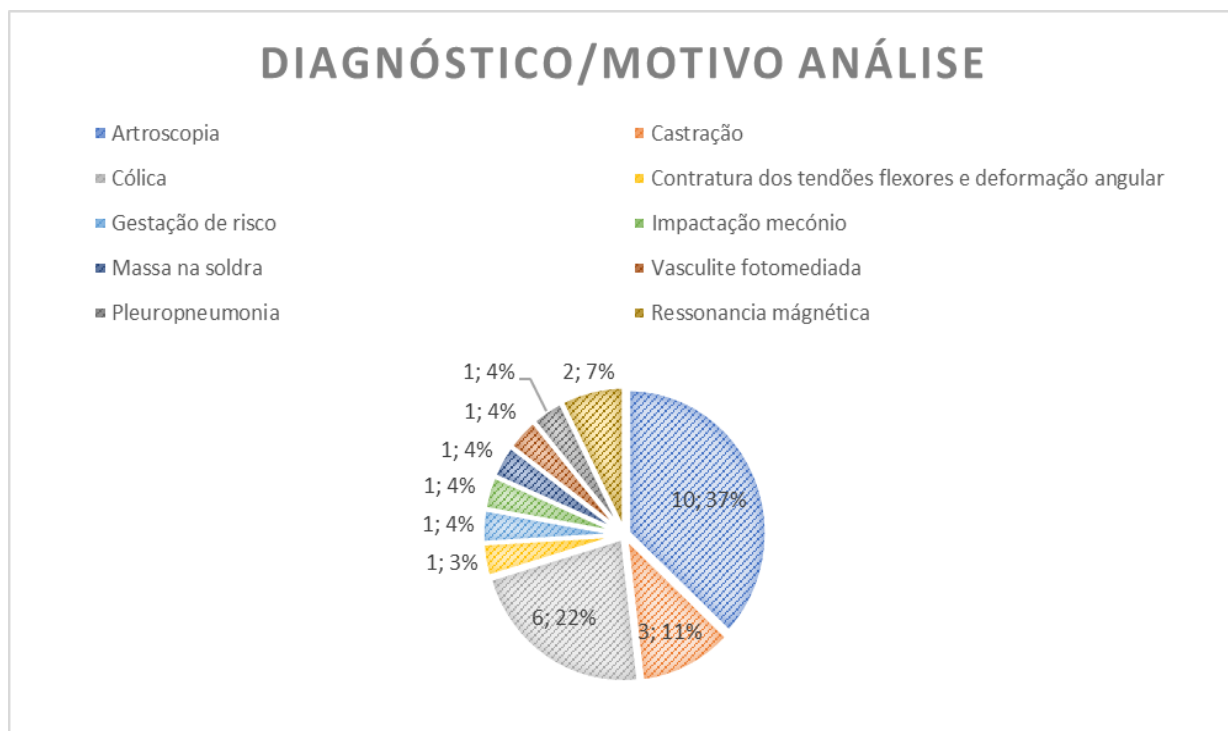


Figura 13 - Diagnóstico/ Motivo para a análise

Para avaliar e comparar os vários parâmetros sanguíneos, procedeu-se à comparação entre cavalos infetados e não infetados.

Na Figura 14, estão ilustrados os valores médios e as variações dos eritrócitos, com valores de referência que variam entre 5,5 e 9,5 M/ μ l. Observa-se que a contagem média de eritrócitos nos equinos diagnosticados com Piroplasmose Equina (PE) é ligeiramente inferior à dos equinos que testaram negativos para PE, apresentando 8,54 M/ μ l comparado a 8,70 M/ μ l, respetivamente. No entanto, estes valores permanecem dentro do intervalo de referência estabelecido. Este resultado é inesperado, uma vez que estes protozoários tipicamente levam à destruição dos eritrócitos, frequentemente resultando em anemia. A ausência de tal alteração neste estudo pode ser atribuída ao fato de que a maioria dos casos positivos de PE identificados são subclínicos, indicando que a doença ainda não progrediu ou que são simplesmente casos assintomáticos.

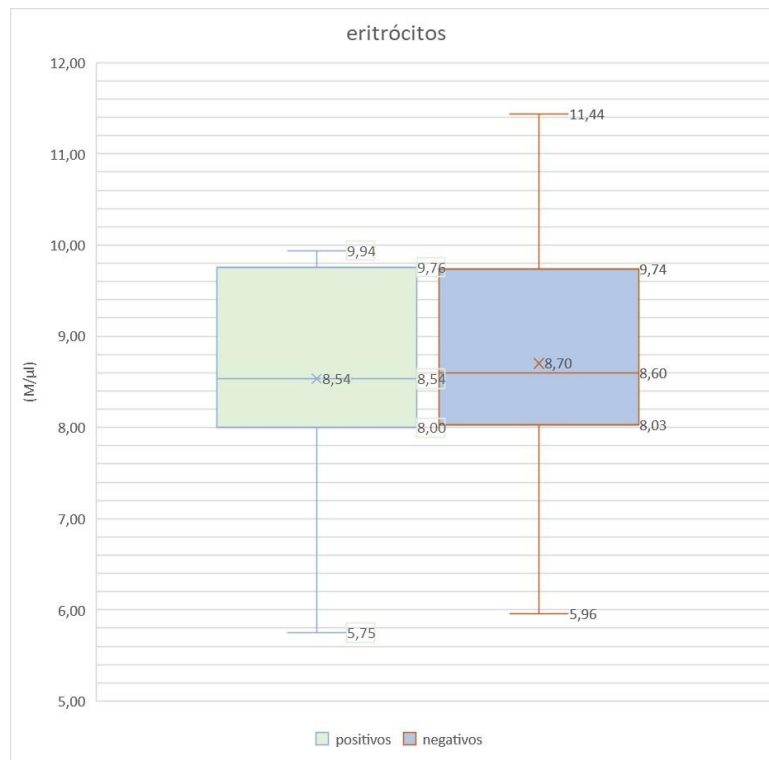


Figura 14 - Comparação das contagens de eritrócitos entre grupos

Na Figura 15, observa-se uma diferença notável na contagem média de leucócitos entre os cavalos infetados com Piroplasmose Equina (PE) e os não infetados. Os cavalos com PE apresentam uma contagem média de leucócitos de 10,93 K/μl, em contraste com a média de 10,07 K/μl encontrada nos cavalos não infetados. Ambos os valores se encontram dentro da faixa normal de referência para cavalos, que é entre 6,0 e 12,0 K/μl.

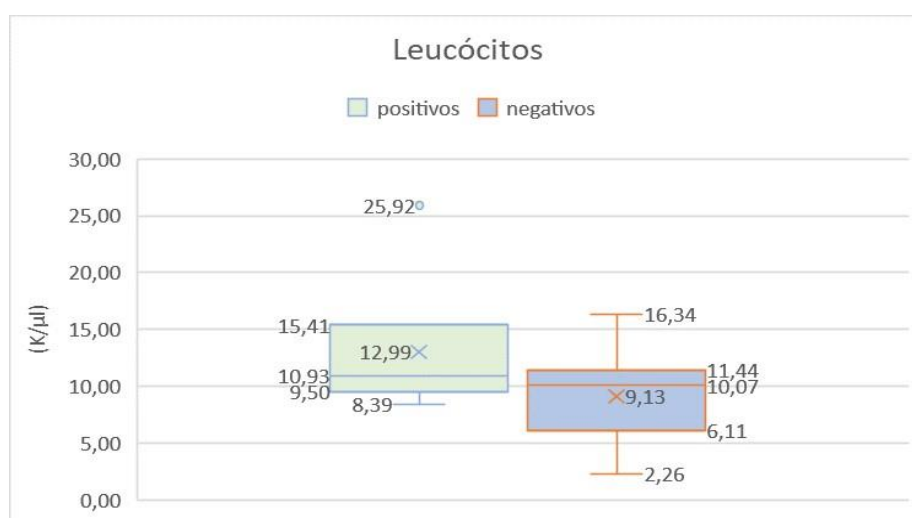


Figura 15 – Comparação das contagens de Leucócitos entre grupos

Um foco particular nos neutrófilos revela um aumento significativo nos afetados por PE, com uma contagem média de 8,75 K/μl. Em comparação, os cavalos não infetados

exibem uma contagem média de neutrófilos de 6,19 K/ μ l. Ambos estes valores excedem o intervalo de referência normal para neutrófilos, que é geralmente entre 0,6 e 4,0 K/ μ l. Esta distinção está ilustrada na Figura 16.

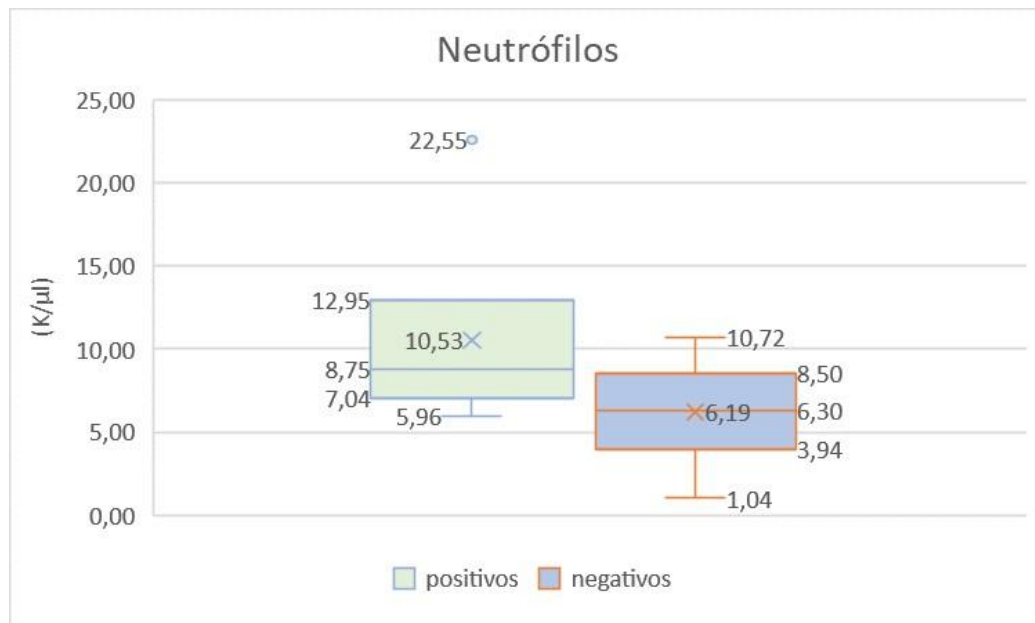


Figura 16 – Comparação das contagens de Neutrófilos entre grupos

A discrepância observada pode ser atribuída à resposta inflamatória aguda desencadeada pela infecção parasitária. Os neutrófilos são leucócitos vitais na resposta imunológica, desempenhando um papel fundamental na defesa inicial contra patógenos. A infecção por *Babesia caballi* e *Theileria equi* leva a uma hemólise significativa e a uma resposta inflamatória sistêmica, o que resulta na liberação de citocinas e outros mediadores inflamatórios. Estas substâncias estimulam a medula óssea a aumentar a produção e a liberação de neutrófilos, indicando uma resposta imunológica adaptativa ao desafio infeccioso.

Embora a contagem total de leucócitos em ambos os grupos de cavalos, infetados e não infetados, permaneça dentro da faixa normal, o aumento da contagem de neutrófilos em cavalos infetados sugere uma resposta inflamatória mais pronunciada. Este aumento está alinhado com a mobilização do sistema imunológico para combater a infecção por piroplasmose e reparar os danos teciduais resultantes.

Como ilustrado na Figura 17, ambos os grupos de Equinos apresentam linfocitopénia, caracterizada por contagens reduzidas de linfócitos. Nas amostras que testaram negativas para a piroplasmose equina, os níveis de linfócitos também estão abaixo dos valores de referência, embora em menor grau do que nos cavalos positivos para a doença. Nesses casos, a linfocitopénia não é atribuída à piroplasmose equina, mas sim a outras condições pré-existentes.

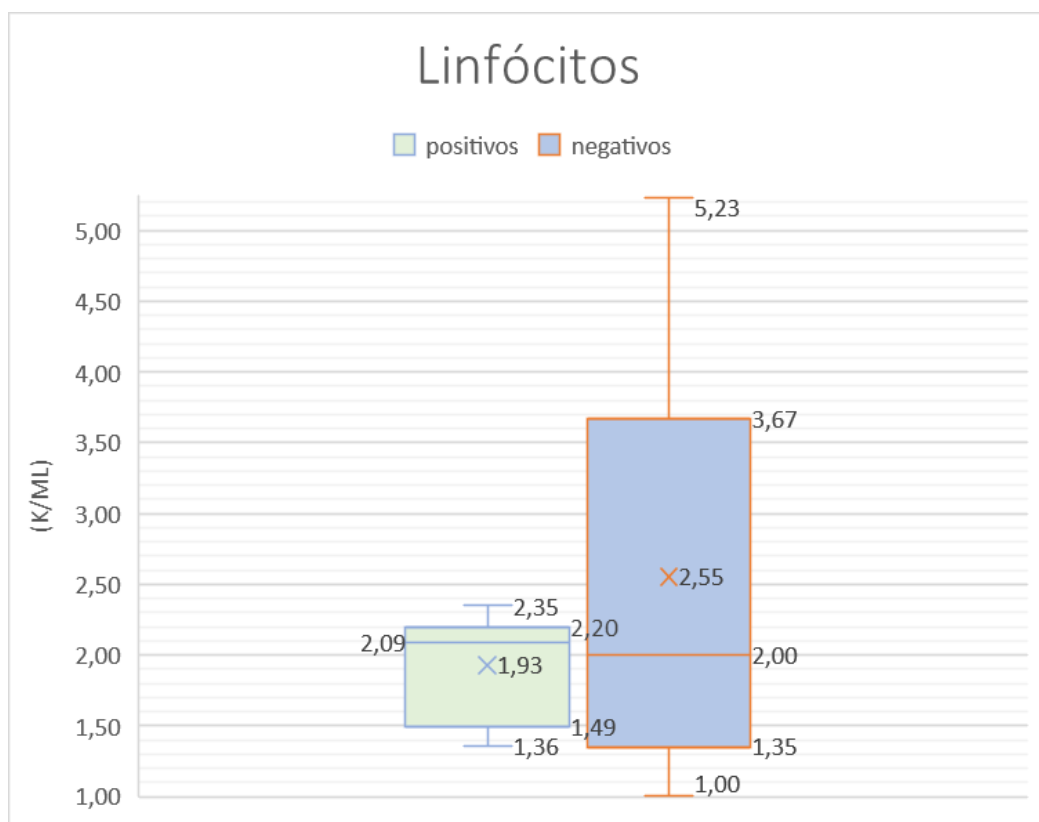


Figura 17 – Comparação das contagens de Linfócitos entre grupos

Espera-se que animais com piroplasmose equina apresentem contagens baixas de linfócitos, o que está diretamente relacionado ao impacto da infeção no sistema imunológico. Os linfócitos desempenham um papel vital na defesa contra infeções e podem ser afetados de várias maneiras pelos protozoários responsáveis pela piroplasmose, como *Babesia caballi* ou *Theileria equi*. A resposta imunológica provocada pela infeção devido presença desses protozoários, provoca inflamação, resultando num aumento do consumo e destruição dos linfócitos, que são mobilizados para combater a

infecção, além disso, *T. equi*, inicialmente, invade essas células, que assim, rapidamente se esgotam e sofrem apoptose (morte celular programada).

Neste estudo as diferenças hematológicas entre os grupos não são muito notórias provavelmente devido a outras causas, nomeadamente às que levaram ao internamento dos cavalos inseridos no estudo.

Neste estudo, os seis equinos infetados com *T. equi* foram admitidos no hospital por motivos distintos, incluindo castração, ressonância magnética, piroplasmose, cólica, artroscopia e pleuropneumonia, na grande maioria das vezes os cavalos são portadores assintomáticos da PE, que, por depressão imunitária, doença ou stress permitiram uma nova invasão massiva e replicação dos protozoários nos seus eritrócitos, tendo isto em conta é importante referir que o próprio internamento e o stress que implica pode levar a uma recidiva da piroplasmose (Rothschild, 2013).

A medula óssea, responsável pela produção de todas as células sanguíneas, incluindo linfócitos, também pode ser comprometida pela infecção, uma vez que a inflamação sistémica e o estresse associados à piroplasmose podem inibir seu funcionamento adequado, contribuindo assim para a linfocitopénia. Durante a infecção, muitos linfócitos são sequestrados nos linfonodos e no baço, onde são ativados para responder ao patógeno, levando a uma diminuição temporária no número de linfócitos circulantes no sangue periférico, resultando na linfocitopénia. Esse sequestro representa a tentativa do corpo de combater a infecção de forma mais eficaz, mas acaba levando a uma redução significativa nos níveis de linfócitos no sangue periférico. Além disso, a piroplasmose, assim como outras infeções parasitárias, pode prejudicar a função geral do sistema imunológico, não apenas através da resposta inflamatória, mas também pela liberação de toxinas e pela indução de respostas imunes ineficazes, exacerbando ainda mais o dano aos linfócitos.

Por outro lado, a infecção por ambos os parasitas está associada à trombocitopenia, caracterizada por níveis reduzidos de plaquetas no sangue e tempos de coagulação prolongados, o que não vai ao encontro dos dados obtidos no trabalho como podemos observar no quadro I, os valores médios para dos cavalo infetados com *Theilheria Equi* foi de 167,17 K/ μ l, e para os cavalos negativos para PE de 173,00 K/ μ l, valores que se encontram dentro dos valores considerados normais, 100-350 (K/ μ l).

QUADRO I - VALORES DAS PLAQUETAS

Valores padrão (K/ μ l)	Valore médio positivos (K/ μ l)	Valore médio negativos (K/ μ l)
100-350	167,17	173,00

5. Conclusões

A análise dos hemogramas de 27 cavalos e 1 asno revelou a presença de parasitas específicos em 21,42% dos cavalos através de técnicas de PCR, enquanto o asno não apresentou resultados positivos. A baixa prevalência observada, contrastando com dados epidemiológicos, pode indicar um tamanho de amostra limitado ou estratégias preventivas potencialmente eficazes.

A técnica de PCR provou ser crucial para a detecção de parasitas em animais com baixa carga parasitária, onde os métodos tradicionais, como a microscopia, falham em identificar sua presença. Isso sublinha a importância do PCR em contextos clínicos e epidemiológicos para a detecção precoce e gestão da piroplasmose equina (PE).

Apenas um cavalo no estudo foi avaliado inicialmente por apresentar sinais clínicos de piroplasmose, destacando a necessidade de testes laboratoriais precisos para o diagnóstico, uma vez que a maioria dos casos identificados eram subclínicos ou assintomáticos.

Os hemogramas revelaram diferenças entre cavalos infetados e não infetados, mostrando variações nos valores médios de eritrócitos, leucócitos e neutrófilos. Apesar dessas diferenças, os valores permaneceram dentro dos intervalos de referência, indicando que os cavalos infetados estavam em estágios subclínicos da doença.

O aumento de neutrófilos entre os cavalos infetados indica uma resposta inflamatória aguda, consistente com a presença de parasitas que desencadeiam uma resposta imune adaptativa significativa. Essa resposta imune é essencial para combater a infecção e reparar danos teciduais.

Foi observada linfocitopenia em ambos os grupos de cavalos, sendo mais pronunciada nos positivos para PE. Essa diminuição dos linfócitos pode ser atribuída à resposta imune à infecção, que leva ao consumo e destruição dessas células, além de processos como apoptose e sequestro em órgãos linfáticos.

As discrepâncias entre os métodos de diagnóstico (PCR vs. microscopia) e as alterações hematológicas observadas destacam a necessidade de abordagens complementares para o diagnóstico preciso da piroplasmose equina, particularmente em casos subclínicos.

A monitorização contínua e a pesquisa sobre a piroplasmose equina são essenciais, considerando que, apesar da baixa prevalência identificada, o potencial para futuros surtos não pode ser descartado sem uma vigilância adequada e contínua.

Este estudo destaca a importância de empregar técnicas laboratoriais avançadas, como o PCR, para a deteção precoce de parasitas e para a avaliação do impacto da piroplasmose nos cavalos, fornecendo informações valiosas para estratégias de controle e prevenção mais eficazes.

6. Bibliografia

Ahmed, J. (2002). The role of cytokines in immunity and immunopathogenesis of piroplasmoses. *Parasitology Research*, 88(Suppl), S48-S50. <https://doi.org/10.1007/s00436-001-0573-4>

Allen, P. C., Frerichs, W. M., & Holbrook, A. A. (1975). Experimental acute *Babesia caballi* infections: II. Response of platelets and fibrinogen. *Experimental Parasitology*, 37(3), 373-379. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(75\)90006-5](https://doi.org/10.1016/0014-4894(75)90006-5)

Allsopp, M., Cavalier-Smith, T., de Waal, D., & Allsopp, B. (1994). Phylogeny and evolution of the piroplasms. *Parasitology*, 108, 147-152. <https://doi.org/10.1017/S0031182000068232>

Ambawat, H. K., Malhotra, D. V., Kumar, S., & Dhar, S. (1999). Erythrocyte associated haemato-biochemical changes in *Babesia equi* infection experimentally produced in donkeys. *Veterinary Parasitology*, 85(4), 319-324. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(99\)00110-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00110-7)

Apanaskevich, D. A., & Horak, I. G. (2008). The genus *Hyalomma* Koch, 1844: V. Re-evaluation of the taxonomic rank of taxa comprising the *H. (Euhyalomma) marginatum* Koch complex of species (Acari: Ixodidae) with redescription of all parasitic stages and notes on biology. *International Journal of Acarology*, 34, 13-42. <https://doi.org/10.1080/01647950808683704>

Barros, C. J. G. (2018). Piroplasmose equina: Diagnóstico molecular e avaliação de alterações hematológicas e de biomarcadores inflamatórios em cavalos com doença clínica e subclínica [Dissertação de mestrado, Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária].

Battsetseg, B., Lucero, S., Xuan, X., Claveria, F., Byambaa, B., & et al. (2002). Detection of equine *Babesia* spp. gene fragments in *Dermacentor nuttalli* Olenev 1929 infesting Mongolian horses, and their amplification in egg and larval progenies. *Journal of Veterinary Medical Science*, 64, 727-730. <https://doi.org/10.1292/jvms.64.727>

Bhoora, R., Buss, P., Guthrie, A. J., Penzhorn, B. L., & Collins, N. E. (2010). Genetic diversity of piroplasms in Plains zebra (*Equus quagga burchellii*) and

Cape mountain zebra (*Equus zebra zebra*) in South Africa. *Veterinary Parasitology*, 174, 145-149. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.08.014>

Bork, S., Yokoyama, N., Matsuo, T., Claveria, F. G., Fujisaki, K., & Igarashi, I. (2003). Clotrimazole, ketoconazole, and clodinafop-propargyl as potent growth inhibitors of equine *Babesia* parasites during in vitro culture. *Journal of Parasitology*, 89(3), 604-606. [https://doi.org/10.1645/00223395\(2003\)089\[0604:CKACAP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/00223395(2003)089[0604:CKACAP]2.0.CO;2)

Büscher, P., & Otim, T. (2019). Point-of-care diagnostic tools for animal trypanosomiasis. *Trends in Parasitology*, 35(5), 411-422. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.02.001>

Cunha, C. W., McGuire, T. C., Kappmeyer, L. S., Hines, S. A., Lopez, A. M., Dellagostin, O. A., & Knowles, D. P. (2006). Development of specific immunoglobulin G_a (IgG_a) and IgG_b antibodies correlates with control of parasitemia in *Babesia equi* infection. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(3), 297-300. <https://doi.org/10.1128/CVI.13.2.297-300.2006>

Dantas, M. O., Dias, L. M. M. S., Moura, A. C. F., Seidel, S. R. T., Vargas, C. R., & Silva Neto, J. J. (2011). Pesquisa de hematozoários mediante avaliação do esfregaço da gota do coágulo e sangue periférico em equinos de equitação. *Anais do 38º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (Conbravet)*, Florianópolis, SC, 1–3. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000800008>

De Waal, D. T. (1992). Equine piroplasmiasis: A review. *British Veterinary Journal*, 148(1), 6-14. [https://doi.org/10.1016/0007-1935\(92\)90061-5](https://doi.org/10.1016/0007-1935(92)90061-5)

De Waal, D. T., & Potgieter, F. T. (1987). The transstadial transmission of *Babesia caballi* by *Rhipicephalus evertsi evertsi*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 54(4), 655-666.

De Waal, D. T., & van Heerden, J. (2004). Equine piroplasmiasis. In J. A. W.

Coetzer & R. C. Tustin (Eds.), *Infectious diseases of livestock* (pp. 425-433). Oxford

University Press.

Díaz-Sánchez, A., Roblejo-Arias, L., Marrero-Perera, R., & Corona-González, B. (2020). *Piroplasmosis equina*. Pg.42, Volume 03.

ESCCAP *European Scientific Counsel Companion Animal Parasites* UK & Ireland. (2011). *Deermacentor, Ripicephalus, Hyalomma*. Manor House Offices.

Frerichs, W. M., & Holbrook, A. A. (1974). Treatment of equine piroplasmosis (*B. caballi*) with imidocarb dipropionate. *The Veterinary Record*, 95(8), 188-189. <https://doi/full/10.5555/19742225948>

Hines, S. A., Ramsay, J. D., Kappmeyer, L. S., Lau, A. O., Ojo, K. K., van Voorhis, W. C., Knowles, D. P., & Mealey, R. H. (2015). *Theileria equi* isolates vary in susceptibility to imidocarb dipropionate but demonstrate uniform in vitro susceptibility to a bumped kinase inhibitor. *Parasites & Vectors*, 8, Article 33. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0611-6>

Jardim, Luís. S. (2014). *Babesiose em equinos*. *Patologia Veterinária*. Rio Grande do Sul. Patologia Veterinária: Babesiose em Equinos.

Juan María. (2014). *Controle de Pragas em Saúde Ambiental, Mapas vetoriais mais recentes com novos dados sobre áreas com mosquitos, flebotomíneos e carrças na Europa. 3 - Carrças, 2015*. ECDC - Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças.

Knowles, D. P., Kappmeyer, L. S., & Perryman, L. E. (1994). Specific immune responses are required to control parasitemia in *Babesia equi* infection. *Infection and Immunity*, 62(5), 1909-1913. <https://doi.org/10.1128/iai.62.5.1909-1913.1994>

Knowles, R. C., Hourrigan, J. L., & Holbrook, A. A. (1980). Equine piroplasmosis [in relation to a horse's geographic history as well as medical history, *Babesia caballi*, *Babesia equi*, protozoan diseases]. *Equine Practice*

Labruna, M. B., Kasai, N., Ferreira, F., Faccini, J. L. H., & Gennari, S. M. (2002). Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 105(1), 65–77. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00649-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00649-5)

Laus, F., Veronesi, F., Passamonti, F., Paggi, E., Cerquetella, M., Hyatt, D., Tesei, B., & Fioretti, D. P. (2013). Prevalence of tick borne pathogens in horses

from Italy. Journal of Veterinary Medical Science, 75(6), 715-720.
<https://doi.org/10.1292/jvms.12-0449>

Laveran, A. (1901). Contribution à l'étude de *Piroplasma equi*. Comptes Rendus de la Société de Biologie, 12, 53, 385-388.

Maurer, F. D. (1962). Equine piroplasmosis—another emerging disease. Journal of the American Veterinary Medical Association, 141(6), 699.
<https://doi/full/10.5555/19632200805>

Mehlhorn, H., & Schein, E. (1998). Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein 1998. Parasitology Research, 84, 467-475. <https://doi.org/10.1007/s004360050431>

Nadal, C., Bonnet, S. I., & Marsot, M. (2021). Eco-epidemiology of equine piroplasmosis and its associated tick vectors in Europe: A systematic literature review and a meta-analysis of prevalence. Transboundary and Emerging Diseases. <https://doi.org/10.1111/tbed.14261>

Nagai, A., Yokoyama, N., Matsuo, T., Bork, S., Hirata, H., Xuan, X., & Igarashi, I. (2003). Growth-inhibitory effects of artesunate, pyrimethamine, and pamaquine against *Babesia equi* and *Babesia caballi* in in vitro cultures. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 47(2), 800-803.
<https://doi.org/10.1128/aac.47.2.800-803.2003>

Nizoli, L. Q. (2016). *Babesiose equina*. Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Departamento de Veterinária Preventiva, Laboratório de Doenças Parasitárias

Onyiche, T. E., Sukanuma, K., Igarashi, I., Yokoyama, N., Xuan, X., & Thekisoe, O. (2019). A review on equine piroplasmosis: Epidemiology, vector ecology, risk factors, host immunity, diagnosis and control. Parasites & Vectors, 12, Article 123. <https://doi.org/10.3390/ijerph16101736>

Rothschild, C. M. (2013). Equine piroplasmosis. Journal of Equine Veterinary Science, 33(7), 497-508. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.03.189>

Salim, B., Bakheit, M. A., Kamau, J., Nakamura, I., & Sugimoto, C. (2010). Nucleotide sequence heterogeneity in the small subunit ribosomal RNA gene within *Theileria equi* from horses in Sudan. Parasitology Research, 106(2), 493. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1691-7>

Salim, B., Bakheit, M. A., & Sugimoto, C. (2013). Current status of equine piroplasmosis in the Sudan. *Parasitology Research*, 112(3), 1151-1161. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3276-0>

Schein, H. (1917). Equine piroplasmosis in South Annam, French Indo-China. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 10871 873. <http://doi.org/10.5555/19186300003>

Schwint, O. N., Ueti, M. W., Palmer, G. H., Kappmeyer, L. S., Hines, M. T., Cordes, R. T., Knowles, D. P., & Scoles, G. A. (2009). Imidocarb dipropionate clears persistent *Babesia caballi* infection with elimination of transmission potential. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(10), 4327-4332. <https://doi.org/10.1128/aac.00404-09>

Scoles, G. A., & Ueti, M. W. (2015). Vector ecology of equine piroplasmosis.

Annual Review of Entomology, 60, 561-580. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-021110>

Sumbria, D., Moudgil, A. D., & Singla, L. D. (2014). Equine piroplasmosis: Current status. *Veterinaria*, 1(1), 9-14.

Tamzali, Y. (2013). Equine piroplasmosis: An updated review. *Equine Veterinary Education*, 25(11), 590-598. <https://doi.org/10.1111/eve.12070>

Tayebwa, D. S., Tuvshintulga, B., Guswanto, A., Nugraha, A. B., Batiha, G. E. S., Gantuya, S., & Igarashi, I. (2018). The effects of nitidine chloride and camptothecin on the growth of *Babesia* and *Theileria* parasites. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 9(5), 1192-1201. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.04.019>

Terkawi, M. A., Huyen, N. X., Shinuo, C., Inpankaew, T., Maklon, K., Aboulaila, M., & Igarashi, I. (2011). Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle from Northern Thailand. *Veterinary Parasitology*, 193(3-4), 202-208. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.001>

Theiler, A. (1903). Equine malaria and its sequelae. *Journal of Comparative*

Pathology and Therapeutics, 16, 97-127. [https://doi.org/10.1016/S0368-1742\(03\)800383](https://doi.org/10.1016/S0368-1742(03)800383)

Tirosh-Levy, S., Gottlieb, Y., Fry, L. M., Knowles, D. P., & Steinman, A. (2020). Twenty years of equine piroplasmosis research: Global distribution, molecular diagnosis, and phylogeny. *Parasites & Vectors*, 13, Article 123. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110926>

Wiltshire, W. (1883). *On the etiology of horse piroplasmosis*. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*.

Wise, L. N., Kappmeyer, L. S., Mealey, R. H., & Knowles, D. P. (2013). Review of equine piroplasmosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(6), 1334-1346. <https://doi.org/10.1111/jvim.12168>

Zasukhin, D. N. (1935). Klesci i problema borbi s piroplazmzom losadej [Ticks and the Problem of Equine Piroplasmosis in South-East Russia]. Saratov: Sarat. Gos. Izd. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-021110>

Zobba, R., Ardu, M., Niccolin, S., Chessa, B., Manna, L., Cocco, R., & Parpaglia, M. L. P. (2008). Clinical and laboratory findings in equine piroplasmosis. *Journal of Equine Veterinary Science*, 28(5), 301-308. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2008.03.005>

7. Anexos

Anexo I:	24
----------------	----

Anexo 1 - Tabela de Hemogramas

código	espécie	Sexo	Eritrócitos 5,5-9,5 (M/ μ l)	Hematócrito 24 - 44 (%)	Hemoglobina 8 - 14 (g/dl)	MCV 37 - 58,5 (fL)	MCH 12,3 - 19,9 (pg)	MCHC 31,0-38,6 (g/dl)	RDW 24,6 - 33,3 (%)	Leucócitos 6,0 - 12,0 (K/ μ l)	Neutrófilos 0,6 - 4,0 (K/ μ l)	Linfócitos 2,5 - 7,5 (K/ μ l)	Monócitos 0,0-0,8 (K/ μ l)	Eosinófilos 0,0-0,925 (K/ μ l)	Basófilos 0,00-0,17 (K/ μ l)	Plaquetas 100-350 (K/ μ l)	MPV 5 - 20 (fL)	PDW 40,6 - 65,2 (fL)	PCT 0,2 - 0,5 (%)	PCR (Piropl.)
1	cavalo	Macho	8,47	36,30	13,30	42,90	15,70	36,60	31,2	5,74	3,44	1,95	0,23	0,11	0,00	160	--	--	--	negativo
2	cavalo	Macho	9,94	43,40	14,90	43,70	15,00	34,30	31,4	10,53	8,21	2,11	0,11	0,11	0,00	188	6,60	7,40	0,09	positivo
3	cavalo	Macho	8,09	37,40	13,60	46,50	16,80	36,40	26,7	7,72	6,25	1,00	0,23	0,00	0,00	125	--	--	--	negativo
4	cavalo	Macho	5,96	27,50	10,40	46,10	17,40	37,80	26,9	3,15	1,20	1,58	0,16	0,00	0,00	74	--	--	--	negativo
5	cavalo	Macho	8,06	33,50	12,30	41,60	15,30	36,70	29,2	11,33	9,74	1,36	0,11	0,11	0,00	103	--	--	--	positivo
6	cavalo	Macho	9,76	32,00	11,00	37,00	12,30	31,00	28,3	9,87	7,40	1,54	0,82	0,07	0,01	111	8,30	14,20	0,09	positivo
7	cavalo	Macho	6,56	31,40	11,60	47,90	17,70	36,90	28,1	4,25	2,55	1,36	0,17	0,00	0,00	168	6,60	8,30	0,08	negativo
8	cavalo	Macho	8,47	38,32	14,00	45,00	16,60	36,60		2,26	1,04	1,19	0,01	0,01	0,00	123	6,70	10,30	0,08	negativo
9	cavalo	Macho	5,75	25,90	9,80	45,00	17,00	37,80	25,1	11,91	9,29	2,14	0,36	0,00	0,12	222	7,70	9,60	0,11	positivo
10	cavalo	Macho	6,76	33,70	12,60	49,90	18,60	37,40	24,8	9,43	7,17	1,32	0,57	0,38	0,00	126	8,90	12,00	0,11	negativo
11	cavalo	Fêmea	9,53	40,93	13,90	43,00	14,60	27,50	38,3	11,30	8,97	1,81	0,50	0,00	0,00	156	7,50	10,60	0,12	negativo
12	cavalo	Macho	9,70	41,70	14,60	43,00	15,10	35,00	29,6	8,39	5,96	2,35	0,08	0,00	0,00	138	--	--	--	positivo
13	cavalo	Fêmea	10,55	45,68	15,80	43,00	14,90	34,50	43,0	10,28	7,50	2,31	0,50	0,01	0,00	151	7,00	10,30	0,11	negativo
14	cavalo	Fêmea	11,03	45,75	15,40	41,00	13,90	33,60	30,5	6,82	5,32	1,08	0,41	0,01	0,00	102	6,40	7,90	0,07	negativo
15	cavalo	Macho	10,54	40,00	14,80	38,00	14,00	37,00	35,4	6,55	5,37	1,05	0,13	0,00	0,00	220	5,90	7,10	0,13	negativo
16	cavalo	Macho	10,08	42,20	14,80	41,90	14,70	35,10	34,1	11,84	8,05	3,43	0,12	0,24	0,00	125	--	--	--	negativo
17	cavalo	Macho	9,74	37,00	13,70	38,00	14,10	37,00	34,5	11,25	8,44	2,36	0,45	0,00	0,00	116	--	--	--	negativo
18	cavalo	Fêmea	8,03	35,30	13,00	44,00	16,20	36,80	28,6	10,59	6,35	3,81	0,42	0,00	0,00	126	--	--	--	negativo
19	cavalo	Macho	9,01	37,90	13,50	42,10	15,00	35,60	30,5	10,91	5,78	4,69	0,11	0,33	0,00	197	--	--	--	negativo
20	cavalo	Macho	8,60	36,30	13,20	42,20	15,30	36,40	29,8	12,77	8,68	3,58	0,51	0,00	0,00	191	7,10	8,70	0,11	negativo
21	cavalo	Macho	8,04	35,70	12,60	44,40	15,70	35,30	28,5	3,95	1,74	2,05	0,00	0,16	0,00	151	--	--	--	negativo
22	cavalo	Macho	11,44	50,00	17,50	43,70	15,30	35,00	32,2	9,85	7,98	1,48	0,39	0,00	0,00	164	6,70	8,30	0,07	negativo
23	cavalo	Fêmea	9,06	36,90	12,90	40,70	14,20	35,00	32,5	13,93	8,78	4,74	0,14	0,14	0,14	275	--	--	--	negativo
24	cavalo	Macho	8,23	31,70	11,80	38,50	14,30	37,20	32,1	16,34	10,62	5,23	0,49	0,00	0,00	335	6,70	9,20	0,21	negativo
25	cavalo	Fêmea	7,09	32,00	12,20	45,10	17,20	38,10	28,3	6,23	4,11	1,74	0,37	0,00	0,00	130	--	--	--	negativo
26	cavalo	Fêmea	8,87	33,10	12,40	37,30	14,00	37,50	32,0	11,15	6,13	4,79	0,11	0,11	0,00	183	--	--	--	negativo
27	Asinino	Macho	7,34	36,40	12,30	49,60	16,80	33,80	25,8	14,48	10,72	3,62	0,14	0,00	0,00	408	7,20	8,20	0,22	negativo
28	cavalo	Macho	8,00	36,30	13,30	45,40	16,60	36,60	26,8	25,92	22,55	2,07	1,30	0,00	0,00	241	8,2	11,9	0,19	positivo