

UFRRJ
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS**

TESE

**DIVERSIDADE GENÉTICA E EPIDEMIOLOGIA DE *Theileria equi* E
Babesia caballi EM CAVALOS CARROCEIROS NO DISTRITO
FEDERAL, BRASIL**

THAIS ALVES FERNANDES

2024



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIAS

**DIVERSIDADE GENÉTICA E EPIDEMIOLOGIA DE *Theileria equi* E
Babesia caballi EM CAVALOS CARROCEIROS NO DISTRITO
FEDERAL, BRASIL**

Thaís Alves Fernandes

Sob a orientação do professor

Huarrisson Azevedo Santos

e Co-orientação dos Doutores (as)

Patrícia Gonzaga Paulino

Maristela Peckle Peixoto

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

Seropédica, RJ

Março de 2024

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F363d Fernandes, Thais Alves, 1985-
Diversidade genética e epidemiologia de Theileria
equi e Babesia caballi em cavalos carroceiros no
Distrito Federal, Brasil / Thais Alves Fernandes. -
Rio de Janeiro, 2024.
80 f.: il.

Orientador: Huarrisson Azevedo Santos.
Coorientadora: Patrícia Gonzaga Paulino.
Coorientadora: Maristela Peckle Peixoto.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, PPGCV, 2024.

1. PCR em tempo real. 2. Análise filogenética. 3.
Parasitologia veterinária. 4. Análise espacial. I.
Santos, Huarrisson Azevedo, 1980-, orient. II.
Paulino, Patrícia Gonzaga, 1990-, coorient. III.
Peixoto, Maristela Peckle, 1986-, coorient. IV.
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. PPGCV.
V. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA Nº 1313/2024 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.019742/2024-17

Seropédica-RJ, 17 de abril de 2024.

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

THAIS ALVES FERNANDES

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutora** em Ciências, no
Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias.

TESE APROVADA EM 19/04/2024

(Assinado digitalmente em 19/04/2024 11:25)

CRISTIANE DIVAN BALDANI
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptMCV (12.28.01.00.00.00.53)
Matricula: ###72440

(Assinado digitalmente em 19/04/2024 11:31)

HUARRISSON AZEVEDO SANTOS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DESP (12.28.01.00.00.00.52)
Matricula: ###01442

(Assinado digitalmente em 24/04/2024 14:37)

JULIANA MACEDO RAIMUNDO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DMV (12.28.01.00.00.00.54)
Matricula: ###59140

(Assinado digitalmente em 19/04/2024 11:29)

NATHALIE COSTA DA CUNHA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.207-44

(Assinado digitalmente em 19/04/2024 11:23)
WENDELL MARCELO DE SOUZA PERINOTTO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.188-44

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: 1313, ano: 2024,
tipo: ATA, data de emissão: 17/04/2024 e o código de verificação: 682ac10faf

dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por me cercar de pessoas amorosas e dedicadas que são a minha base. Aos meus pais Márcia Maria Alves Fernandes e Alexandre José Sá Fernandes, por toda dedicação, orientação e apoio. À minha esposa Tatiane Cristina da Silva Cunha, por sua infinita paciência e força cedida por seu espírito de luta. Ao meu irmão Thiago Alves Fernandes e cunhada Camilla Fernandes pelo apoio e disponibilidade em sempre ajudar. E, por fim, à minha especial vovó Nadir Alves, meu espelho, amor, apoio, força, minha segunda mãe.

“Importante não é ver o que ninguém nunca viu, mas
sim pensar o que ninguém nunca pensou sobre algo
que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

AGRADECIMENTOS

Sou tão grata à tantas coisas e tantas pessoas que nem sei por onde começar. À minha família, sempre presente e incentivadora, meus pais Alexandre José e Márcia Maria, por todo sacrifício, apoio, orientação, amor, dedicação e tudo mais que me permitiram hoje estar conquistando mais essa etapa da minha vida. Ao meu irmão Thiago Fernandes e minha cunhada Camilla Fernandes, sempre presentes em todos os momentos. Aos meus familiares, sempre torcendo, apoiando, conversando, e com essa boa energia e carinho dispendidos à mim. Aos grandes amigos de toda uma vida que sempre acompanharam e apoiaram em torcida por toda essa jornada: Hygor Martinez, Ramoon Martinez, Kátia Mah Lee, Maria Conceição Gomes, Fabíola Cardoso e Anderson Saraiva. Aos novos amigos Rodrigo Carvalho da Silva e Ellis Marie que se juntaram nessa torcida no decorrer desta jornada. À minha segunda irmã Fabiana Fróes, por todas as conversas, incentivos, apoio, torcida, força, diálogo e pela alegria que é a sua presença na minha vida. À minha amada esposa Tatiane Cristina, minha melhor amiga e companheira, pelo apoio, por compreender minha ausência, pela força, pelo cuidado nessa difícil trajetória. Aos meus sogros, Álvaro Cunha e Leila Cristina, por todo suporte durante esta jornada. Aos meus companheiros de 4 patas (Brutus, Zezinho e Romeu) fiéis escudeiros, sempre aptos a dar carinho, atenção e cuidado. À Viviane Tavares Crelier, algumas pessoas por vezes podem não compreender o impacto que podem causar na vida das outras, essa talvez possa ser uma grande demonstração de humildade, mas minha querida neurologista, que com dedicação e carinho permitiu que essa trajetória fosse possível. Agradeço ao meu “eterno orientador” Márcio Reis Pereira de Sousa, que foi uma das primeiras pessoas a me fazer acreditar no meu potencial. Ao meu querido orientador Huarisson Azevedo Santos, por toda credibilidade, empatia, apoio, suporte, estímulo e possibilidade de aprendizagem que somente um verdadeiro mestre poderia fornecer. À Patrícia Gonzaga Paulino, pessoa na qual além de uma orientadora encontrei uma amiga, obrigada por mais uma etapa compartilhando seus conhecimentos, por se apresentar como um exemplo, alguém que se admira e que por isso inspira seus orientados. À UFRRJ, praticamente minha segunda casa em quase 20 anos de minha história. Aos meus colegas de trabalho por todo aporte, em especial Erick Mesquita, sem pessoas como vocês este caminho poderia ser bem mais difícil. E professor Paulo Roberto, obrigada pelos conselhos paternais. Encerro agradecendo a Deus, não só por permitir a conclusão desta etapa, mas, principalmente, pela benção de ter todas essas pessoas em minha vida me auxiliando a trilhar essa jornada.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

FERNANDES, Thaís Alves. Diversidade genética e epidemiologia de *Theileria equi* e *Babesia caballi* em cavalos carroceiros no Distrito Federal, Brasil. 2023. 80p. **Tese** (Doutor em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

A Piroplasmose Equina (PE) é uma doença de notificação obrigatória de acordo com a Organização Mundial de Saúde Animal (WHO/OIE). Causada por três espécies de protozoários: *Babesia caballi*, *Theileria equi* e *Theileria haneyi*, a EP é altamente endêmica em regiões tropicais e subtropicais, com prevalências variadas relatadas em todas as regiões do Brasil. Para tanto, o objetivo do presente trabalho foi identificar a prevalência e a distribuição espacial, as características epidemiológicas e genótipos circulantes de PE no Distrito Federal, Brasil. Um estudo epidemiológico transversal, foi realizado para avaliar as possíveis características ambientais e do hospedeiro associadas a presença do DNA dos parasitos. Dados epidemiológicos e amostras de sangue total foram coletadas de 409 cavalos carroceiros no Distrito Federal. O DNA extraído dessas amostras de sangue foi submetido à análise de qPCR de 18S rDNA para detecção de *T. equi* e *B. caballi*, seguida de tabulação e análise estatística empregando os testes do Qui-quadrado e regressão logística. A análise espacial foi realizada utilizando o software GIS (QGIS v2.5.17 - Las Palmas) e a base cartográfica da área em estudo foi obtida em formato shapefile do banco de dados eletrônico do Sistema Distrital de Informações Ambientais (SISDIA, 2022), mantendo suas coordenadas em graus no Sistema Geocêntrico de Referência para as Américas (SIRGAS 2000). Para realização da caracterização molecular, amostras positivas para *T. equi* foram submetidas a PCR convencional para a amplificação do gene 18S rRNA (~1600 pb), sequenciadas pelo método de Sanger e submetidas a análise filogenética bayesiana. Os resultados revelaram uma alta prevalência de *T. equi* e/ou *B. caballi* (56,23%) entre os cavalos amostrados, bem como a ampla distribuição em todo território avaliado, com os genótipos A e C de *T. equi* identificados. O mapa de Kernel indicou áreas de calor com elevada concentração de 9 ou mais animais positivos por área para *T. equi*, com regiões mais frias variando de 4 a 7 animais positivos. Enquanto para *B. caballi*, o mapa de Kernel indicou áreas de calor com concentração de 2 ou mais animais positivos por área. O estudo examinou fatores associados à infecção, identificando animais com mais de cinco anos (p -valor = 0,004; RC = 1,71, IC = 1,01 - 2,87) e status sanitário (p -valor = 0,049; RC = 1,91, IC = 1,003 - 3,64) como significativamente associados à positividade para *T. equi* e/ou *B. caballi*. Este estudo revela uma alta prevalência de *T. equi* e/ou *B. caballi* em cavalos de tração no Distrito Federal, centro-oeste do Brasil, destacando a importância da condição de saúde e idade como fatores associados à infecção. A análise filogenética demonstrou ainda a presença dos genótipos A e C de *T. equi* na região, contribuindo para nossa compreensão da epidemiologia da EP. Esses achados aprofundam nossa compreensão da necessidade de medidas contínuas de vigilância e controle para gerenciar efetivamente a EP.

Palavras-chave: PCR em tempo real, análise filogenética, análise espacial

ABSTRACT

FERNANDES, Thaís Alves. Genetic Diversity and Epidemiology of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in draft horses in the Distrito Federal, Brazil. 2023. 80p. Tese (Doutor em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

Equine Piroplasmosis (EP) is a mandatory notifiable disease according to the World Organization for Animal Health (OIE). Caused by three species of protozoa: *Babesia caballi*, *Theileria equi*, and *Theileria haneyi*, EP is highly endemic in tropical and subtropical regions, with varying prevalences reported across all regions of Brazil. Therefore, the aim of this study was to identify the prevalence and spatial distribution, epidemiological characteristics, and circulating genotypes of EP in the Federal District, Brazil. A cross-sectional epidemiological study was conducted to assess possible environmental and host characteristics associated with the presence of parasite DNA. Epidemiological data and whole blood samples were collected from 409 draft horses in the Federal District. The DNA extracted from these blood samples underwent qPCR analysis of 18S rDNA for the detection of *T. equi* and *B. caballi*, followed by tabulation and statistical analysis employing Chi-square tests and logistic regression. Spatial analysis was performed using GIS software (QGIS v2.5.17 - Las Palmas), and the cartographic base of the study area was obtained in shapefile format from the electronic database of the District Environmental Information System (SISDIA, 2022), maintaining its coordinates in degrees in the Geocentric Reference System for the Americas (SIRGAS 2000). For molecular characterization, *T. equi* positive samples were subjected to conventional PCR for amplification of the 18S rRNA gene (~1600 bp), sequenced by the Sanger method, and subjected to Bayesian phylogenetic analysis. The results revealed a high prevalence of *T. equi* and/or *B. caballi* (56.23%) among the sampled horses, as well as widespread distribution throughout the evaluated territory, with genotypes A and C of *T. equi* identified. The Kernel map indicated heat areas with a high concentration of 9 or more positive animals per area for *T. equi*, with cooler regions ranging from 4 to 7 positive animals. For *B. caballi*, the Kernel map indicated heat areas with a concentration of 2 or more positive animals per area. The study examined factors associated with infection, identifying animals over five years of age (p-value = 0.004; OR = 1.71, CI = 1.01 - 2.87) and health status (p-value = 0.049; OR = 1.91, CI = 1.003 - 3.64) as significantly associated with positivity for *T. equi* and/or *B. caballi*. This study reveals a high prevalence of *T. equi* and/or *B. caballi* in draft horses in the Federal District, central-west Brazil, highlighting the importance of health condition and age as factors associated with infection. Phylogenetic analysis also demonstrated the presence of genotypes A and C of *T. equi* in the region, contributing to our understanding of EP epidemiology. These findings deepen our understanding of the need for continuous surveillance and control measures to effectively management of EP.

Keywords: qPCR analysis, phylogenetic analysis, spatial analysis

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Descrição de primers nested PCR. -----	28
TABELA 2 - Distribuição e frequência dos agentes da Piroplasmose equina nas vinte diferentes regiões administrativas do Distrito Federal, Brasil. -----	32
TABELA 3 - Análise descritiva e bivariada de fatores intrínsecos e extrínsecos em cavalos que apresentam amplificação do DNA de agentes de Piroplasmose equina em vinte diferentes regiões administrativas do Distrito Federal, Brasil.-----	33
TABELA 4 - Modelo de regressão logística multivariável dos fatores epidemiológicos relacionados para a ocorrência de equinos naturalmente infectados por <i>Babesia caballi</i> e/ou <i>Theileria equi</i> em 21 regiões administrativas do Distrito Federal/ DF, Brasil.-----	36
TABELA 5 - Identificação das amostras com respectiva identificação do GenBank e regiões administrativas-----	38

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - (A) Desenvolvimento de <i>Theileria equi</i> dentro do carrapato vetor e dentro do cavalo. (B) Desenvolvimento de <i>Babesia caballi</i> carrapato e no cavalo -----	08
FIGURA 2 - Esfregaço sanguíneo demonstrando <i>Theileria equi</i> (A) e <i>Babesia caballi</i> (B) em eritrócitos -----	08
FIGURA 3 - Possíveis rotas de transmissão de piroplasmose equina -----	09
FIGURA 4 - Distribuição global piroplasmose equina, 2020 -----	14
FIGURA 5 - Mapa temático indicando os pontos de coleta das amostras alocadas nas regiões administrativas do Distrito Federal/DF -----	25
FIGURA 6 - Nested PCR, gel amplificação de sequências do gene rap-1 de <i>Babesia caballi</i> .37	
FIGURA 7 – Árvore filogenética resultante da análise de sequências do gene 18S rRNA de <i>Theileria equi</i> das amostras de equinos naturalmente infectados no Distrito Federal/Brasil.---	40
FIGURA 8 - (A) Mapa de Kernel indicando áreas de calor relacionadas a presença de <i>T. equi</i> em cavalos carroceiros no Distrito Federal/DF, Brasil. (B) Mapa de Kernel indicando áreas de calor relacionadas a presença de <i>B. caballi</i> em cavalos carroceiros no Distrito Federal/DF, Brasil. -----	41
FIGURA 9 – (A) Mapa de cluster de correlação espacial entre animais positivos para a presença de DNA de <i>T. equi</i> e o uso de ectoparasiticidas; (B) Mapa de cluster de correlação espacial entre animais positivos para a presença de DNA de <i>B. caballi</i> e o uso de ectoparasiticidas --	42

SÚMARIO

INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	3
1- Histórico e importância do equino no Brasil e no Distrito Federal	3
2- Piroplasmose equina – Etiologia.....	4
3- Taxonomia, morfologia e ciclo biológico	5
4- Transmissão/Vetores.....	9
5- Fatores epidemiológicos	10
6- Distribuição geográfica.....	12
7- Patogenia e sinais clínicos	14
8- Importância e impactos econômicos.....	16
9- Diagnóstico	16
10 Filogenia e variabilidade genética de <i>Theileria equi</i>	20
11 Tratamento e Prevenção	21
MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
1- Área de Estudo e Amostragem	24
2- Questionário epidemiológico	25
3- Coleta e armazenamento das amostras	26
4- Extração de DNA total.....	26
5- Detecção Molecular de <i>Babesia caballi</i> por PCR em tempo real:.....	27
6- Caracterização molecular de <i>Babesia caballi</i> por nested PCR.....	27
7- Detecção Molecular de <i>Theileria equi</i> por PCR em tempo real	28
8- PCR convencional para caracterização de <i>Theileria equi</i>	29
9- Sequenciamento das amostras.....	29
10- Análise do sequenciamento	30
11- Análise estatística	31
12- Análise espacial	31
RESULTADOS	32
1- Análise bivariada	32
2- Análise multivariada	36
3- Caracterização molecular de <i>Babesia caballi</i>	37

4- Análise filogenética de <i>Theileria equi</i>	37
5- Análise geoespacial.....	41
DISCUSSÃO	42
CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

INTRODUÇÃO

A Piroplasmose Equina (PE) é uma doença que afeta tanto equídeos domésticos quanto selvagens (Dahiya et al., 2018; Akkoyun e Oguz, 2019), causada por hemoprotozoários do filo Apicomplexa: *Theileria equi* (Laveran, 1901); e/ou *Theileria haneyi* e/ou *Babesia caballi* (Nuttall e Strickland, 1910), transmitidos por carrapatos. A doença pode se manifestar nas formas agudas, subagudas ou crônicas em seus hospedeiros (Knowles et al., 1996; Guimarães et al., 1998; Battsetseg et al., 2001; Heim et al., 2007; Guidi et al., 2015; Onyiche et al., 2019; Tirosch-Levy et al., 2020). Os casos agudos apresentam sinais inespecíficos como febre, icterícia, anemia, dispneia, perda de peso, edema e até mesmo morte (Battsetseg et al., 2001; Heim et al., 2007; Guidi et al., 2015; Onyiche et al., 2019). Casos subagudos ou crônicos com animais assintomáticos são comuns em regiões endêmicas com altas taxas de adultos infectados, tornando o controle do agente desafiador (Brüning, 1996; Souza et al., 2019). Animais que se recuperam de infecções agudas podem permanecer como reservatórios por 1 a 4 anos em infecções por *B. caballi* ou por toda a vida em infecções por *T. equi*, atuando como portadores assintomáticos (de Waal, 1992; Heim et al., 2007). A PE é enzoótica em regiões tropicais e subtropicais, intimamente relacionada a áreas com alta concentração de carrapatos vetores, afetando regiões que abrigam até 90% da população mundial equina (Friedhoff, 1988; Friedhoff et al., 1990; WHOA, 2014; Dahiya et al., 2018; Aziz e Al-Barwary, 2019). Isso leva a perdas econômicas significativas para a indústria equestre, incluindo restrições ao movimento internacional de cavalos (Friedhoff et al., 1990; Knowles, 1996; Rapoport et al., 2014).

Mais de 30 espécies de carrapatos foram identificadas como vetores para *T. equi* e/ou *B. caballi*, incluindo *Hyalomma*, *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Amblyomma* e *Haemaphysalis* (Borges e Leite, 1998; Guimarães et al., 1998; Mehlhorn e Schein, 1998; Labruna et al., 2001; Ueti et al., 2005; Scoles e Ueti, 2015). Estudos sorológicos no Brasil mostram taxas de prevalência variando de 18% a 90% para *B. caballi* e de 17% a 100% para *T. equi* nos rebanhos nacionais (Souza et al., 2019). Apesar de diversos estudos sobre a prevalência de PE, a positividade equina pode estar relacionada a fatores como idade, sexo, raça, localização e exposição a carrapatos, com práticas de manejo consistentemente associadas à infecção (Balkaya et al., 2010; Kouam et al., 2010; Qablan et al., 2013; Guidi et al., 2015; Onyiche et al., 2019; Tirosch-Levy et al., 2020).

Cavalos de tração, o foco deste estudo, são comumente utilizados para trabalho e subsistência, expondo-os a ambientes adversos como trabalho excessivo, nutrição inadequada

e alta infestação por carrapatos, tornando-os mais suscetíveis a infecções por *T. equi* e *B. caballi*. Esses animais servem como importantes reservatórios dos agentes causadores da PE. Variações nas características da doença entre regiões sugerem a presença de outros possíveis fatores associados (Santos et al., 2011), no entanto, a literatura sobre a epidemiologia dos rebanhos brasileiros permanece limitada.

O diagnóstico da PE é desafiador devido à baixa parasitemia e aos sintomas inespecíficos ou ausentes (Souza et al., 2019; Tirosh-Levy et al., 2020; Bonadimann et al., 2021). Técnicas moleculares como a PCR em tempo real (qPCR) têm sido cruciais para detectar, quantificar e investigar cepas circulantes nos rebanhos (Peckle et al., 2022).

Avanços tecnológicos recentes têm facilitado o uso de ferramentas em genômica comparativa e análise filogenética, aprimorando estudos sobre a diversidade genética de hemoparasitas e auxiliando na compreensão da epidemiologia de doenças transmitidas por carrapatos (Allsopp e Allsopp, 2006; Forrester e Hall, 2014; Sant et al., 2019). Análises filogenéticas baseadas no gene 18S rRNA de *T. equi*, frequentemente utilizadas para genotipagem e filogenética devido ao seu alto número de cópias, baixa taxa de substituição e alta taxa de conservação, identificaram cinco genótipos (A, B, C, D e E) com base em clados distintos (Qablan et al., 2012; Qablan et al., 2013; Peckle et al., 2018).

O Distrito Federal, conhecido por sua significativa produção agrícola e pecuária, onde os cavalos desempenham um papel fundamental (EMATER, 2022), oferece condições ambientais ideais para o desenvolvimento de carrapatos que atuam como vetores para a PE. Compreender a distribuição, prevalência e diversidade genética da PE nesta região é crucial para entender a epidemiologia, os impactos na saúde animal e avaliar os riscos para indivíduos suscetíveis. Portanto, este estudo tem como objetivo identificar a distribuição e prevalência da Piroplasmose equina (PE) no Distrito Federal (DF), identificar potenciais fatores epidemiológicos intrínsecos e extrínsecos associados às infecções por *T. equi* e *B. caballi*, e investigar a diversidade genética das sequências do gene 18S rRNA de *T. equi* em cavalos carroceiros naturalmente infectados no DF.

REVISÃO DE LITERATURA

1- Histórico e Importância do equino no Brasil e no Distrito Federal

A história dos equinos no Brasil data de 1534, quando animais oriundos da Ilha da Madeira foram trazidos por Martin Afonso de Souza para a até então capitania hereditária de São Vicente, na região Sudeste do país (Torres; Jardim, 1992). Nos anos seguintes, mais animais, principalmente da Península Ibérica (Portugal e Espanha) foram introduzidos em diversas regiões do ainda Brasil colônia (SEAB, 2017). Aos poucos esses animais foram sendo incorporados ao estilo de vida dos cidadãos, exercendo diferentes atividades no manejo de rebanhos, meios de transporte, atividades de tração, produção de carne, atividades militares, dentre outros (Barroso, 1938; Costa, 2008; Santos et al., 2020a). A progressiva adaptação dos cavalos, permitiu sua multiplicação e expansão no país, que por apresentar dimensões continentais e com ecossistemas variados, esses animais tornaram-se mais resistentes e ágeis de acordo com a seleção natural direcionada para as diferentes regiões, como o pampa gaúcho, a região do pantanal mato-grossense, as regiões Nordeste, Norte e Sudeste (Costa, 2007).

Atualmente, no país, destacam-se 22 raças de equídeos, construídas e identificadas ao longo dos anos como um produto nacional e significante de brasilidade, os quais fazem parte de diversas culturas regionais, como as raças: Pantaneiro, Crioulo e Nordestino (Costa, 2007; Melo et al., 2011; Camphora, 2017; SEAB, 2017; Adelman; Camphora, 2020; Boscatti; Adelman; 2020; Santos et al., 2020a).

De acordo com os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o plantel nacional apresenta 5.834.544 cabeças de cavalos, o quarto maior rebanho do mundo, dentre os quais 18.294 encontram-se alocadas no Distrito Federal (IBGE, 2023). Ressalta-se a dificuldade de registros, devido áreas de acesso mais remotas, portanto esses valores podem estar subestimados.

Em Brasília, o fato da cidade ser bem dispersa espacialmente, com enormes áreas verdes e vazios permeando seu tecido urbano favorece a adoção do cavalo como importante instrumento de trabalho principalmente para parte da sociedade de renda mais baixa (Bursztyn, 1997). Todavia, a equideocultura é explorada em todo o território nacional. Os animais são utilizados no desenvolvimento das mais diversas atividades, sejam agropecuárias, tração, militares, esportivas, lazer, produção de carne e até mesmo, na medicina (equoterapia) (MAPA, 2016; SEAB, 2017; Boscatti; Adelman, 2020).

A integração do cavalo nas atividades socioeconômicas do país, levou no decorrer dos anos a uma atividade que movimentava anualmente R\$ 16,15 bilhões, quase 10% do PIB nacional,

gerando 610 mil empregos diretos e 2.430 mil empregos indiretos, sendo responsável, assim, por 3 milhões de postos de trabalho atualmente (MAPA, 2016). Dada a grande importância dos equinos na economia nacional, investimentos em pesquisas com o intuito de melhorias no manejo, produção e desenvolvimento justificam-se.

2- Piroplasmose equina – Etiologia

A piroplasmose equina (PE) é uma doença vetorial que acomete equídeos domésticos e selvagens como cavalos, mulas, burros e zebras (Dahiya et al., 2018; Akkoyun; Oguz, 2019). Transmitida por carrapatos e causada pelos hemoprotozoários do filo Apicomplexa, *Theileria equi* (Laveran, 1901); e/ou *Theileria haneyi* e/ou *Babesia caballi* (Nuttall and Strickland, 1910) a enfermidade pode manifestar-se de forma aguda, subaguda ou crônica nos seus hospedeiros (Guimarães et al., 1997; Battsetseg et al., 2001, Heim et al., 2007; Guidi et al., 2015; Onyiche et al., 2019; Tirosh-Levy et al., 2020).

Observada pela primeira vez na região de Natal, na África do Sul, em 1883, por Wiltshire, que chamou a doença de febre do antraz, foi posteriormente descrita por Hutcheon em Cape Colony que denominou a patologia como febre biliar do cavalo (Bowhill, 1905). Em 1889, Guglielmi foi o primeiro a observar parasitos intraglobulares no sangue de animais infectados e descreveu a ocorrência da doença na Itália denominando como malária equina (Bowhill, 1905; Darling, 1913).

Em 1901 Laveran descreveu um parasito intraeritrocítico em esfregaços de sangue periférico retirados de cavalos sul-africanos e deu-lhe o nome de *Piroplasma equi* (Laveran, 1901). E, apenas em 1910, Nuttall e Strickland (1910) relataram outro organismo patogênico, *Piroplasma caballi*, que era morfológicamente distinto de *Piroplasma equi*, mas também causava piroplasmose em cavalos e propuseram que a PE era causada na verdade por dois hematozoários distintos (Nuttall; Strickland, 1910; Nuttall; Strickland, 1912). O nome “piroplasma” vem originalmente do fato de que os parasitos durante a fase de merogonia costumam apresentar formato de “pêra” (Uilenberg, 2006). Após diversos estudos e maior reconhecimento quanto ao ciclo biológico, desenvolvimento, morfologia, sequenciamento genético, dentre outras características dos hemoparasitos e, após diversas reclassificações, passaram a ser denominados *Theileria equi* e *Babesia caballi*, porém a denominação da patologia como piroplasmose equina perdura até os dias atuais (Mehlhorn; Schein, 1998; Tirosh-Levy et al., 2020)

No Brasil, a doença foi descrita pela primeira vez por Carini (1910) através do diagnóstico clínico e laboratorial a partir da observação de esfregaços sanguíneos em animais no Estado de São Paulo. A partir daí diversos relatos de casos foram descritos em praticamente todo território

nacional: Minas Gerais (Horta; Figueiredo, 1914); Rio de Janeiro (Costa; Melo, 1963); Paraná (Yamamura et al, 1986; Vieira et al., 2013); Goiás (Linhares, 1994), Rio Grande do Sul (Quintana Nizoli et al., 2008; Vieira et al., 2018), Maranhão (Braga et al., 2017), Bahia (Costa et al., 2019), dentre outros. Diante dos dados apresentados, a doença é considerada endêmica em todo território brasileiro. Entretanto, ainda não existem relatos na literatura quanto a detecção e prevalência dos agentes da piroplasmose equina no Distrito Federal. Diante do reconhecimento dos possíveis prejuízos não só a saúde dos animais, como também devido encargos financeiros nos tratamentos e restrições impostas pela presença da doença, o rápido diagnóstico e detecção, principalmente de animais que se apresentam clinicamente normais, torna-se primordial na prevenção da transmissão e disseminação da PE para animais suscetíveis. Ainda, aliados a dificuldade do controle da patologia em conjunto com a facilidade de dispersão, , destaca-se a importância na implementação precoce de medidas de controle adequadas para redução dos possíveis danos.

3- Taxonomia, Morfologia e Ciclo Biológico

A espécie *Theileria equi* está atualmente inserida na seguinte posição taxonômica (Mehlhorn; Schein, 1998):

Domínio: EUKARYOTA Chatton, 1925

Reino: CHROMISTA Caval.-Sm. (1981)

Superfilo: ALVEOLATA Cavalier-Smith, 1991

Filo: MIOZOA Cavalier-Smith, 1987

Infrafilo: APICOMPLEXA Levine, 1970

Classe: COCCIDIOMORPHEA Doflein, 1901

Ordem: PIROPLASMIDA Wenyon, 1926

Família: THEILERIIDAE Du Toit, 1918

Gênero: *Theileria* Bettencourt, 1907

Espécie: *Theileria equi* (Laveran, 1901) Mehlhorn e Schein, 1998

Atualmente a espécie *Babesia caballi* está inserida na seguinte posição taxonômica (Nuttall; Strickland, 1912):

Domínio: EUKARYOTA Chatton, 1925

Reino: CHROMISTA Caval.-Sm. (1981)

Superfilo: ALVEOLATA Cavalier-Smith, 1991

Filo: MIOZOA Cavalier-Smith, 1987

Infrafilo: APICOMPLEXA Levine, 1970
Classe: COCCIDIOMORPHEA Doflein, 1901
Ordem: PIROPLASMIDA Wenyon, 1926
Família: BABESIIDAE Poche, 1913
Gênero: *Babesia* Starcovici, 1893
Espécie: *Babesia caballi* (Nuttall & Strickland, 1912)

Atualmente, os parasitos são classificados dentro do filo Apicomplexa, que contém outros hemoprotozoários, como *Plasmodium*, *Cryptosporidium* e *Toxoplasma* (Rothschild, 2013; Wise et al., 2013). A ordem Piroplasmida engloba diversos gêneros de parasitos heteroxenos que tem como hospedeiro invertebrado os carrapatos (Roberts; Janovy, 2005). Esta ordem é caracterizada por organismos pleomórficos que podem ser piriformes, amebóides, alongados e que se locomovem por flexão ou deslizamento (Vitari, 2018).

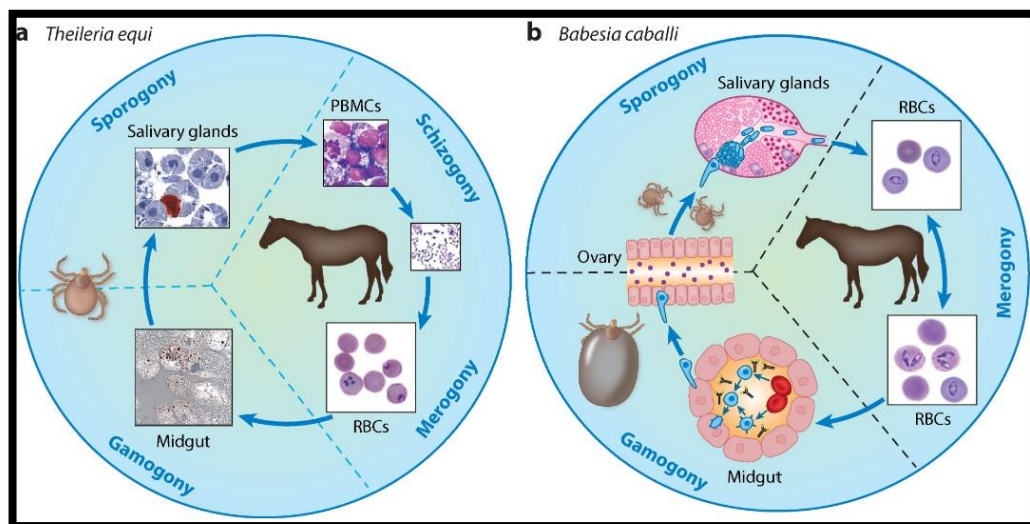
A taxonomia dos agentes etiológicos da PE tem sido questionada desde a sua descoberta e permanece controverso até os dias atuais para *T. equi* (Mehlhorn; Schein, 1998; Kappmeyer et al., 2012; Alsarhan, 2017). Em 1998, o parasito *Babesia equi*, foi reclassificado para o gênero *Theileria*, família Theileriidae, por Mehlhorn e Schein. Estudos filogenéticos usando análise do gene do ácido ribonucleico ribossômico (rRNA) de subunidade pequena sugerem que *T. equi* pertence a um grupo parafilético distinto, diferente tanto do gênero *Babesia* quanto do gênero *Theileria*, indicando portanto, que o organismo possui características intermediárias entre os dois gêneros (Uilenberg, 2006; Allsopp et al., 2007;). Para tanto, análises genômicas recentes apoiam o conceito de um novo gênero para *T. (B.) equi* (Kappmeyer et al., 2012). Dados adicionais são necessários para determinar a localização final deste parasito e, portanto, esta pesquisa utilizará a designação *T. equi*, em concordância com a classificação taxonômica mais recente.

Babesia caballi é considerado um organismo típico do gênero *Babesia* porque se replica exclusivamente dentro dos eritrócitos do hospedeiro vertebrado, produzindo dois merozoítos em forma de pêra nos eritrócitos do hospedeiro (**Figura 2**), quando os esporozoítos são inoculados durante a alimentação do carrapato o parasito passa por uma fase transtadial e transovariana nos carrapatos vetores (Holbrook et al. 1968; Rothschild, 2013). Apesar do ciclo de vida semelhante em muitos aspectos com *B. caballi*, *T. equi* apresenta várias características fundamentais que o distinguem de outras espécies do gênero (Scholes; Ueti, 2015). As primeiras células a serem invadidas são as PBMCs (células mononucleares de sangue periférico), onde ocorrerá a primeira esquizogonia, resultando em merozoítos móveis (Schein

et al., 1981; Moltmann et al., 1983; De Waal, Van Heerden, 1994; Wise et al., 2014). Além de linfócitos T e B, *T. equi* tem capacidade de invadir também monócitos e macrófagos (Ramsay et al., 2013). Esta característica permite que algumas manifestações clínicas nos animais infectados por *T. equi* se apresentem de forma mais grave quando comparadas as infecções causadas por *Babesia*, tais como linfadenopatia, pirexia, trombocitopenia e panleucopenia (Homer et al., 2000). Durante replicação nos eritrócitos (merogonia), *T. equi* realiza uma divisão em quatro merozoítos em uma formação de cruz de Malta (**Figura 2**) (Schein et al., 1981; Bruning, 1996).

Durante repasto sanguíneo, o carrapato competente ingere os eritrócitos infectados com *T. equi*, onde ocorre a gametogonia e formação de micro e macrogametas que se fundem formando o zigoto que por sua vez diferencia-se na forma móvel chamada cineto (Santos et al., 2020b). O cineto migra através da hemolinfa para vários tecidos incluindo as glândulas salivares onde ocorrerá a esporogonia que resultará na formação de esporozoítos (forma infectante) os quais serão liberados na saliva durante repasto sanguíneo infectando primariamente os leucócitos do hospedeiro vertebrado (esquizogonia com formação de macroesquizontes e microesquizontes) liberando merozoítos que em seguida infectarão eritrócitos (merogonia), e após ruptura destes, os merozoítos liberados penetram em novos eritrócitos (Scholes; Ueti, 2015). Quando os carrapatos são infectados por *B. caballi*, os cinetos migram na hemolinfa invadindo diversos órgãos inclusive os ovários, permitindo assim que os vetores apresentem transmissão não só transestadial, mas também transovariana (Zapf; Schein, 1994; Rothschild, 2013; Scholes; Ueti, 2015), conforme demonstração na **Figura 1**. Os cinetos também alcançam as glândulas salivares, onde ocorre a esporogonia e os esporozoítos são liberados na saliva durante a alimentação do vetor. Os esporozoítos de *B. caballi* irão realizar os ciclos esquizogônicos exclusivamente em eritrócitos. Entretanto, alguns estágios de desenvolvimento no ciclo dos parasitos no carrapato ainda precisam ser elucidados (Ali et al., 1996).

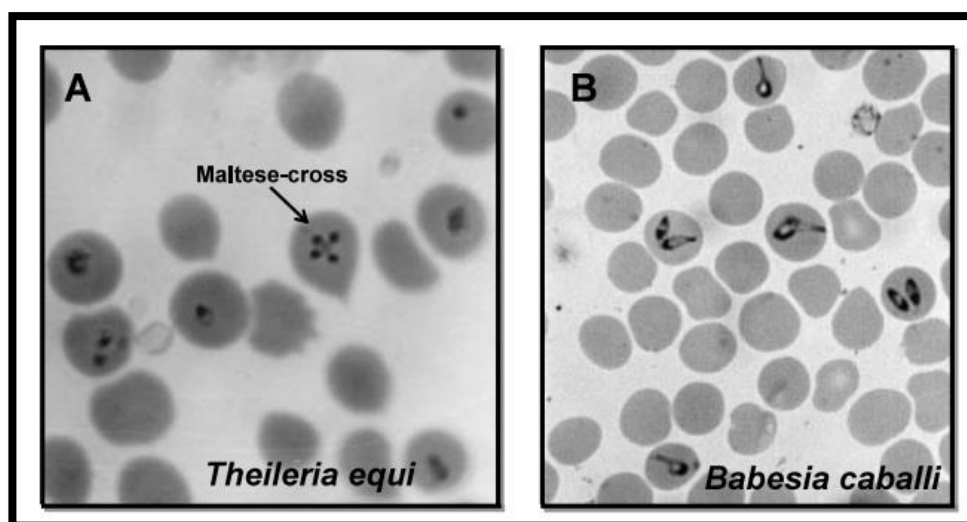
Figura 1: (a) Desenvolvimento de *Theileria equi* dentro do carrapato vetor e dentro do cavalo. (b) Desenvolvimento de *Babesia caballi* carrapato e no cavalo. Abreviaturas: PBMCs: células mononucleares do sangue periférico; RBCs: glóbulos vermelhos.



Fonte: Scholes; Ueti, 2015

Morfologicamente, trofozoítos de *T. equi* medem 1,0-2,5 μm enquanto os trofozoítos de *B. caballi* medem 2,5-5 μm (Homer et al., 2000). A diferenciação morfológica de ambos os agentes pode ser evidenciada na **Figura 2**.

Figura 2: Esfregaço sanguíneo demonstrando *Theileria equi* (A) e *Babesia caballi* (B) em eritrócitos



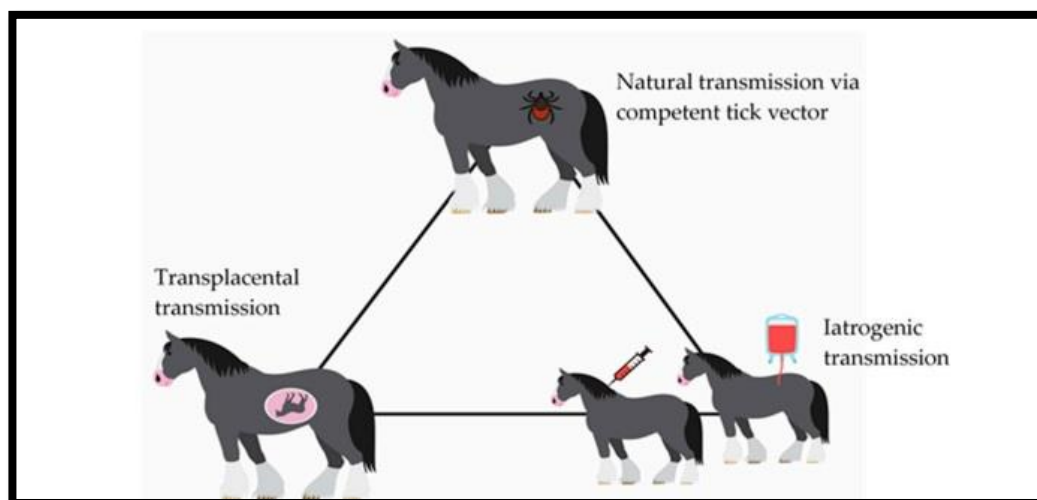
Fonte: Kumar et al., 2009

4- Transmissão/Vetores

A transmissão da PE costuma se enquadrar em 3 categorias: transmissão por carrapatos, geralmente chamada de transmissão vetorial, transmissão transplacentária e transmissão iatrogênica (por meio de instrumentos veterinários contaminados, transfusões sanguíneas, etc) (Ali et al., 1996; Onyiche et al., 2019). A transmissão transplacentária por *T. equi* já foi reportada, resultando em abortos, nati-mortos ou potros portadores de piroplasmose (de Waal, 1992; Phipps; Otter, 2004; Sudan et al., 2015; Sant et al., 2016). Porém, o estágio em que o feto é infectado ainda é desconhecido e, portanto, o momento ideal para o tratamento não foi determinado (Lewis et al., 1999; Rothschild, 2013; Onyiche et al., 2019). A transmissão mecânica por inoculação de sangue infectante a partir de insetos voadores e/ou a inoculação de sangue após regurgitação em contato com a superfície e outros possíveis vetores nunca foram confirmados (Ali et al., 1996).

Até o presente momento, a principal via de transmissão para equídeos reconhecida é pelo repasto sanguíneo de carrapatos que são os hospedeiros definitivos e a competência vetorial é restrita para apenas algumas espécies de carrapatos (Tirosh-Levy et al., 2020; Scoles; Ueti, 2015). Uma representação esquemática dos possíveis métodos de transmissão de PE é apresentada na **Figura 3**.

Figura 3: Possíveis rotas de transmissão de piroplasmose equina.



Fonte: Onyiche et al., 2019.

Existem cinco gêneros com mais de 30 espécies de carrapatos reconhecidos que podem atuar como vetores da PE: *Amblyomma* spp., *Dermacentor* spp., *Haemaphysalis* spp., *Hyalomma* spp. e *Rhipicephalus* spp. (Scoles; Ueti, 2015) ao redor do mundo.

Nas Américas, as espécies descritas como vetores competentes para *B. caballi* são *D. nitens*, *D. albipictus* e *D. variabilis* (Scoles; Ueti, 2015). No Brasil, a principal espécie implicada na transmissão é *D. nitens* (Pfeifer- Barbosa et al., 1992; Linhares, 1994; Pfeifer- Barbosa, 1995; Mujica, 2002). Enquanto há carência de informações quanto aos principais vetores envolvidos na transmissão e distribuição de *T. equi* na América do Sul, principalmente no Brasil (Fernandes, 2007). Na América Latina, os cavalos são regularmente infestados com três espécies de carrapatos: *Amblyomma cajennense*, *Dermacentor nitens* e *Rhipicephalus microplus* (Borges; Leite, 1998; Labruna et al. 2001; Pereira et al. 2005). Scoles et al. (2011), demonstraram que *A. cajennense*, reclassificado por Nava et al. (2014) como *Amblyomma mixtum*, adquire a infecção por *T. equi* enquanto se alimenta em equinos infectados e transmite intraestadiamente quando se alimenta em equinos não infectados. A participação de *A. mixtum* na transmissão de *T. equi* também foi indicada por Wise et al. (2013), entretanto, sua participação e importância no ciclo ainda não foram efetivamente comprovadas natural ou experimentalmente. A transmissão experimental de *T. equi* não se mostrou efetiva por ixodídeos da espécie *Dermacentor nitens* (Neumann, 1897) (Dennig, 1988). *R. microplus* foi implicado como vetor por exibir competência vetorial pra transmissão de *T. equi* (Guimarães et al., 1997; Guimarães et al. 1998; Ueti et al. 2005; Peckle et al., 2022), no entanto sua importância no ciclo e manutenção da patologia ainda é questionável, uma vez que é um carrapato monoxênico e a transmissão transovariana de *T. equi* ainda não foi relatada. Além disso os equinos são hospedeiros alternativos dessa espécie de carrapato, dependendo, portanto, do contato com bovinos (hospedeiros primários) nas condições de pastagens consorciadas em que ambas espécies são criadas juntas (Peckle et al., 2013)

De maneira geral, ainda existem muitas lacunas quanto ao entendimento das espécies vetores e sua importância na transmissão e manutenção do status endêmico nos plantéis brasileiros. Conhecer e compreender a ecoepidemiologia destes vetores e as interações hospedeiro-vetor-patógeno-ambiente são um pré-requisito essencial para a implementação de medidas preventivas adequadas e eficazes (Nadal et al.; 2022)

5- Fatores epidemiológicos

A dinâmica da transmissão de *T. equi* difere de *B. caballi*. Enquanto *T. equi* possui capacidade de persistir indefinidamente em cavalos imunocompetentes, portando-se, como

hospedeiros silenciosos da doença até mesmo por toda vida, *B. caballi* pode ser eliminada e permanecer no hospedeiro por um período de até 4 anos (De Waal, 1992; Brüning, 1996; Heim et al., 2007; Souza et al., 2019; Wise et al., 2019). Assim, nas áreas endêmicas quando equinos suscetíveis, ainda jovens, são expostos a ambos os parasitos, podem ser infectados por *T. equi*, quando a prevalência observada aumenta com a idade e o hospedeiro é o principal reservatório de parasitos, e quando infectado por *B. caballi* a prevalência da doença, por outro lado, reduz com a idade e é maior em animais mais jovens, e, devido a capacidade de transmissão transovariana nos vetores, tanto carrapatos quanto animais susceptíveis podem servir como reservatório (Roby, 1963; Rothschild, 2013. Wise et al., 2013; Onyiche et al., 2019; Tirosh-levy et al., 2020).

Em geral, os principais hospedeiros são os equídeos, como asininos, zebras e cavalos no entanto alguns estudos indicam a participação de outros possíveis reservatórios (Rothschild, 2013; da Silveira et al. 2017; de Souza Gonçalves et al., 2020), levantando questionamentos quanto a especificidade do hospedeiro (Onyiche et al., 2019).

A doença é amplamente distribuída por todo mundo, de acordo com a presença de carrapatos vetores competentes (Tirosh-Levy et al., 2020). Embora os requisitos precisos do ciclo carrapato-vetor-parasito-hospedeiro para infecção ou doença clínica não sejam totalmente conhecidos, o resultado de densidades crescentes de cavalos infectados e/ou carrapatos em uma área, indica precocemente o aumento na infecção e um potencial aumento no número de animais doentes (Wise et al., 2013; Tirosh-Levy et al., 2020).

Os carrapatos são os vetores, portanto, seu controle constitui um aspecto importante na prevenção da piroplasmose equina (Kerber et al., 1999). No entanto, apesar do conhecimento de mais de 30 espécies de carrapatos que podem potencialmente atuar como vetores, novas espécies de carrapatos podem adquirir competência e capacidade vetorial para transmitir piroplasmídeos a equinos visto que não existem atualmente métodos de controle confiáveis. O principal meio de prevenção ainda é evitar a introdução de cavalos e carrapatos infectados em áreas livres de piroplasmídeos que infectam equinos (Rothschild, 2013; Scoles; Ueti, 2015; Nadal et al. 2022). A compreensão do efeito do vetor na epidemiologia começa com o conhecimento de quais espécies de carrapatos estão envolvidas na transmissão (Scoles; Ueti, 2015).

Os únicos fatores epidemiológicos consistentemente associados à infecção por PE são as práticas de manejo e a presença de carrapatos, já, outros fatores, incluindo espécie

hospedeira, raça, idade, sexo e atividade dependem da área e da população em questão (Tirosh-Levy et al., 2020). Outros possíveis vetores também nunca foram confirmados (Ali et al., 1996).

Ainda, a presença de portadores clinicamente silenciosos é comum, e configura um risco para transmissão e manutenção da PE, bem como representa um importante empecilho no controle da patologia.

6- Distribuição geográfica

A PE é amplamente distribuída por todo mundo, em regiões tropicais e subtropicais da África, América e Ásia, bem como nas áreas mediterrânicas da Europa (Zapf; Schein, 1994). Em geral, a distribuição geográfica de *B. caballi* e *T. equi* são semelhantes e está associada com a distribuição de carrapatos vetores competentes (Peixoto, 2017). Estima-se que apenas 10% dos cavalos a nível mundial habitam regiões livres de PE (de Waal, 1992). Essa ampla distribuição se deve provavelmente em parte devido a manutenção dos movimentos internacionais de animais cronicamente infectados (Nadal et al., 2022). Alguns dos países considerados não endêmicos para a PE incluem Canadá, Islândia, Reino Unido, Groelândia, Norte da Europa, Irlanda, Singapura, Japão, Nova Zelândia e Austrália, muitas dessas áreas permanecem livres da PE atualmente devido serem climaticamente inadequadas para vetores de carrapatos competentes (Rothschild, 2013). Na América do Norte, o Estados Unidos foi considerado livre de PE em 1988 após a implementação de um programa de erradicação iniciado nos anos 1960, entretanto ainda ocorrem surtos esporádicos (Scoles; Ueti, 2015). Este país continua em constante monitoramento, obtendo o “status” de “piroplasmosis-free” desde 2009 (Wise et al., 2014).

De maneira geral, a prevalência dos agentes é variável ao redor do mundo, no entanto, a proporção de *T. equi* geralmente é superior à de *B. caballi*.

De acordo com Nadal et al. (2022) os países europeus demonstraram uma soroprevalência estimada de 8-30% e prevalência de 2-25% para *T. equi* e *B. caballi*, respectivamente.

Na Ásia, diversos países demonstraram a presença dos agentes. China teve uma taxa de prevalência de 17% para *B. caballi* e 28% para *T. equi* na província de Xinjiang (Xuan et al., 2002). A Mongólia teve uma taxa de prevalência de 40,1% para *B. caballi* e 72,8% para *T. equi* em 2004 (Boldbaatar et al., 2005). Alguns países apesar de não serem considerados livres, e não apresentarem programas de monitoramento, indicaram baixa prevalência da patologia como Coréia do Sul com uma prevalência global para ambos os agentes de 1,1% (Seo et al.,

2011) e Indonésia com prevalência de 8,5% e 2,1% para *T. equi* e *B. caballi*, respectivamente (Nugraha et al., 2018).

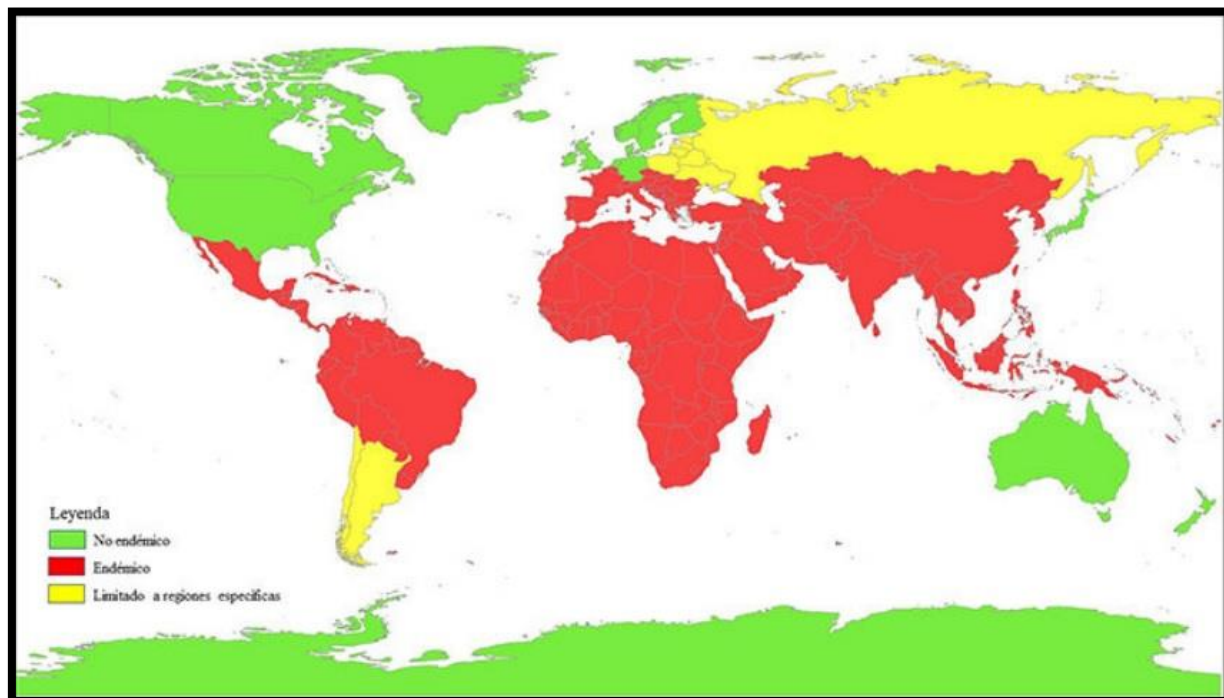
No continente africano, países como Egito, com prevalência de 36.5 % para *T. equi* e 20 % para *B. caballi* (Selim; Khater, 2020); Nigéria, com prevalência de 94% para *T. equi* e 6% para *B. caballi* (Turaki et al., 2014) e África do Sul, com prevalências de 83% para *T. equi* e 70% para *B. caballi* (Bhoora et al., 2010a), demonstram o caráter endêmico da patologia no continente.

Na América Latina, assim como na África diversos países são considerados endêmicos para PE. Nestes países, a presença dos carrapatos vetores é constante devido ao clima tipicamente tropical e, portanto, a transmissão da doença é de difícil controle (Peixoto, 2017). De acordo com Hébert et al. (2021), a prevalência da PE chega a 45% no norte da Argentina. No Paraguai, uma prevalência de 32.7% e 1.5% de cavalos infectados por *T. equi* e *B. caballi*, respectivamente foi demonstrada por Ahedor et al., (2023). Mujica et al., (2011), indicaram positividade de 70.6% para *B. caballi* e 50.3% para *T. equi* na Venezuela.

No Brasil, a elevada prevalência também é apontada em diversos estudos e em diversas regiões. Mato Grosso com prevalência de 2,74% e 25,91% para *B. caballi* e *T. equi*, respectivamente (Schein et al., 1988). Minas Gerais, com prevalência global para ambos os agentes de 60.6% (Ribeiro et al., 1999). Na Bahia, Costa et al. (2019), evidenciaram 84,3% de equinos positivos para *T. equi* e 23,5% de animais positivos para *B. caballi*. Em Pernambuco Souza et al. (2019) detectaram soroprevalência de 27.2% para *B. caballi* e 34.8% para *T. equi*.

Todos esses dados confirmam a necessidade de estudos quanto a compreensão da epidemiologia da doença no Brasil com o intuito de elaborar programas de controle e monitoramento eficientes. Para maior elucidação a **Figura 4** demonstra a distribuição da PE pelo mundo.

Figura 4: Distribuição global Piroplasmose equina, 2020.



Fonte: Diaz-Sanchez et al., 2020

7- Patogenia e sinais clínicos

O período natural de incubação da PE é de 5 a 28 dias (Wise et al., 2014). A doença pode manifestar-se de forma aguda, subaguda ou crônica nos seus hospedeiros. A maioria dos casos clínicos é causada por *T. equi*, enquanto as infecções por *B. caballi* tendem a não ser clinicamente aparentes e raramente são responsáveis por anemia grave e outros sinais de babesiose típica (de Waal, 1992). Casos mais graves estão associados a alta parasitemia, e o baixo status de imunidade protetora (Tamzali, 2013). Cavalos infectados com qualquer um dos agentes apresentam sinais clínicos semelhantes e, portanto, indistinguíveis (Traub-Dargatz et al., 2010). Nas infecções agudas por *T. equi*, os sinais clínicos geralmente estão relacionados à hemólise acentuada resultando em anemia (Wise et al., 2013). Os sinais clínicos típicos de PE aguda podem incluir febre, anorexia, anemia, icterícia, mucosas congestionadas, taquipnéia e taquicardia, sudorese e edema de membros e supraorbital, nos casos graves, estão presentes hemoglobinúria e bilirrubinúria, bem como uma variedade de apresentações atípicas devido a danos e disfunções orgânicas (Tamzali, 2013). Os cavalos que sobrevivem à doença aguda tornam-se inevitavelmente portadores crônicos e não apresentam sinais clínicos evidentes de

infecção e ainda podem servir como reservatórios para transmissão a cavalos suscetíveis (Wise et al., 2014). Cavalos afetados pela piroplasmose crônica podem desenvolver baixo desempenho e atrofia muscular, ou ainda os sinais clínicos de PE crônica podem ser semelhantes aos sinais observados em cavalos com anemia infecciosa equina (AIE) ou outras condições inflamatórias crônicas. (Rothschild, 2013; Pasolini et al., 2018). Animais que sofrem uma infecção inaparente, quando sujeitos a estresse, como pós-treino intensivo ou transporte, podem apresentar uma parasitemia recrudescente, resultando em episódios clínicos recidivantes mais tarde na vida (Kerber et al., 2009)

Uma vez infectados com *T. equi*, os cavalos permanecem portadores por toda a vida, independentemente da infecção se debelar naturalmente ou com tratamento medicamentoso (Schein, 1988). Acredita-se que a infecção por *B. caballi* é autolimitante, durando até 4 anos após a infecção (Holbrook, 1969). No entanto, muitos cavalos que se recuperam da infecção por *B. caballi* recaem posteriormente, sugerindo um estado temporário em que os organismos não podem ser detectados, sugerindo uma possível infecção para toda a vida (Rothschild, 2013). Casos de surtos com manifestação clínica em áreas endêmicas para PE são raros.

Quando transmitida por via transplacentária podem ocorrer abortos, geralmente durante o último trimestre de gestação, natimortos e piroplasmose neonatal superaguda, que é quase invariavelmente fatal que raramente são acompanhados por doença clínica na égua (Erbsloh, 1975; Marlow; Bester, 1994).

A resposta imune do hospedeiro equino à infecção por estes protozoários da ordem Piroplasmida é complexa e multifacetada (Onyiche et al., 2019). Não existe imunidade cruzada entre os dois parasitos. Portanto, um equídeo pode ser infectado com um ou ambos os patógenos simultaneamente (Maurer, 1962). Apesar da ampla literatura com diferentes teorias os mecanismos de infecção persistente permanecem desconhecidos (Wise et al., 2013). Acredita-se que a resposta imune a *T. equi* envolva mecanismos imunológicos pelo menos parcialmente mediados por células (Ali et al., 1996). Os correlatos da imunidade protetora contra *T. equi* não são totalmente compreendidos, e menos ainda se sabe sobre *B. caballi* (Wise et al., 2014).

A mortalidade em áreas endêmicas pode variar de 5% a 10%, dependendo da cepa do protozoário, da saúde geral dos animais e da disponibilidade de tratamento, porém pode ser superior a 50% quando cavalos adultos que nunca foram previamente expostos são introduzidos em áreas endêmicas (Rothschild, 2013).

8- Importância e impactos econômicos

As perdas económicas associadas à PE são significativas e incluem o custo do tratamento, especialmente em cavalos com infecção aguda, perda de desempenho, morte e restrições no cumprimento dos requisitos internacionais relacionados com a exportação ou participação em eventos desportivos equestres (Kerber et al., 1999). Quando instaurada em um rebanho, pode apresentar transmissão transplacentária, resultando em abortos e nati-mortos. Esta forma de transmissão resulta em graves perdas económicas para os criadores de cavalos em regiões endémicas para PE (Rothschild, 2013).

Em relação a produção de carne, o Brasil atualmente é o 4º maior produtor de carne equina do mundo, no entanto algumas lesões provocadas pela PE podem desqualificar a carne para o comércio, ou pelo menos decrescer sua qualidade e, conseqüentemente, seu valor final. Países livres da PE limitam a entrada de cavalos soropositivos para os piroplasmidas nos seus países. (Coultous et al., 2023). A proibição na exportação ou deslocamento para competições esportivas torna essa doença o principal impedimento no trânsito internacional de equinos (Knowles, 1996; Guimarães et al., 1998). O que leva a um dos principais entraves no desenvolvimento da equinocultura nacional.

Dada a importância dos equinos na estrutura socioeconômica do Brasil, o status endêmico, com ampla disseminação da doença por todo território nacional, e o difícil controle da doença, os prejuízos causados podem ser imensuráveis

9- Diagnóstico

A piroplasmose equina pode ser diagnosticada por vários métodos diferentes, incluindo esfregaços sanguíneos corados com Giemsa, avaliação clínica, método de cultura *in vitro*, métodos sorológicos como ELISA e moleculares como PCR (de Waal, 1992; Xuan et al., 2001; Rampersad et al., 2003)

O diagnóstico clínico é difícil de se realizar uma vez que os sintomas/sinais são inespecíficos e podem se confundir com uma variedade de outras doenças como influenza equina, anemia infecciosa equina, encefalomyelites virais ou tripanossomíase (de Waal, 1992). Outra dificuldade se deve ao fato de a manifestação clínica causada por ambos os agentes ser indistinguível e por muitas vezes animais positivos para PE serem assintomáticos (Ali et al., 1996).

Dentre as técnicas microscópicas, a mais comumente empregada é a técnica do esfregaço sanguíneo, método simples, que depende da identificação do parasito em esfregaços de sangue finos ou grossos corados com Giemsa usando microscópios de luz (Sumbria; Singla,

2015). Entretanto apesar de ser uma técnica prática e rápida, a sensibilidade deste método é baixa, levando a resultados falso negativos em muitos casos crônicos e subclínicos, quando as cargas parasitárias são baixas (Tirosh-Levy et al., 2020). A maioria dos cavalos infectados tem baixo nível de parasitemia que pode não ser detectável em esfregaços de sangue, mesmo em casos agudos (Tamzali, 2013). As parasitemias em casos agudos de *B. caballi* variam de 0,1% a 10%. Nas infecções por *T. equi*, a parasitemia pode exceder 20%, mas níveis de 1–5% são mais comuns (de Waal, 1992). A técnica permite o diagnóstico direto do parasito intraeritrocitário no sangue periférico (Ali et al., 1996), no entanto, a precisão do exame microscópico depende da habilidade e experiência do pesquisador que investiga o esfregaço (Sumbria; Singla, 2015). O esfregaço de sangue espesso revelou maior sensibilidade, no entanto, diversos estudos indicam que a técnica de PCR é mais sensível com melhores resultados (de Waal, 1992; Zobba et al., 2008; Short et al., 2012).

Dentre os testes sorológicos há uma ampla gama de testes empregados no diagnóstico da PE. Podem apresentar boa sensibilidade e especificidade para detecção de portadores inaparentes, no entanto, esses ensaios não fornecem informações sobre a carga parasitária atual para interpretação de estados de doença clínica (Tirosh-Levy et al., 2020).

Desenvolvido em 1945 por Hirato et al. (1945), o teste de fixação de complemento (CFT) era anteriormente o teste padrão oficialmente aceito para diagnóstico de PE e tem sido usado em todo o mundo para testar cavalos que entram em países livres de PE. O CFT foi implementado pela primeira vez como um teste de importação para equídeos entrando nos Estados Unidos em 1970 e permaneceu como teste oficial até 2005 (Sumbria; Singla, 2015). Parasitos inteiros coletados após a hemólise são usados como antígenos (Ali et al., 1996). O CFT detecta anticorpos em 8 dias após a infecção; enquanto os títulos diminuem em 2 a 3 meses após exposição, portanto, apesar de muito específico para infecções agudas, apresenta baixa sensibilidade na infecção crônica, ou após tratamentos uma vez que IgG(T) não realiza fixação de complemento. (Sumbria; Singla, 2015; Tirosh-Levy et al., 2020). O teste CFT pode não identificar todos os animais infectados, especialmente aqueles que têm produção de reações anti-complementares como burro e zebra, devido à incapacidade do IgG de fixar complemento de cobaia (McGuire et al., 1971). Portanto, o CFT foi substituído, e atualmente os testes reconhecidos para fins de importação de equinos pela Organização Mundial de Saúde Animal (WHO/OIE) são os testes IFAT (teste de imunofluorescência de anticorpos indireta) e cELISA (Ensaio imunoenzimático de inibição competitiva) (WOAH, 2014).

Normalmente, o IFAT é mais sensível que o CFT e tem sido usado como um teste complementar para auxiliar na análise dos resultados do CFT (Friedhoff; Soule, 1996; Wise et al., 2013). Neste teste, anticorpos marcados com fluorescência reagem com antígeno ligado a uma lâmina de vidro e será considerada positivo se for observada forte fluorescência em uma diluição de 1: 80 ou superior (Wise et al., 2013). Os títulos de IFAT são detectados de forma mais consistente do que os títulos de CFT, e os soros permanecem positivos pela IFAT por mais tempo do que pela CFT (Tenter; Friedhoff, 1986). A resposta de anticorpos pelo IFAT pode ser detectada 3 a 20 dias após a infecção e permanecer durante o período latente de infecção permitindo a detecção de casos crônicos (Tamzali, 2013; Tirosh- Levy et al., 2020). Para aumentar a especificidade com a IFAT, o soro deve ser diluído, o que resulta simultaneamente em perda de sensibilidade (Onyiche et al., 2019). Outro ponto negativo está no fato de a IFAT apresentar uma subjetividade na interpretação da fluorescência, que aliado a necessidade de grandes quantidades de antígenos tornam a padronização da técnica difícil (Rothschild; Knowles 2007; Tamzali, 2013; WHOA 2014; Sumbria; Singla, 2015).

Para melhorar a padronização e o desempenho dos testes sorológicos, vários ensaios de cELISA foram desenvolvidos utilizando antígenos recombinantes purificados e desde 2004 o teste de cELISA foi aprovado pela OIE como o teste recomendado para triagem e transporte internacional de cavalos (Sumbria; Singla, 2015; Tirosh-Levy et al., 2020). Ele detecta anticorpos para ambos os agentes da PE usando anticorpos monoclonais específicos (Tamzali, 2013). Isso facilita a padronização do ensaio, superando os problemas na purificação de antígenos, já que a especificidade depende apenas do anticorpo monoclonal utilizado (Tamzali, 2013). O cELISA utiliza os anticorpos monoclonais EMA-1 para *T. equi* e para *B. caballi*, uma forma recombinante de RAP-1 também foi desenvolvida (Knowles Jr. et al., 1992; Kappmeyer et al., 1999). Atualmente, uma ampla gama de antígenos recombinantes (EMA-1; EMA-2; Be82 e Be158) e proteínas (RAP-1; Bc48; Bc134) para o uso em ELISAs na detecção de *T. equi* e *B. caballi*, respectivamente, vêm sendo produzidos em *Escherichia coli* ou em células de insetos por baculovírus (Sumbria; Singla, 2015). O teste é considerado o mais sensível na detecção de infecções crônicas por *T. equi*, pois, demonstrou capacidade de detectar o agente até 21 dias após infecção experimental e aproximadamente 5 semanas após a transmissão do carrapato (Knowles Jr. et al., 1991). O uso de um único epítipo também pode reduzir a chance de reações cruzadas entre os parasitos (Tirosh-Levy et al., 2020).

Nos últimos anos, com o advento do diagnóstico molecular, as técnicas moleculares vêm ganhando popularidade para a detecção de parasitos. Os passos iniciais se deram a partir

década de 1990 baseando-se em sondas de DNA específicas da espécie, projetadas para detectar parasitos em amostras de sangue de animais infectados experimentalmente ou naturalmente e/ou de portadores inaparentes. (Posnett et al., 1991; Potgieter et al., 1992). Desde então, muitas variações de PCR vêm sendo desenvolvidas, como PCR em tempo real (qPCR), *nested* PCR e LAMP (Alhassan et al., 2007; Wise et al., 2013; Lobanov et al., 2018). Dentre as quais, a qPCR tem apresetado maior aceitação em relação a outras técnicas de PCR, devido à sua maior rapidez, sensibilidade, reprodutibilidade e o risco reduzido de contaminação (Mackay, 2004; Sumbria; Singla, 2015).

De maneira resumida, a técnica baseia-se na amplificação e detecção de frações de DNA do parasito no sangue do animal portador através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Esses métodos são mais sensíveis do que o exame microscópico e mais úteis clinicamente do que a sorologia, pois representam infecção atual, e também podem ser projetados para distinguir entre espécies ou genótipos de parasitos (Tirosh-Levy et al., 2020).

A validade da utilização da PCR rotineiramente nos Estados Unidos tem sido questionada como uma possível ferramenta no auxílio do diagnóstico para cavalos na África do Sul (Wise et al, 2013). Após exame da composição genética do EMA-1, utilizado nos testes de cELISA, foi reconhecido que as cepas de todo o mundo não eram 100% homólogas (Ueti et al., 2003; Bhoora et al., 2010b). Tamzali et al. (2013) propõe a utilização do diagnóstico molecular para a avaliação de animais infectados em tratamento, principalmente de *B. caballi*, uma vez que, para efeitos de exportação o animal precisa ser isento de PE e o teste exigido, o cELISA pode permanecer positivo por um longo período (até 6 meses) mesmo após um tratamento bem-sucedido.

Embora a distinção entre casos clínicos de PE e cavalos saudáveis seja normalmente facilitada por testes moleculares e sorológicos, o diagnóstico de casos subclínicos de PE é mais desafiador devido à sensibilidade da PCR em tempo real e à baixa carga parasitária em alguns portadores, dificultando a diferenciação entre portadores e indivíduos soropositivos e PCR negativos. Esta diferenciação é crítica ao avaliar a eficácia do tratamento e ao exportar cavalos para países livres de PE (Dorrego-Rodriguez et al., 2023). Ao comparar diferentes métodos diagnósticos Camino et al. (2019) constataram que houve concordância entre os testes sorológicos e moleculares, e que a pequena variação encontrada poderia estar relacionada à cinética das respostas dos anticorpos. Estudos indicam que, infecções agudas podem ser detectadas com PCR e a sorologia é mais adequada para infecções crônicas (Joachim et al., 2022).

Em resumo, como a patologia clínica da PE não é específica, o diagnóstico preciso requer testes específicos (Tamzali, 2013). Para um diagnóstico meticoloso da PE, o teste deve ser considerado como "padrão ouro" se for suficientemente sensível para detectar precocemente infecções agudas e crônicas, específico para a diferenciação entre as duas espécies parasitárias, e deve ser econômico (Sumbria; Singla, 2015).

10 – Filogenia e Variabilidade genética de *Theileria equi*

A descrição inicial como *Piroplasma equi* por Laveran (1901), a reclassificação como *Babesia equi* e, subsequentemente como *Theileria equi* por Mehlhorn e Shein (1998), refletem a incerteza taxonômica deste protozoário que tem sido questionada desde a sua descoberta e permanece controverso até os dias atuais (Mehlhorn; Schein, 1998; Kappmeyer et al., 2012; Alsarhan, 2017). As frequentes mudanças taxonômicas deste piroplasmida, embora bem fundamentadas, na maioria das vezes baseiam-se em características morfológicas e biológicas (Peixoto, 2017; Vitari, 2018). Porém, estes métodos são considerados de utilidade limitada, visto que a variabilidade de apicomplexos circulando entre vetores de vida selvagem e animais domésticos é gigantesca e existem apicomplexos estreitamente relacionados (Gray, 2006; Githaka et al., 2014; Mans et al., 2015; Knowles et al., 2018).

Os avanços tecnológicos das últimas décadas nas áreas da genômica comparativa e da análise filogenética vêm contribuindo para os estudos de diversidade genética das populações de hemoparasitas (Allsopp, 2006; Forrester; Hall, 2014; Sant et al., 2019). Estudos filogenéticos sugerem que *T. equi* pertence a um grupo parafilético distinto, diferente tanto do gênero *Babesia* quanto do gênero *Theileria*, indicando portanto, que o organismo possui características intermediárias entre os dois gêneros (Uilenberg, 2006; Allsopp et al., 2007). Ainda, uma variação genética considerável vem sendo descrita na literatura, e descobertas recentes de espécies novas e intimamente relacionadas, como *T. haneyi*, sugerem também, que a classificação atual de *T. equi* pode incluir vários organismos distintos (Knowles et al., 2018; Dahmana et al., 2019; Bishop et al., 2020). De acordo com Katzer et al. (1998) a diversidade de sequências nos isolados de *T. equi* tem sido maior do que o encontrado em qualquer uma das espécies clássicas de *Theileria*.

Dentre os diversos alvos empregados, a sequência genica da subunidade ribossômica (18S rRNA) tem sido amplamente aceita e empregado em estudos de análises filogenéticas, caracterização e classificação taxonômica devido seus altos níveis de conservação e elevado número de cópias, resultando em uma enorme base de dados (Salim et al., 2010). Sabe-se que

este marcador molecular pode possuir até nove regiões com elevada variação gênica, denominadas de V1 a V9, favorecendo a sua utilização como um importante marcador para estudos de diversidade genética (Ueti et al., 2003; Hadziavdic et al., 2014). Este gene também possui regiões conservadas, que podem ser utilizadas para estudos de ferramentas de diagnóstico de *T. equi* (Kim et al., 2008; Bhoora et al., 2010b).

Vários autores documentaram um grau notavelmente alto de polimorfismo genético intraespecífico nos locais do 18S SSU rRNA, que geralmente são altamente conservados (Nagore et al., 2004; Bhoora et al., 2009; Liu et al., 2016; Knowles et al., 2018).

Análises filogenéticas do gene 18S rRNA revelaram a presença de cinco genótipos diferentes, A, B, C, D e E, com base na presença de clados distintos (Qablan et al., 2012; Qablan et al., 2013; Peixoto, 2017). Autores como Alanazi et al. (2014) e Coultous et al. (2020) propõe uma classificação em que consideram quatro grupos (A – D), onde o grupo E faz parte do grupo B. Para tanto, estudos adicionais são necessários para realizar uma classificação adequada deste parasita (Wang et al., 2019).

11 -Tratamento e Prevenção

Inicialmente, destaca-se que as estratégias de tratamento entre países endêmicos e não endêmicos apresenta diferenças significativas. Nas regiões endêmicas, o tratamento da PE é usado apenas como meio de diminuir os sinais clínicos, reduzindo as fatalidades, enquanto nas regiões não endêmicas o objetivo do tratamento é eliminar o risco de transmissão com protocolos de tratamentos esterilizantes (químioesterilização) (Tamzali, 2013; Wise et al., 2013). A eliminação do organismo não tem qualquer propósito nos países endêmicos, uma vez que se presume que a imunidade vitalícia é conferida com infecção crônica ou inaparente (Tamzali, 2013).

Uma série de drogas tem sido utilizadas na tentativa do tratamento da PE com variados níveis de sucesso (de Waal, 1992). O propionato de imidocarb tem sido considerada a droga de escolha, mas pode ser tóxico em níveis terapêuticos (Cohen et al., 1983; Rothschild, 2013; Onyiche et al., 2019). Ambos os parasitos respondem aos medicamentos babesicidas, mas *T. equi* é mais refratário ao tratamento do que *B. caballi* e requer dosagens mais altas e terapia com mais tempo de duração (Vial; Gorenflot, 2006 Butler et al., 2008; Schwint et al., 2009). De acordo com Schein (1988), *B. caballi* pode ser melhor tratado com medicamentos quimioterápicos do que *T. equi*. O diaceturato de diminazeno é eficaz na químioesterilização de *B. caballi* e na eliminação de sinais clínicos em infecções por *T. equi*, medicamentos

antiteilericidas, como a buparvaquona tem apresentado eficácia no combate à doença causada por *T. equi* e podem, em combinação com o imidocarb, também eliminar o parasito (Bruning, 1996). A clofazimina mostrou excelentes efeitos inibitórios contra *Babesia* e *Theileria* *in vitro* e *in vivo* (Tuvshintulga et al., 2016). Enfim, numerosos medicamentos têm sido usados há vários anos para o tratamento da piroplasmose, incluindo oxitetraciclina e azitromicina, muitos dos quais têm se mostrado cada vez mais ineficazes devido à sua toxicidade e resistência avançada (Vial; Gorenflot, 2006; El-Saber Batiha et al., 2020). Na ausência de vacinas eficazes disponíveis até o momento, a terapia medicamentosa passa a configurar como um dos principais meios de prevenção da disseminação da PE (Tamzali et al., 2013). Para tanto, a avaliação de novos medicamentos como: epoxomicina, alicina, nerolidol, triclosan, gossipol, cloreto de nitidina, 17-DMAG, trans -chalcona, ácido elágico, atovaquona, ivermectina, e até mesmo extrato de ervas com efeitos babesicidas têm sido amplamente avaliados no decorrer dos últimos anos (Hughes; Oz, 1995; Beshbishy et al, 2019a; Batiha et al. (a), 2019; Beshbishy et al., 2019b; Batiha et al., 2019b; Díaz-Sánchez et al., 2020).

Entretanto, nas áreas endêmicas, o tratamento geralmente visa apenas reduzir o quadro clínico de infecções agudas, enquanto a prevenção da infecção nessas regiões é virtualmente impossível e presume-se que a pré-imunidade conferida com a infecção inicial atua para proteger o cavalo de doença recorrente após exposições subsequentes (Friedhoff et al., 1990; de Waal, 1992; Wise et al., 2013; Onyiche et al., 2019).

Várias estratégias experimentais de imunização foram testadas para PE, no entanto, até o presente momento ainda não existem vacinas eficazes comercialmente disponíveis para *T. equi* ou *B. caballi* (Rothschild, 2013).

Nos países não-endêmicos o controle da PE deve incluir, o monitoramento sorológico dos animais, a aplicação de terapia medicamentosa, restrição na movimentação de cavalos infectados e controle efetivo de carrapatos vetores (Bruning, 1996, Tamzali, 2013). As medidas de controle podem variar dependendo do status da PE e do local (Rothschild, 2013).

Um dos métodos mais confiáveis para controlar a PE continua sendo o impedimento da entrada de equinos infectados em áreas livres da doença bem como, garantir que os animais originários de países endêmicos sejam testados e livres de carrapatos previamente a sua entrada (Irby, 2002). Todos os cavalos importados de países endêmicos passam rigorosamente por quarentena (Wise et al., 2013). Alguns países endêmicos também restringem a entrada e o movimento interno para evitar a introdução de estirpes diversas e possivelmente mais virulentas (Scoles; Ueti, 2015).

Um dos passos mais importantes no programa de controle PE é prevenir exposição a carrapatos, que pode ser complicado por causa dos requisitos biológicos específicos de cada espécie, seu ciclo e seus hospedeiros (Sumbria; Singla, 2015). Isto inclui aplicação rotineira de acaricidas, vigilância da presença de carrapatos e redução da vegetação (USDA, 2012). No entanto, a aplicação regular de acaricidas químicos, tem gerado problemas com resistência em carrapatos, poluição ambiental e em produtos de origem animal (Kunz; Kemp, 1994). Para tanto, o uso estratégico de acaricidas é recomendado para reduzir, mas não eliminar a exposição a carrapatos (Tirosh-Levy et al., 2020).

Fatores ambientais também podem afetar a quantidade e diversidade dos agentes no ambiente, entretanto, ainda faltam estudos esclarecedores quanto aos principais fatores de risco, que reconhecidos podem auxiliar no controle de vetores bem como da disseminação da doença (Del Pino; Mañés, 2020). Portanto, a compreensão da epidemiologia da patologia pode exercer um papel fundamental no desenvolvimento de estratégias regulatórias para prevenir a propagação de patógenos.

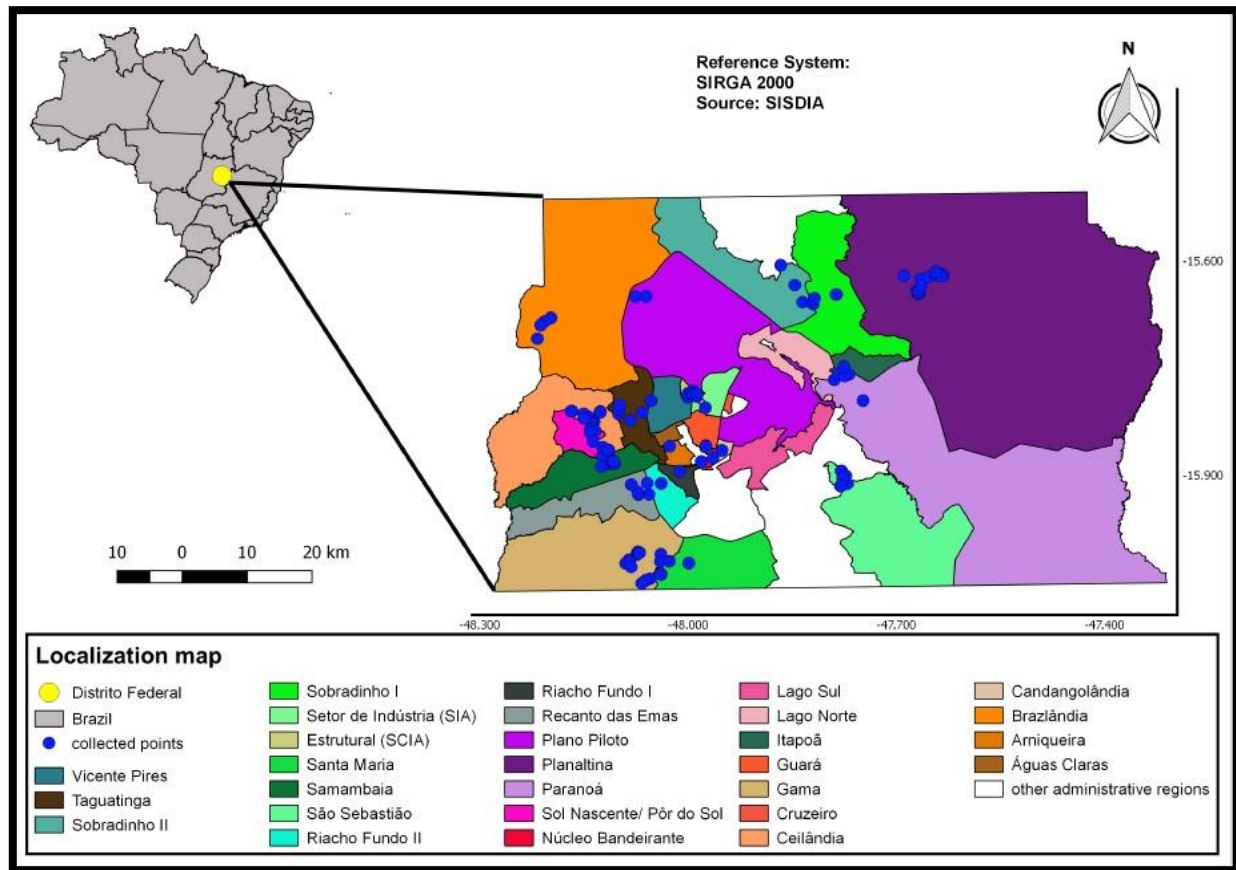
De maneira geral, ainda faltam maiores esclarecimentos, quanto ao desenvolvimento dos agentes nos vetores, quanto a persistência da infecção, quanto a elaboração de vacinas, quanto a resposta imune, quanto métodos eficientes de diagnóstico e tratamento, quanto aos possíveis fatores ambientais e epidemiológicos, dentre outros, para a elaboração adequada de estratégias eficientes no controle e prevenção da PE (de Waal, 1992; Wise et al. 2013; Sumbria; Singla, 2015; Del Pino; Mañés, 2020).

MATERIAIS E MÉTODOS

1- Área de Estudo e Amostragem

Foi realizado um estudo transversal em 21 regiões administrativas do Distrito Federal, Brasil (**Figura 5**). A população de cavalos de tração registrada pela Defesa Agropecuária do Distrito Federal (SEAGRI/DF) foi utilizado para conduzir a presente investigação. A amostragem foi realizada, estratificando o número de amostras de acordo com a população equina estimada em cada uma das áreas administrativas. Os dados da população equina foram fornecidos pela SEAGRI/DF. Um cálculo foi realizado para a amostragem de animais do estudo, considerando-se uma prevalência esperada (p) de 50%, Z corresponde ao nível de confiança (1,96 para 95%);, e um erro relativo (E) de 5%, obtendo-se 384 cavalos (Medronho et al.,2019). Admitindo que não há dados precedentes sobre a prevalência de piroplasmose equina em cavalos da área-alvo, a presente pesquisa adotou o valor de 50% como prevalência esperada, o que fornece o número máximo de amostras a serem coletadas assumindo a equação $n = \frac{Z^2 \times p \times (1-p)}{E^2}$ (Medronho et al., 2019). Mais 7% de margem de segurança foi adicionada à amostragem quanto à possibilidade de consentimento, recusa, coagulação do sangue ou hemólise e extravio de amostras para um tamanho da amostra final de 409 cavalos.

Figura 5: Mapa temático indicando os pontos de coleta das amostras alocadas nas regiões administrativas do Distrito Federal/DF.



2- Questionário epidemiológico

Um questionário epidemiológico semiestruturado, previamente validado em um estudo separado (Biral et al., 2021), foi administrado aos tutores após obtenção de consentimento prévio por meio da assinatura de um termo de consentimento informado. O questionário teve como objetivo explorar fatores intrínsecos e extrínsecos associados à presença de DNA de *B. caballi* e *T. equi* nas áreas de estudo.

As variáveis estudadas foram: sexo (masculino ou feminino), idade (maior ou menor que 5 anos), tipo de habitação (alvenaria ou madeira), cor da pelagem (clara ou escura), acesso a regiões florestais (sim ou não), acesso a pastagens (sim ou não), origem dos animais (animais nascidos dentro ou fora do Distrito Federal), assistência veterinária (animais atendidos por veterinário certificado e animais que nunca receberam nenhum tratamento ou cuidados profissionais), uso de ectoparasiticida diretamente no animal (sim ou não), o local onde o animais pernoitam (propriedade particular ou celeiro comunitário), presença de animais silvestres (sim ou não), contato com capivara (sim ou não), área (rural ou urbana), condição

sanitária (Condição de saúde precária: escore corporal abaixo de três, mucosas oral e ocular pálidas, oito horas de trabalho diário e apresentação de lesões na pele; condição de saúde adequada: escore corporal de três ou mais, mucosas oral e ocular normocoloridas, menos de oito horas de trabalho por dia e ausência de lesões na pele.)

A presença ou ausência de carrapatos, bem como a identificação das espécies presentes nos indivíduos do conglomerado amostral foram avaliadas como medida objetiva a partir da observação direta. No entanto, análise estatística não foi conduzida devido à presença quase ubíqua de carrapatos na população-alvo. Portanto, nenhuma diferença significativa na frequência de infestação por carrapatos foi observada entre animais negativos ou positivos para *T. equi* e *B. caballi*.

A condição sanitária (negativa: lesões de pele, baixo score corporal, etc; ou positiva: score corporal adequado, ausência de sinais clínicos ou lesões de pele) também foi avaliada por observação direta por médico veterinário.

3- Coleta e armazenamento das amostras

As amostras de sangue foram coletadas de cavalos para posterior análise molecular, mediante autorização prévia de seus tutores e aprovação do Comitê de Pesquisa Comitê de Ética da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), sob o número 845/2016, e pela comissão de ética em a utilização de animais do Instituto Veterinário da UFRRJ sob o número 5268240716. Após a contenção do animal, foi coletado sangue na região do pescoço, na veia jugular, com agulha vacutainer (0,8 mm x 25 mm) e armazenado em frasco com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) em geladeira até que as amostras fossem processadas.

4- Extração de DNA total

A extração do DNA total das amostras de sangue dos equinos foi realizada utilizando Dneasy Blood and Tissue Kit (Qiagen®) seguindo-se as recomendações do fabricante.

A pureza e a concentração do DNA total foram determinadas por espectrofotometria (Nanodrop ND-2000 ®, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 0,9% corado por Brometo de Etídeo e visualizado sob luz UV. As amostras foram padronizadas a uma concentração de 50 ng/μL.

5- Detecção Molecular de *Babesia caballi* por PCR em tempo real:

A detecção do hemoprotozoário foi realizada pela amplificação de um fragmento de 95 pb do 18S rDNA de *B. caballi* através de PCR em tempo real (qPCR) conforme ensaio descrito por Bhoora et al. (2010a). Foram utilizados os primers Bc_18SF402 (5'-GTAATTGGAATGATGGCGACTTAA-3') e Bc_18SR496 (5'-CGCTATTGGAGCTGGAATTACC-3') e a sonda Bc_18SP (5'-6-FAM-CCTCGCCAGAGTAA-MGB-3'). O ensaio também continha um controle positivo interno exógeno TaqMan® (Exo IPC), para evitar resultados falso-negativos que possam ocorrer devido a falhas na extração de DNA/inibição de PCR. Os ensaios foram realizados em duplicata no aparelho StepOne Plus (Applied Biosystems®, Waltham, Massachusetts, EUA), em um volume total de 12 µL, contendo: 1X de TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems®, Waltham, Massachusetts, EUA), 0,9 mM de cada “primer”, 0,25 mM da sonda TaqMan MGB, 1X sonda VIC (reagentes de controle positivo interno exógeno TaqMan®, Applied Biosystems, Foster City, CA), 1X DNA Exo IPC e 3 µL (150ng) de DNA das amostras de sangue. As condições de termociclagem foram: ativação inicial da DNA polimerase a 95 °C por 20 s, seguido de 45 ciclos de 1 s a 95 °C e 20 s a 60 °C. O limite de detecção desta reação é de $1.9 \times 10^{-4}\%$ de eritrócitos parasitados. As amostras com valores de Cq inferiores a 40 ciclos foram consideradas positivas para *B. caballi*.

6- Caracterização molecular de *Babesia caballi* por nested PCR

A detecção do gene rap-1 da *B. caballi* foi realizada nas amostras consideradas positivas na etapa da triagem anterior (PCR em tempo real). A amplificação do gen rap-1 foi realizada por nested PCR conforme ensaio descrito por Bhoora et al. (2010). Os primers e tamanho dos produtos utilizados estão descritos na **Tabela 1**. Ambas as reações foram realizadas no aparelho Veriti® (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) em um volume total de 25 µL, 400 µM de cada dNTP (dNTP Mix, Qiagen), 0,4 µM de cada “primer”, 1 U da polimerase Phusion High-Fidelity DNA (Thermo Scientific) em tampão Phusion HF à 1X e 3 mM de MgCl₂. Na primeira reação foram utilizados 5 µL do DNA de sangue equino previamente testado positivo, e na segunda, 1 µL do produto de PCR da primeira reação foi utilizado como molde.

As condições de termociclagem de ambos os ciclos de amplificação foram as seguintes: 2 min a 98°C, seguidos de 10 ciclos a 98°C/10s, 65°C/30s e 72 °C/30s, onde a temperatura de anelamento foi decrescida em 0,5 °C por ciclo. Mais 25 ciclos a 98°C/10s, 60°C/30s e 72 °C/30s.

A extensão final foi realizada à 72 ° C por 2 min. Os produtos de amplificação foram purificados partir de gel de agarose a 1,5%.

Tabela 1: Descrição de primers nested PCR

Nome	Sequência (5'-3')	Tamanho (pb)	Tm (°C)	Tm (°C)	Tamanho do produto (pb)
RAP1-F1	TTT TY G GCG CCC TCT TGC	18	56-58	141-159	899
RAP1-R1	TTT TY G GCG CCC TCT TGC	26	72	1014-1040	
RAP1-F2	TAC CAA CCR CTG ACC CTT C	19	58-60	473-492	482
RAP1-R2	AAA CGC TY C GCA AAC TTG G	19	56-58	936-955	

7- Detecção Molecular de *Theileria equi* por PCR em tempo real

A detecção do DNA de *T. equi* envolveu a amplificação de um fragmento de 81 pb do gene 18S rRNA usando o conjunto de primers Be18SF (5'-GCGGTGTTTCGGTGATTCATA-3') e Be18SR (5'-TGATAGGTCAGAACTTGAATGATACATC-3'), juntamente com a sonda fluorescente de hidrólise Be18SP (5'-AAATTAGCGAATCGCATGGCTT-3'). A sonda foi marcada na extremidade 5' com o corante fluoróforo 6-carboxifluoresceína e na extremidade 3' com o corante apagador 6-carboxi-tetrametilrodamina (Kim et al., 2008). O ensaio também continha um controle positivo interno exógeno TaqMan® (Exo IPC), para evitar resultados falso-negativos que possam ocorrer devido a falhas na extração de DNA/inibição de PCR.

Os ensaios foram realizados em duplicata usando o sistema StepOne Plus com um volume final de 12 µL, composto por: 1X TaqMan® Universal PCR Master Mix, 450 nM de cada primer, 250 nM da sonda FAM, 1X sonda VIC (reagentes de controle positivo interno exógeno TaqMan®, Applied Biosystems, Foster City, CA), 1X DNA Exo IPC e 3 µL (150 ng) de DNA de amostras de sangue.

As condições de termociclagem foram: 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min e 45 ciclos a 95 °C por 20 s, seguidos de 55 °C por 1 min (Kim et al. 2008). O limite de detecção desta reação é de 1,5 parasitas/µl por amostra. As amostras com valores de Cq menores ou iguais a 40 ciclos foram consideradas positivas.

8- PCR convencional para caracterização de *Theileria equi*

O fragmento de DNA de 1600 pb do gene 18S rRNA foi amplificado em oito amostras de diferentes regiões administrativas do Distrito Federal as quais foram selecionadas aleatoriamente para sequenciamento.

O gene completo foi amplificado utilizando a técnica de PCR descrita por Bhoora et al. (2009), com algumas modificações, utilizando os iniciadores NBabesia1F (5'-AAGCCATGCATGTCTAAGTATAAGCTTTT-3') e 18SRev-TB (5'-GAATAATTCACCGGATCACTCG-3').

A reação de PCR consistiu em um volume final de 25 µL, contendo: 1X tampão Platinum® (Tris-HCl 200 mM, pH 8.4, KCl 500 mM), 4 mM de MgCl₂, 0,4 mM de cada dNTP, 0,4 µM de cada primer (NBabesia1F e 18SRev-TB), 1,5 U de Platinum® Taq DNA Polimerase e 3 µL de DNA, com o volume completado com água ultrapura. As condições de termociclamento foram as seguintes: desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 60 °C por 45 segundos, extensão a 72 °C por 1 minuto e uma extensão final a 72 °C por 7 minutos.

Os *amplicons* resultantes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,5% Agarose NA – Amersham Biosciences) em tampão TAE 1x (Promega®, Madison, WI, EUA).

A purificação dos amplicons foi realizada utilizando o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®, Madison, WI, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

A quantificação dos produtos purificados foi estimada utilizando um gel de agarose a 2%, com 5 µL de produtos purificados homogeneizados em 1,5 µL de tampão de amostra. Um marcador de massa molecular de baixo peso molecular de 4 µL Low DNA Mass™ Ladder (Invitrogen®) foi utilizado como escala de massa molecular.

9- Sequenciamento das amostras

Os produtos amplificados foram encaminhados para Biomanguinhos/FIOCRUZ, onde o sequenciamento foi realizado pelo método Sanger (Sanger et al., 1977) utilizando três pares de “primers” descritos no estudo de Bhoora et al. (2009): NBabesia1F e BT18S3R (CCTCTGACAGTTAAATACGAATGCCC), amplificando a parte final do segmento 5'; BT18S3F (GGGCATTTCGTATTTAACTGTCAGAGG) e 18SRev-TB, amplificando a parte final do segmento 3'; BT18S2F (GGGTTCGATTCCGGAGAGGG) e BT18S2R(CCCGTGTTGAGTCAAATTAAGCCG) amplificando a parte interna do gene.

10- Análise do sequenciamento

As amostras foram montadas e editadas utilizando o programa CLC Main WorkBench v5.1 e em seguida depositadas no GenBank sob o número de acesso PP249538, PP249539, PP249540, PP249541, PP249542, PP249543, PP249544 e PP249545.

As sequências foram alinhadas utilizando o algoritmo Clustal W (1.6) no software MEGA X (Kumar et al., 2018). As oito sequências de 18S rRNA de *T. equi* recém-recuperadas foram alinhadas em um conjunto de dados criado com setenta e quatro sequências de acordo com a espécie do parasita do banco de dados GenBank. *Cardiosporidium cionae* (EU052685) e *Nephromyces* sp. (HM469382) foram usados como outgroup para enraizar a árvore.

A matriz de distâncias nucleotídicas divergentes foi calculada, e as diferenças de pares de bases entre as novas sequências desta investigação e as sequências de referência para *T. equi* (ID: Z15105) foram estimadas no programa CLC Main WorkBench v7.9.2..

A análise filogenética de *T. equi* foi realizada utilizando a Inferência Bayesiana (BI) com a versão 3.2 do MrBayes (Ronquist et al., 2012). A análise de BI envolveu simulações de Monte Carlo da Cadeia de Markov executadas por 2,5 milhões de gerações, com a exclusão de 25% das árvores geradas como a fase de "Burn-in".

Para determinar o modelo de substituição ótimo para a análise filogenética, modelos preditivos foram construídos usando métodos como GTR (General Time Reversible), HKY (Hasegawa-Kishino-Yano), TN93 (Tamura-Nei), T92 (Tamura 3-parâmetros), K2 (Kimura 2-parâmetros) e JC (Jukes-Cantor). Esses modelos foram avaliados com base em seus escores de Critério de Informação Bayesiana (BIC), com escores mais baixos indicando um melhor ajuste ao padrão de substituição.

A não uniformidade das taxas evolutivas entre os sítios foi considerada utilizando uma distribuição discreta de Gama (+G) com cinco categorias de taxa, e uma fração de sítios evolutivamente invariáveis (+I) também foi incluída nos modelos. O melhor modelo, GTR + I + G, para o 18S rRNA de *T. equi* foi selecionado usando o MEGA X, que forneceu o valor BIC mais baixo (Kumar et al., 2018).

. A árvore filogenética final foi visualizada usando o FigTree v1.4.3 e editada usando o Inkscape 1.2.

11- Análise estatística

Os dados obtidos do questionário epidemiológico foram organizados na planilha do Microsoft Excel e depois importados para a Interface RStudio do software R versão 3.6.1 (Allaire, 2012). A análise teve como objetivo investigar a relação potencial entre fatores preditivos e positividade para Piroplasmose Equina (PE). Os cavalos foram considerados positivos para PE se mostrassem amplificação para *T. equi* e/ou *B. caballi*, utilizando qPCR. Esta definição de caso foi usada para análises bivariadas e multivariadas.

Inicialmente, as variáveis foram avaliadas individualmente em uma análise bivariada utilizando o Teste Exato de Fisher, com cada variável comparada à positividade para *T. equi* ou *B. caballi*, em um nível de significância de 95% ($p < 0,05$). Em seguida, foi realizada uma análise combinatória entre as variáveis para criar modelos preditivos utilizando a função "stepAIC" do pacote MASS (Venables; Ripley, 2002). Os modelos foram submetidos à regressão logística utilizando o pacote "rms" (Harrell, 2020). O fator de inflação da variância foi aplicado para confirmar a ausência de multicolinearidade em cada modelo preditivo.

Os modelos foram validados utilizando o método de reamostragem Bootstrap com 1000 pseudo-réplicas. A calibração do modelo foi avaliada visualmente traçando as probabilidades previstas contra as probabilidades observadas. O teste de Hosmer-Lemeshow também foi conduzido utilizando o pacote "generalhoslem" (Fagerland; Hosmer, 2016) para avaliar a qualidade geral do ajuste, com valores próximos a 1 indicando um modelo bem ajustado.

Por fim, a análise da Receptor Operacional de Análise de Curvas Características (ROC) foi empregada utilizando o pacote "pROC" (Robin et al., 2011) para estimar as áreas sob as curvas ROC (AUC, índice c) e avaliar a capacidade geral dos modelos em prever corretamente infecções por *T. equi* e/ou *B. caballi*. A seleção final do modelo foi baseada no índice de performance (índice c), no valor do ajuste do modelo, no comportamento da curva de calibração e no menor Erro Médio Absoluto (MAE) na análise de Bootstrap.

12- Análise espacial

A análise espacial gerou mapas temáticos com a distribuição de amostras coletadas e animais positivos. Um mapa do kernel foi produzido usando o software GIS (QGIS v2.5.17 - Las Palmas) para identificar visualmente clusters de infecção através da interpolação entre animais positivos para *T. equi* e/ou *B. caballi* e as coordenadas geográficas dos locais de estudo. A base cartográfica dos estados do Brasil e Distrito Federal foram obtidos em formato *shapefile* do banco de dados eletrônico do Sistema Distrital de Informações Ambientais (SISDIA, 2022).

e carregado no software GIS, mantendo suas coordenadas em graus no Sistema Geocêntrico de Referência para as Américas (SIRGAS 2000), anteriormente estabelecido pelo IBGE. A escala colorida no raster obtido foi proporcional aos animais positivos (variando de 1 a 30). O Índice Global de Moran (valor-I), variando de -1 a +1, e o valor de pseudo-significância (realizado com 999 permutações, com um nível de significância de 95%, valor $p > 0,05$) foram executados no software GeoDa versão 1.14 e calculados para confirmar a autocorrelação espacial entre os animais positivos, a distribuição espacial e as variáveis epidemiológicas.

RESULTADOS

1- Análise bivariada

O presente estudo detectou um percentual de 56,23% (230/409) de animais positivos para Piroplasmose equina (PE). Dos quais 49,88% (204/409) foram positivos somente para *Theileria equi*, 1,47% (6/409) foram positivos somente para *Babesia caballi*, e 4,89% (20/409) apresentaram coinfeção. A distribuição das frequências por região está descrita na **Tabela 2**.

Tabela 2: Distribuição e frequência dos agentes da Piroplasmose equina nas vinte diferentes regiões administrativas do Distrito Federal, Brasil.

Região Administrativa	Total de amostras	Somente <i>Babesia caballi</i> / prevalência	Somente <i>Theileria equi</i> / prevalência	Coinfectados	Negativos
Riacho Fundo II	11	0	0	0	11
Riacho Fundo I	4	0	2 (0,5)	0	2
Planaltina	42	1 (0,02)	18 (0,43)	2 (0,05)	21
Gama	25	1 (0,04)	12 (0,48)	4 (0,16)	8
Candangolândia	15	0	9 (0,6)	3 (0,2)	3
Plano Piloto	5	0	4 (0,8)	0	1
Recanto das Emas	13	0	5 (0,38)	1 (0,08)	7
Taguatinga	24	1 (0,04)	16 (0,67)	1 (0,04)	6
Samambaia	26	0	8 (0,31)	1 (0,04)	17
Sobradinho I	20	0	13 (0,65)	0	7
Sobradinho II	3	0	3 (1,0)	0	0
SIA	6	0	6 (1,0)	0	0

Paranoá	21	1 (0,05)	16 (0,76)	0	4
Itapoã	7	1 (0,14)	4 (0,57)	1 (0,14)	1
Santa Maria	42	0	27 (0,64)	1 (0,02)	14
São Sebastião	25	0	16 (0,64)	0	9
Guará	20	0	10 (0,5)	3 (0,15)	7
SCIA	15	0	2 (0,13)	1 (0,07)	12
Ceilândia	42	1 (0,02)	19 (0,45)	1 (0,02)	21
Pôr do Sol	30	0	14 (0,47)	1 (0,03)	15
Brazlândia	13	0	0	0	13
Total	409	6	204	20	180

*Cálculo de prevalência = amostras positivas/ n total.

De acordo com a análise bivariada (**Tabela 3**), aplicando o Teste Exato de Fisher foi possível observar associação significativa entre os animais positivos para PE e os seguintes fatores: idade dos animais (animais com idade maior ou igual a 5 anos) e contato com capivara (animais que apresentaram contato com capivara) (**Tabela 3**). Enquanto, os demais fatores analisados não apresentaram associação significativa ($p < 0.05$).

Tabela 3: Análise descritiva e bivariada de fatores intrínsecos e extrínsecos em cavalos que apresentam amplificação do DNA de agentes de Piroplasmose equina em vinte diferentes regiões administrativas do Distrito Federal, Brasil.

Variáveis do Questionário	N (409)	% (+)	Análise bivariada		
			<i>p</i> -valor	Razão de chances (RC)	IC 95%
Sexo			0,36	0,82	0,54 – 1,25
Fêmea	165	(88/165) 53,33			
Macho*	244	(142/244) 58,20			
Idade			0,05	1,66	0,97 – 2,85
≥ 5 anos*	335	(196/335) 58,51			
< 5 anos	74	(34/74) 45,94			

Pelagem			0,23	0,78	0,52 – 1,18
Escura*	224	(132/224) 58,93			
Clara	185	(98/185) 52,97			
Alojamento			0,56	1,15	0,71 – 1,89
Alvenaria*	314	(174/314) 55,41			
Madeira	95	(56/95) 58,95			
Acesso à floresta			0,54	0,85	0,51 – 1,42
Sim	323	(179/323) 55,42			
Não*	86	(51/86) 59,30			
Acesso à pastagem			0,83	1,05	0,68 – 1,62
Sim	270	(153/270) 56,67			
Não*	139	(77/139) 55,39			
Animais realizaram viagens			1	0,99	0,65 – 1,50
Sim	164	(92/164) 56,10			
Não*	245	(138/245) 56,33			
Assistência Veterinária			0,07	1,48	0,95 – 2,31
Sim	139	(87/139) 62,58			
Não*	270	(153/270) 56,67			
Uso de ectoparasiticidas			0,76	1,07	0,70 – 1,63
Sim*	154	(85/154) 55,19			
Não	255	(145/255)			

		56,86			
Local de pernoite dos animais			0,69	1,08	0,72 – 1,63
Propriedade privada	192	(110/192) 57,29			
Curral comunitário*	217	(120/217) 55,30			
Presença de animais silvestres			0,842	1,04	0,69 – 1,57
Sim	224	(127/224) 56,70			
Não*	185	(103/185) 55,67			
Contato com capivaras			0,012	2,22	1,15 – 4,52
Sim*	54	(39/54) 72,22			
Não	355	(191/355) 53,80			
Condição Sanitária			0,15	1,61	0,83 – 3,15
Presença de sinais clínicos*	46	(21/46) 45,65			
Ausência de sinais clínicos	363	(209/363) 57,57			
Área			0,45	1,40	0,63 – 3,15
Urbana	378	(215/378) 56,88			
Rural*	31	(15/31) 48,39			

*Variável de referência

De acordo com a medida objetiva a partir da observação direta, quanto a presença e espécies de carrapatos, observou-se a quase totalidade dos animais avaliados como sendo parasitados não havendo portanto, alteração na frequência de animais infestados entre o grupo

de animais negativos e positivos para *T. equi* e/ou *B. caballi*. As principais espécies observadas foram: *Amblyomma sculptum* e *Dermacentor nitens*.

2- Análise multivariada

Nenhuma das variáveis a serem integradas no modelo de regressão logística demonstraram colinearidade no teste de fiv.

Na análise multivariada, foram construídos treze modelos diferentes, e o modelo completo preditivo, que inclui as variáveis "idade", "contato com capivaras", "cuidados veterinários" e "condição sanitária", foi selecionado devido aos resultados de calibração satisfatórios, apresentando o menor erro médio absoluto (MAE = 0,013). Este modelo também demonstrou os melhores valores de calibração, pois tanto as linhas corrigidas (Bias-Corrected) quanto as aparentes seguiram de perto a linha do modelo ideal. Este modelo exibiu uma área sob a curva (AUC) de 0,609 e um intervalo de confiança de 95% (IC) de 0,56-0,66, indicando um desempenho preditivo moderado.

As variáveis do modelo: 'idade' (valor-p = 0,004; OR = 1,71; IC = 1,01 - 2,87) e 'condição sanitária' (valor-p = 0,04; OR = 1,91; IC = 1,003 - 3,64) apresentaram associações significativas com a infecção por PE. A variável 'contato com capivara' demonstrou valores de *p* marginais, com resultados próximos aos valores de corte estatísticos, sugerindo uma associação potencial. Outras variáveis, como 'cuidados veterinários', não demonstraram associações significativas (**Tabela 4**).

Tabela 4: Modelo de regressão logística multivariável dos fatores epidemiológicos relacionados para a ocorrência de equinos naturalmente infectados por *Babesia caballi* e/ou *Theileria equi* em 21 regiões administrativas do Distrito Federal/ DF, Brasil.

Variáveis Associadas	Análise Multivariada					
	C(β)	Erro padrão	p-valor	Wald	RC	IC 95%
Idade	0,53	0,26	0,04	2,01	1,71	1,01 – 2,87
Contato com capivara	0,63	0,33	0,05	1,92	1,88	0,99 – 3,59
Assistência veterinária	0,39	0,22	0,08	1,73	1,47	0,95 -2,28

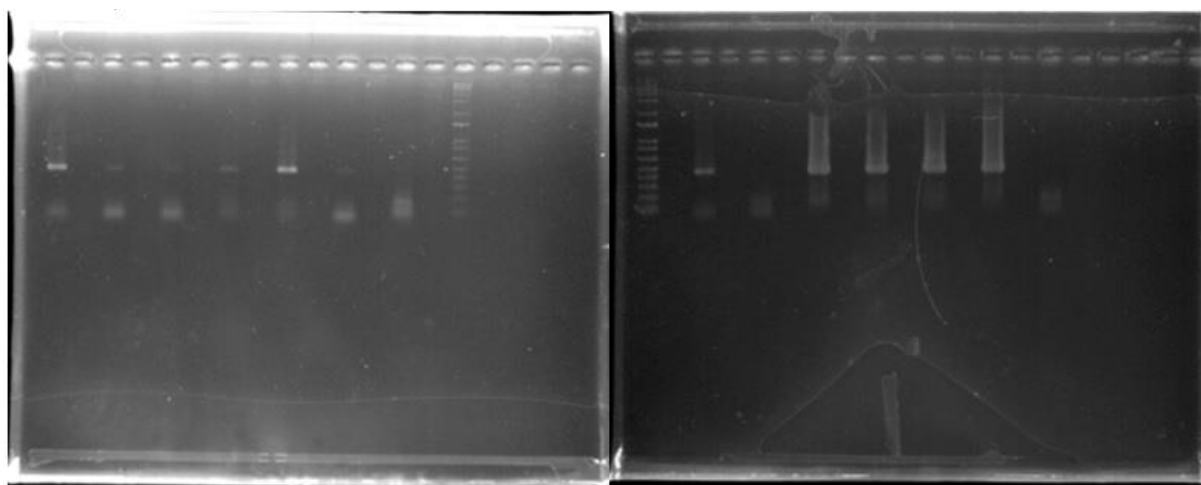
Condição Sanitária	0,65	0,33	0,04	1,97	1,91	1,003 -3,64
---------------------------	------	------	------	------	------	-------------

IC – Intervalo de Confiança/ RC – Razão de chances / C(β): Coeficiente beta

3- Caracterização Molecular de *Babesia caballi*.

Apenas seis amostras apresentaram infecção somente para *B. caballi*. Todas foram submetidas à nested PCR (**Figura 6**) objetivando posterior análise filogenética. No entanto, os resultados do sequenciamento não apresentaram qualidade adequada e, portanto, não foram depositados no GenBank. Os resultados podem justificar-se pela baixa parasitemia encontrada em animais portadores crônicos de regiões endêmicas.

Figura 6: Nested PCR, gel amplificação de sequências do gene rap-1 de *Babesia caballi*.



4- Análise filogenética de *Theileria equi*

As novas sequências do gene 18S rRNA de *T. equi* obtidas neste estudo foram depositadas no GenBank sob os seguintes números de acesso: PP249538, PP249539, PP249540, PP249541, PP249542, PP249543, PP249544 e PP249545, distribuídas conforme **Tabela 5**.

Tabela 5: Identificação das amostras com respectiva identificação do GenBank e regiões administrativas

ID da Amostra	Região	Tamanho (bp)	ID GenBank
DF30	Candangolândia	1568	PP249538
DF50	Gama	1565	PP249539
DF54	Plano Piloto	1561	PP249540
DF120	Sobradinho I	1558	PP249541
DF145	Planaltina	1266	PP249542
DF246	Santa Maria	1473	PP249543
DF293	SCIA	1504	PP249544
DF306	Ceilândia	1508	PP249545

Este estudo identificou clados monofiléticos com uma divergência evolutiva de 2% entre eles, apoiados por valores de probabilidade posterior alta, indicando genótipos distintos.

A árvore filogenética reconstruída a partir das sequências de 18S rRNA de *T. equi* mostrou um grupo distinto separado do grupo externo com um valor de probabilidade posterior de 100%, apoiando os aglomerados (**Figura 7**). As sequências de genes de 18S rRNA de *T. equi* analisadas agruparam-se em quatro clados bem suportados: A, B, C e D. Entre as amostras, foram identificadas oito sequências distintas do gene de 18S rRNA de *T. equi* circulando em cavalos na região do Distrito Federal, Brasil.

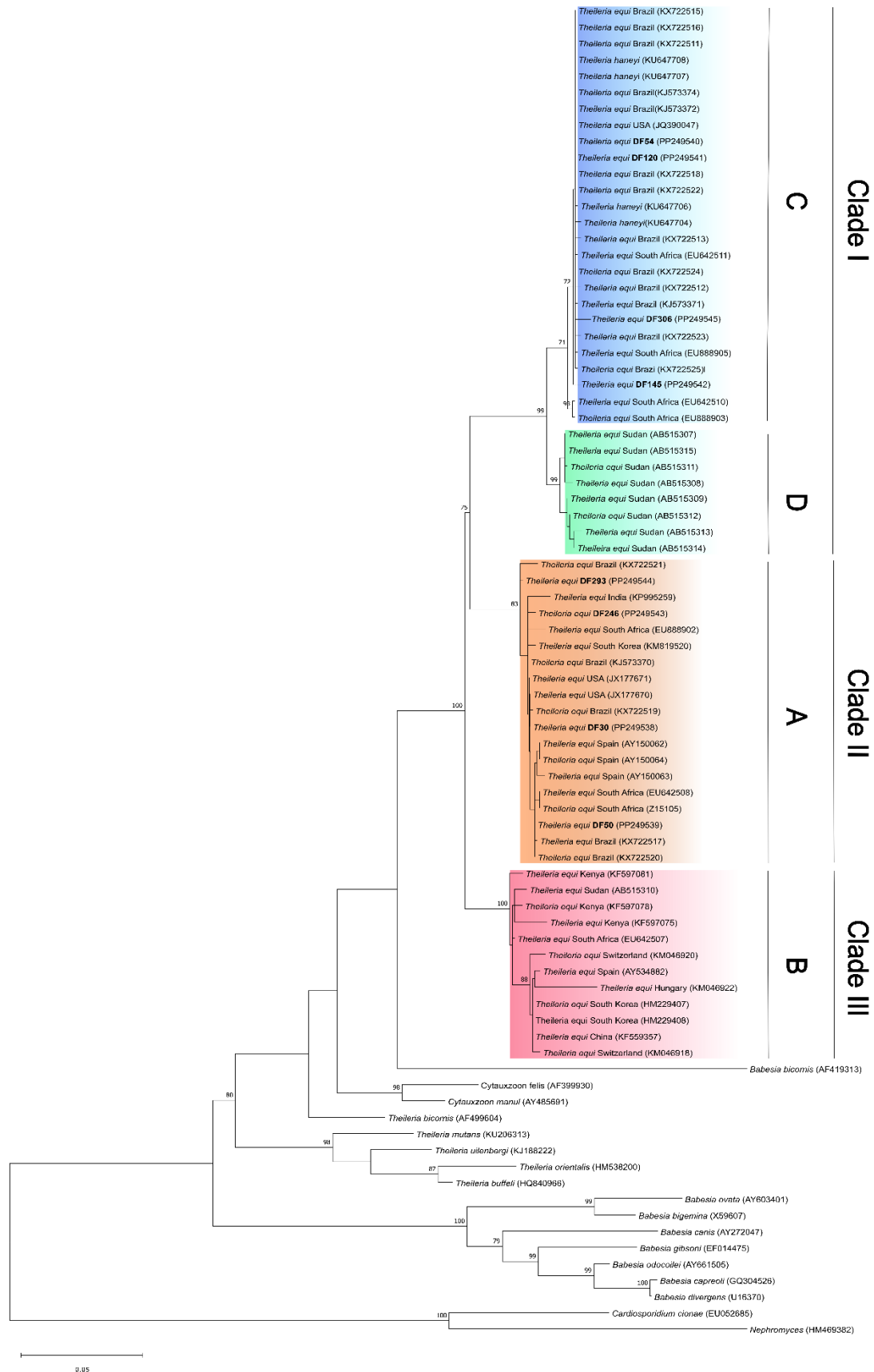
Uma inferência Bayesiana das sequências de 18S rRNA agrupou as amostras em dois principais clados: A e C, com 50% no clado C (DF54, DF120, DF145, DF306) e 50% no clado A (DF30, DF50, DF246, DF293). No clado C, quatro sequências do Distrito Federal agruparam-se com sequências do Brasil, África do Sul e Estados Unidos. No clado A, outras quatro sequências agruparam-se com sequências da África do Sul, Espanha, Brasil, Índia, Coreia do Sul e Estados Unidos. O clado B incluiu sequências do Quênia, Sudão, Hungria, Espanha, Suíça, Coreia do Sul, China e África do Sul, enquanto o clado D apresentou sequências apenas do Sudão.

Os valores de identidade compartilhados por essas sequências variaram de 99,47% (observado em DF306) a 100% (observado em DF30 e DF120). As menores distâncias ($d = 0,007$) foram observadas entre as sequências de DF54, DF120 e DF306. Da mesma forma, no clado C, as distâncias variaram de 0,007 a 0,01 entre todas as sequências observadas. No clado A, a menor distância observada ($d = 0,008$) foi apenas entre as sequências DF30, DF50 e

DF246. A sequência mais distante de todas as amostras era da Hungria (KM046922), com uma distância variando de 0,07 a 0,05 em relação a todas as sequências.

No geral, todas as sequências de *T. equi* agruparam-se em um nó distinto dos Theilerídeos, com organismos de *Cytauxzoon* agrupando-se entre eles e os outros organismos *Theileria*. *Babesia bicornis* parece ser um clado irmão de *T. equi*, com suporte de uma probabilidade posterior de 100% (64%).

Figura 7: Árvore filogenética resultante da análise de sequências do gene 18S rRNA de *Theileria equi* das amostras de equinos naturalmente infectados no Distrito Federal/Brasil.



5- Análise geoespacial

A análise do mapa de Kernel (**Figura 8**) permitiu a visualização de hotspots para a presença de *B. caballi* nos municípios de Gama e Guará apresentando 2 ou mais casos. A presença de *T. equi* também pode ser visualizada no mapa de Kernel com hotspots nos municípios de Guará, Gama, Sobradinho I, Planaltina, Samambaia, Santa Maria, São Sebastião, Paranoá, Candangolândia e Taguatinga apresentando 9 ou mais casos.

A análise de autocorrelação espacial não apresentou significância entre a presença dos hemoprotozoários, *T. equi* e *B. caballi*, e as variáveis epidemiológicas avaliadas neste estudo. Incluindo o uso de ectoparasitocidas, principal método de controle de vetores, conforme apresentado na **Figura 9**.

Figura 8: **A** - Mapa de Kernel indicando áreas de calor relacionadas a presença de *Theileria equi* em cavalos carroceiros no Distrito Federal/DF, Brasil. **B** – Mapa de Kernel indicando áreas de calor relacionadas a presença de *Babesia caballi* em cavalos carroceiros no Distrito Federal/DF, Brasil.

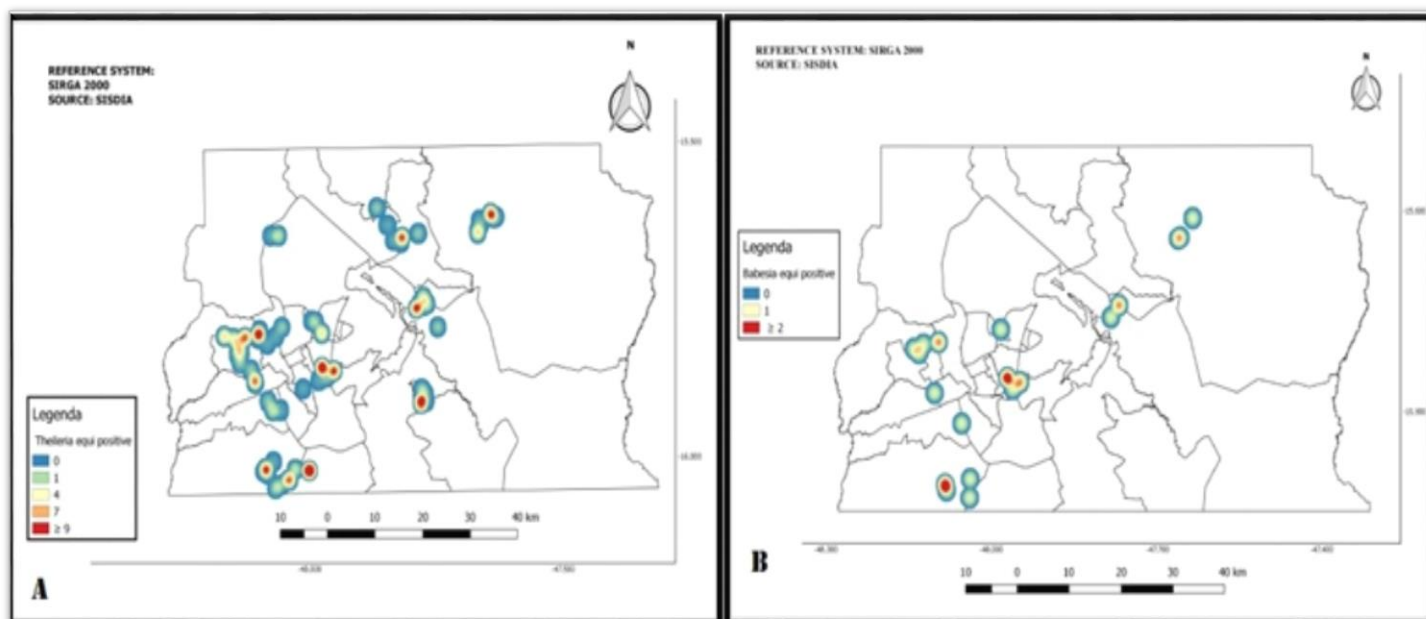
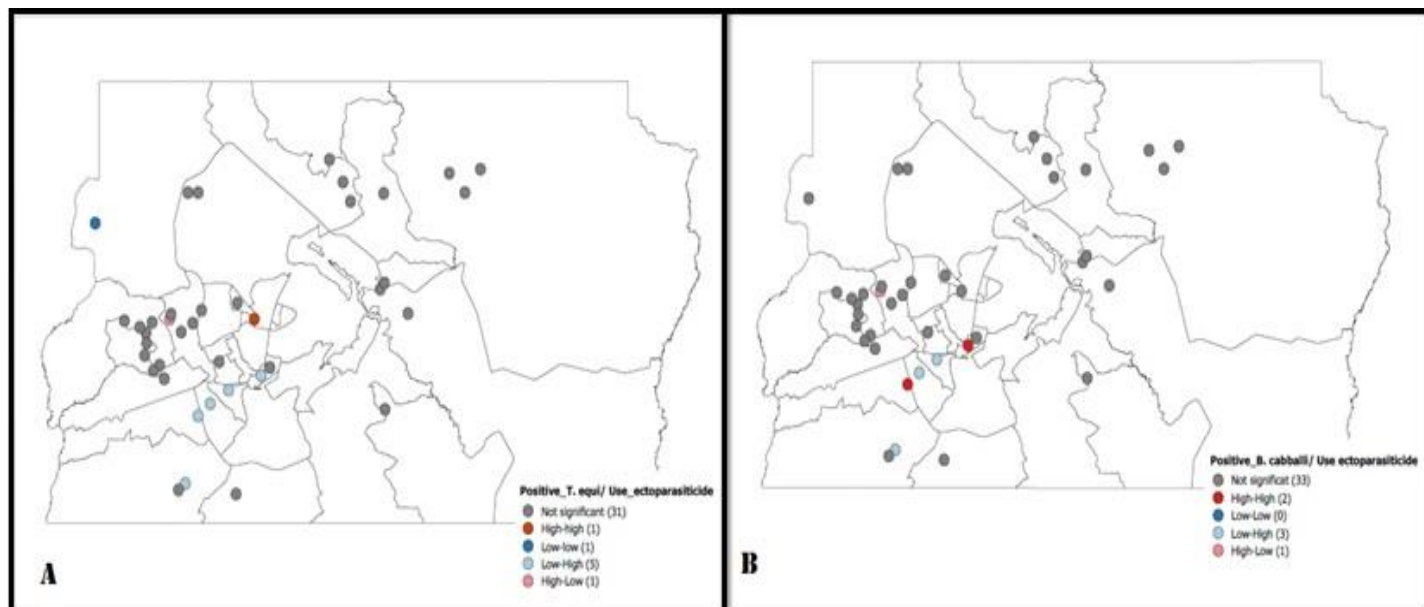


Figura 9: **A**- Mapa de cluster de correlação espacial entre animais positivos para a presença de DNA de *T. equi* e o uso de ectoparasiticidas; **B** - Mapa de cluster de correlação espacial entre animais positivos para a presença de DNA de *B. caballi* e o uso de ectoparasiticidas



DISCUSSÃO

Neste estudo, utilizando a qPCR como método de investigação epidemiológica, foi possível constatar uma elevada prevalência de animais positivos para PE (56,23%), nas 21 regiões administrativas avaliadas no Distrito Federal. No entanto, essa prevalência é baseada exclusivamente na detecção de *Theileria equi* e *Babesia caballi* e pode ser subestimada, uma vez que o presente estudo não detectou *Theileria haneyi*.

Heim et al. (2007), utilizando a qPCR, reportaram uma prevalência de 59,7% para *T. equi* e 12,5% para *B. caballi* a partir de amostras de diferentes regiões consideradas endêmicas no Brasil, enquanto Nogueira et al. (2017) demonstraram 13,40% e 3,09% de amostras positivas para *T. equi* e *B. caballi*, respectivamente, em análises moleculares realizadas em cavalos no estado do Maranhão, Brasil. A partir de detecção molecular, Schein et al. (2018) descreveram uma prevalência de 2,74% e 25,91% para *B. caballi* e *T. equi*, respectivamente, no Estado do Mato Grosso no Brasil. Campos (2015), avaliando equinos de uso militar nas regiões Sudeste e Sul do Brasil, evidenciou a presença de DNA de *T. equi* em 49,37% das amostras enquanto apenas 0,21% das amostras foram positivas para *B. caballi*. A alta frequência de *T. equi* em contraponto com a baixa circulação de *B. caballi* na área estudada, está de acordo com estudos

moleculares realizados nas demais regiões do país e do mundo, e confirmam a circulação dos hemoprotozoários na região do Distrito Federal, reforçando o caráter endêmico da patologia no Brasil. A menor taxa de infecção por *B. caballi* deve-se provavelmente à sua baixa parasitemia e a eliminação natural dos parasitos no animal hospedeiro, em contraponto à infecção persistente de *T. equi* ao longo da vida que pode induzir a taxas de infecções mais elevadas (Ahedor et al., 2023). As variações na frequência dos hemoprotozoários investigados podem ser consequência na competência dos vetores presentes em cada região, na possível presença de outros fatores associados a infecção, nos métodos de amostragem, no número de amostras de animais ou nas diferenças de sensibilidade das técnicas moleculares empregadas (Santos et al., 2011; Peixoto, 2017).

De acordo com a análise bivariada, o contato com capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) demonstrou ser um fator epidemiológico determinante para a positividade da PE. Capivaras são animais da fauna silvestre nacional que apresentam grande infestação de carrapatos, particularmente do gênero *Amblyomma* e podem compartilhar espécies de carrapatos com os equinos (Perez et al., 2008).

Mamíferos silvestres nativos, como capivaras e antas, são considerados os principais hospedeiros naturais para *A. sculptum* (complexo *Amblyomma cajennense*) (Aragão, 1936; Labruna, 2009; Ramírez-Hernández et al., 2020).

No entanto, no Brasil, a espécie *Dermacentor nitens* é indicada como o principal vetor de *B. caballi* (Anthony, 1963; Pfeifer Barbosa et al., 1995; Mujica, 2002; Roby, Scoles, Ueti, 2015), enquanto *Rhipicephalus microplus* é a única espécie com competência vetorial comprovada para a transmissão de *T. equi* (Guimarães et al., 1997; Guimarães et al., 1998; Ueti et al., 2005; Ueti et al., 2008; Peckle et al., 2022). Porém, o fato de ser um carrapato monóxeno e os equinos serem parasitos alternativos tornam essa espécie em um vetor duvidoso na cadeia epidemiológica da theileriose equina (Heuchert et al., 1999; Labruna et al., 2001; Kerber et al., 2009; Santos et al., 2011). Não obstante, apesar de o principal vetor de *T. equi* em equinos no Brasil ainda não ter sido determinado, estudos epidemiológicos sugerem que *Amblyomma sculptum* (anteriormente denominado *A. cajennense*) poderia ser o vetor de *T. equi* em equinos no país (Kerber et al., 2009; Scoles et al., 2011; Peckle et al., 2013; Wise et al., 2013).

Criado-Fornelio et al. (2009) detectaram um piroplasmídeo (ordem Piroplasmida) em uma capivara do sul do Brasil que compartilhava 90% de identidade com *Theileria equi*. Entretanto, os achados do presente experimento aliados a ausência de estudos com a espécie em questão determinam a necessidade de pesquisas adicionais sobre epizootiologia molecular

de babesídeos e theilerídeo em áreas onde os mamíferos domésticos sul-americanos compartilham habitat com animais silvestres peridomicilados como as capivaras. A vida selvagem constitui um reservatório grande e muitas vezes desconhecido de hematozoários que infectam o homem e os animais domésticos (Buling et al., 2007). Estudos como o de Souza Gonçalves et al. (2020) e Silveira et al. (2017) que demonstraram a infecção natural por *T. equi* em antas (*Tapirus terrestres*) no Brasil e de Sousa et al. (2018) que também indicaram a presença de roedores e outros pequenos mamíferos infectados naturalmente por *T. equi*, além de cachorros do mato (*Cerdocyon thous*) naturalmente infectados por *B. caballi* na região do Pantanal brasileiro, demonstram a participação de potenciais reservatórios silvestres e enfatizam a necessidade de mais pesquisas ao mesmo tempo que levantam preocupações quanto a especificidade do hospedeiro (Onyiche et al., 2019).

A análise multivariada confirma a associação dos fatores idade e condição sanitária. Ainda que o fator contato com capivara não tenha apresentado associação significativa demonstrou valores marginais de *p-valor* com resultados próximos aos valores de cortes estatísticos adotados.

A idade superior ou igual a 5 anos infere na positividade dos equinos para piroplasmose equina. Em áreas endêmicas, os anticorpos maternos para *T. equi* passados via colostro protegem transitoriamente os potros jovens de infecções até os seus 2 anos de idade na maioria dos casos, entretanto, informações quanto a imunidade protetora contra *B. caballi* ainda carecem de maiores informações (de Waal, 1992; Wise et al., 2013; Kumar et al., 2018; Onyiche et al., 2020). Ainda, de acordo com Sevinc et al. (2018) Essa taxa de positividade aumentada entre cavalos mais velhos provavelmente está relacionada a um tempo de exposição mais longo aos vetores ao longo da vida do animal, pois os cavalos mais velhos passaram por um maior número de estações de carrapatos. Estudos apontam a idade dos animais como um fator epidemiológico diretamente associado a positividade da piroplasmose equina, onde animais com idade > 5 anos apresentaram prevalência ligeiramente maior quando comparados com animais de idade < 5 anos (Camino et al., 2018; Onyiche et al., 2020; Nadal et al., 2022), corroborando com os resultados apresentados no presente estudo.

O modelo preditivo também indicou uma associação com a condição sanitária. Animais imunocomprometidos têm mostrado ser mais suscetíveis à infecção em comparação com seus homólogos imunocompetentes (Lagried et al., 1988; Hodgson, 2002). Práticas de manejo inadequadas, nutrição desequilibrada, trabalho excessivo, entre outros fatores, podem reduzir o nível de imunidade dos equídeos (Sumbria et al., 2016; Singla; Sumbria, 2019). Em um estudo

realizado por Garcia-Bocanegra et al. (2013), rebanhos sem programas de vacinação contra outras doenças apresentaram soroprevalência significativamente maior para piroplasmídeos em comparação com rebanhos onde os animais eram vacinados anualmente, indicando o efeito imunossupressor de outras doenças em animais não vacinados como um dos fatores associados à diferença observada. Animais com sistemas imunológicos comprometidos mostraram ser mais vulneráveis a infecções (Sevinc et al., 2008). Além disso, sistemas imunológicos comprometidos podem estar associados a uma maior infestação por carrapatos (Campos et al., 2019).

Na análise filogenética, foi possível observar diferenças genéticas entre os genes 18S rRNA das amostras obtidas de animais naturalmente infectados na região do Distrito Federal e amostras de outros países.

A posição filogenética exata de *T. equi* tem sido contestada desde sua primeira descrição por Laveran (1901). Técnicas moleculares modernas levaram vários autores a documentar um grau notavelmente alto de polimorfismo genético intraespecífico nos loci do rRNA 18S SSU, que geralmente são altamente conservados (Nagore et al., 2004; Bhoora et al., 2009; Liu et al., 2016; Knowles et al., 2018). Bhoora et al. (2009), após análise cladística baseada em sequências do gene 18S rRNA, revelaram três clados (A - C) de *T. equi* em seus achados na África do Sul. Salim et al. (2010) identificaram um quarto grupo (D) ao avaliar sequências do gene 18S rRNA de *T. equi* no Sudão. Outros autores, como Qablan et al. (2013), agruparam seu conjunto de dados do gene 18S rRNA de *T. equi* em cinco grupos denominados A a E. Mais tarde, novos estudos como os de Alanazi et al. (2014) e Coultous et al. (2020) propuseram uma classificação em quatro grupos (A - D), onde o grupo E faz parte do grupo B.

Recentemente, Nehra et al. (2024) classificaram os genótipos com base nas sequências nucleotídicas da região hipervariável V4 do gene 18S rRNA, concluindo que os genótipos/clados B de Nagore et al. (2004) e E de Qablan et al. (2013) formaram um único genótipo B, classificando assim os genótipos em quatro: A, B, C e D. No entanto, informações adicionais são necessárias para fazer uma classificação adequada para esse parasita (Wang et al., 2019).

O presente estudo relata dois genótipos de *T. equi* (A e C) circulando em animais naturalmente infectados do Distrito Federal, de acordo com a classificação proposta por Alanazi et al. (2014) e Coultous et al. (2020).

Em um estudo realizado na África do Sul por Bhoora et al. (2020), os genótipos B e D foram os genótipos predominantes identificados em zebras, enquanto cavalos foram

predominantemente infectados com os genótipos A e C de *T. equi*. Da mesma forma, Coultous et al. (2020), avaliando cavalos na Gâmbia, indicaram a prevalência dos genótipos A e C.

No Brasil, ainda há poucos estudos filogenéticos caracterizando *T. equi*. No entanto, de acordo com os achados de Vitari et al. (2019), que avaliaram cavalos em todas as regiões do país, há a circulação dos genótipos A e C. Além disso, Peckle et al. (2018), estudando a caracterização molecular de *T. equi* em cavalos no Estado do Rio de Janeiro, também observaram a presença dos genótipos A e C, corroborando os resultados do presente estudo.

A análise filogenética baseada no gene 18S rRNA de isolados de *T. equi* das amostras do Distrito Federal mostrou uma divergência clara e distinta entre os isolados, indicando que dois genótipos diferentes estão dispersos por todo o território nacional, infectando naturalmente cavalos brasileiros.

Os genes do rRNA 18S têm sido apontados como alvos adequados para auxiliar na identificação de piroplasmas devido à sua baixa taxa de substituição, função restrita e conservada, e ocorrência em múltiplas cópias (Katzner et al., 1998; Chae et al., 1999; Van de Peer et al., 2000; Qablan et al., 2013). No entanto, com a recente descoberta de uma nova espécie de *Theileria* parasitando cavalos, a *Theileria haneyi*, este alvo molecular não pode distinguir entre estas espécies de *Theileria*, pois a *T. haneyi* agrupa-se dentro do genótipo C de *T. equi*.

Ao todo quatro amostras do presente estudo foram classificadas no clado C, o mesmo clado que *T. haneyi*. No entanto, como não é possível utilizar a variação na sequência do gene rRNA 18S sozinha para classificar organismos como espécies diferentes (Chae et al., 1999), há necessidade de estudos adicionais para identificar a possível circulação de *T. haneyi* no plantel brasileiro.

O baixo número de amostras no sequenciamento pode ser justificado pela dificuldade de amplificação devido à baixa parasitemia apresentada em áreas endêmicas e em portadores crônicos.

Por fim, os resultados confirmam a presença de *T. equi* e *B. caballi* nos rebanhos do Distrito Federal, além de indicar a presença de pelo menos dois genótipos distintos (A e C) em animais naturalmente infectados na região, confirmando o status endêmico da PE no Brasil e a heterogeneidade de *T. equi* circulante no país. No entanto, estudos adicionais fazem-se necessários para identificar a possível circulação de *T. haneyi* no plantel brasileiro.

Um achado relativamente curioso, foi a ausência de correlação entre animais portadores de *T. equi* e *B. caballi* e o uso de ectoparasiticidas. De acordo com Kerber et al. (1999), ao

avaliar plantéis pelo Brasil, uma taxa de prevalência significativamente mais baixa ocorreu nas fazendas onde foram estabelecidas medidas para controlar a população de carrapatos. Entretanto, os animais do grupo de estudo incluíam animais carroceiros utilizados em atividades de subsistência, que por muitas vezes não tem acesso aos cuidados apropriados para o controle de ectoparasitoides. Para tanto, os resultados apresentados neste estudo, corroboram com a afirmação de Tirosh-Levy et al. (2020) de que o uso estratégico de acaricidas é recomendado para reduzir, mas não eliminar a exposição a carrapatos. Portanto, o controle dos vetores deve incluir outras medidas tais como a vigilância da presença de carrapatos e redução da vegetação (USDA, 2012).

Os resultados da análise geoestatística, onde constatou-se que não houve associação espacial significativa entre a presença de *T. equi* e o uso de ectoparasitoides (Índice de Moran = -0,12), bem como não houve associação entre a presença de *B. caballi* e o uso destes produtos (Índice de Moran = 0,11), conforme indicados na **Figura 9**, reforçam os dados encontrados na avaliação estatística.

Ressalta-se que para o controle adequado, o reconhecimento dos requisitos biológicos específicos de cada espécie, seu ciclo e seus hospedeiros devem ser compreendidos, entretanto, até o presente momento, ainda faltam esclarecimentos quanto aos principais vetores envolvidos na transmissão e distribuição de *T. equi* no Brasil (Fernandes, 2007; Sumbria; Singla, 2015).

A variável “acesso a pastagem” também não apresentou correlação com a presença dos agentes etiológicos da PE. Entretanto, estudos como o de Guidi et al., (2015) e Moretti et al. (2010) indicaram o acesso a pastagens como um potencial fator de risco para a infecção da piroplasmose em equinos. Todavia, destaca-se que fatores ambientais como umidade relativa do ar, composição de solo, temperatura, a dinâmica sazonal, dentre outros podem afetar a presença de vetores competentes (Kerber et al., 2009; Tirosh-Levy et al., 2018).

Ressalta-se que o presente estudo foi realizado com animais carroceiros, em sua maioria utilizados como meio de trabalho e subsistência, e sendo assim, expostos a ambientes adversos. Em sua grande maioria, esses animais apresentavam históricos de infestação por carrapatos, com as espécies *Amblyomma sculptum* e *Dermacentor nitens*. Para tanto, os dados coletados, não apresentariam diferença estatística, uma vez que não apresentavam diferenças entre animais positivos e negativos, pois todo conjunto amostral estava sujeito a presença de carrapatos. Estes animais também apresentavam manifestações clínicas diversas que, por muitas vezes, não estariam associadas a PE e sim a um manejo inadequado, pois os mesmos, em grande parte, sequer obtiveram qualquer tipo de atendimento médico veterinário especializado.

CONCLUSÕES

Este é o primeiro trabalho que utiliza ferramentas moleculares para avaliar a prevalência, a distribuição espacial, a diversidade genética e a epidemiologia da piroplasmose equina no Distrito Federal/ Brasil. Os resultados indicam a elevada prevalência (56,23 %) da PE no Distrito Federal, corroborando com estudos prévios quanto ao status endêmico da patologia no país. A proporção de animais positivos para *T. equi* é significativamente superior aos animais positivos para *B. caballi*. Os fatores determinantes da positividade da PE em equinos no Distrito Federal são: idade maior ou igual a 5 anos, contato com capivara e condição sanitária. A caracterização molecular dos isolados de *T. equi* revelou a presença de dois genótipos, A e C, circulando na região, em consonância com os achados de outras regiões do Brasil. Estes resultados evidenciam a natureza endêmica da PE no Brasil e enfatizam a importância de vigilância contínua e medidas de controle para mitigar o impacto desses hemoprotozoários parasitas na saúde equina. Pesquisas adicionais são necessárias para explorar a possível circulação de *T. haneyi* no plantel nacional e para aprimorar nossa compreensão da epidemiologia da PE na região.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADELMAN, M.; CAMPHORA, A. L. Crioulos e crioulistas. In: **Horse Breeds and Human Society: Purity, Identity and the Making of the Modern Horse**. Nova Iorque: Taylor e Francis Group, 2020.
- AHEDOR, B.; SIVAKUMAR, T.; VALINOTTI, M. F. R.; OTGONSUREN, D.; YOKOYAMA, N.; ACOSTA, T. J. PCR detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in apparently healthy horses in Paraguay. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 39, 2023.
- AKKOYUN, Z.; OGUZ, B. Seroprevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses of Mus Province, Turkey. **Alexandria Journal for Veterinary Sciences**, v. 60, n. 1, 2019.
- ALANAZI, A.D., SAID, A.E., MORIN-ADELINE, V., ALYOUSIF, M.S., ŠLAPETA, J. Quantitative PCR detection of *Theileria equi* using laboratory workflows to detect asymptomatic persistently infected horses. **Veterinary parasitology** 206, 138-145. 2014.
- ALHASSAN, A.; THEKISOE, O. M.; YOKOYAMA, N.; INOUE, N.; MOTLOANG, M. Y.; MBATI, P. A.; IGARASHI, I. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for diagnosis of equine piroplasmosis. **Veterinary parasitology**, v. 143, n. 2, p. 155-160, 2007.
- ALI, S.; SUGIMOTO, C.; ONUMA, M. Equine piroplasmosis. **Journal of equine Science**, v. 7, n. 4, p. 67-77, 1996.
- ALSARHAN, Q. T. S. **Prevalence, risk factors and genetic diversity of equine piroplasmosis in Kelantan, Malaysia**. 2017. 370f. Tese - Faculty of Veterinary Medicine, Universiti Malaysia, Kelantan, 2017.
- ALLAIRE, J. RStudio: integrated development environment for R. Boston, MA, 770, 165-171, 2012.
- ALLSOPP, M.T.E.P.; ALLSOPP, B.A. Molecular Sequence Evidence for the Reclassification of Some *Babesia* Species. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1081, p. 509–517, 2006.
- ALLSOPP M. T.; LEWIS B.D.; PENZHORN B.L. Molecular evidence for transplacental transmission of *Theileria equi* from carrier mares to their apparently healthy foals. **Vet Parasitol**, v. 148, p. 130–136, 2007.
- ARAGÃO, H. B. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrophes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 31, p. 759-843, 1936.
- AZIZ, K. J.; AL-BARWARY, L. T. O. Epidemiological study of equine piroplasmosis (*Theileria equi* and *Babesia caballi*) by microscopic examination and competitive-ELISA in Erbil Province North-Iraq. **Iranian Journal of parasitology**, v. 14, n. 3, p. 404, 2019.

BALKAYA, I.; UTUK, A. E.; & PISKIN, F. C.. Prevalance of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in donkeys from Eastern Turkey in winter season. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 30, n. 4, p. 245-246, 2010.

BARROSO, G. **História militar do Brasil**. Brasileira: Companhia Editora Nacional, 1938.

BATIHA, G. E. S.; BESHBIHY, A. M.; TAYEBWA, D. S.; ADEYEMI, O. S.; SHAHEEN, H.; YOKOYAMA, N.; IGARASHI, I. The effects of trans-chalcone and chalcone 4 hydrate on the growth of *Babesia* and *Theileria*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 5, 2019a.

BATIHA, G. E-S; BESHBIHY, A. M.; TAYEBWA, D.S.; SHAHEEN, M. H.; YOKOYAMA, N.; IGARASHI, I. Inhibitory effects of *Syzygium aromaticum* and *Camellia sinensis* methanolic extracts on the growth of *Babesia* and *Theileria* parasites. **Ticks Tick Borne Dis.**, v. 10, p. 949–58, 2019b.

BATTSETSEG, B.; XUAN, X.; IKADAI, H.; JOSE, R.B.L.; BYAMBAA, B.; BOLDBAATAR, D.; BATTUR, B.; BATTSETSEG, G.; BATSUKH, Z.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; MIKAMI, T.; FUJISAKI, K. Detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in the *Dermacentor nuttalli* adult tick. **International Journal for Parasitology**, v.31, p.384–386, 2001.

BESHBIHY, A. M.; BATIHA, G. E-S.; YOKOYAMA, N.; IGARASHI, I. Ellagic acid microspheres restrict the growth of *Babesia* and *Theileria* in vitro and *Babesia microti* in vivo. **Parasit Vectors**, v. 12, 2019a.

BESHBIHY, A. M.; BATIHA, G. E-S.; ADEYEMI, O. S.; YOKOYAMA, N.; IGARASHI, I. Inhibitory effects of methanolic *Olea europaea* and acetonetic *Acacia laeta* on growth of *Babesia* and *Theileria*. **Asia Pac J Trop Med.**, v. 12, p. 425–34. 2019b.

BHOORA, R., FRANSSSEN, L., OOSTHUIZEN, M.C., GUTHRIE, A.J., ZWEYGARTH, E., PENZHORN, B.L., JONGEJAN, F., COLLINS, N.E. Sequence heterogeneity in the 18S rRNA gene within *Theileria equi* and *Babesia caballi* from horses in South Africa. **Vet. Parasitol.**, v. 159, p. 112–120, 2009.

BHOORA, R.; QUAN, M.; FRANSSSEN, L.; BUTLER, C.M.; VAN DER KOLK, J.H.; GUTHRIE, A.J.; ZWEYGARTH, E.; JONGEJAN, F.; COLLINS, N.E. Development and evaluation of real-time PCR assays for the quantitative detection of *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses from South Africa. **Veterinary Parasitology**, v. 168, n. 3-4, p. 201–211, 2010a.

BHOORA, R.; QUAN, M.; ZWEYGARTH, E.; GUTHRIE, A.J.; PRINSLOO, S.A.; COLLINS, N.E. Sequence heterogeneity in the gene encoding the rhoptry-associated protein-1 (RAP-1) of *Babesia caballi* isolates from South Africa. **Veterinary Parasitology**, v. 169, n. 3-4, p. 279–288, 2010b.

BHOORA, R.V., COLLINS, N.E., SCHNITTGER, L., TROSKIE, C., MARUMO, R., LABUSCHAGNE, K., MBIZENI, S. Molecular genotyping and epidemiology of equine piroplasmids in South Africa. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 11, p. 101358, 2020.

BISHOP, R.; KAPPEMEYER, L. S.; ONZERE, C. K.; ODONGO, D. O.; GITHAKA, N.; SEARS, K. P.; FRY, L. M. Equid infective *Theileria* cluster in distinct 18S rRNA gene clades comprising multiple taxa with unusually broad mammalian host ranges. **Parasites & vectors**, v. 13, n. 1, p. 1-7, 2020.

BOLDBAATAR, D.; XUAN, X.; BATTSETSEG, B.; IGARASHI, I.; BATTUR, B.; BATSUKH, Z.; FUJISAKI, K. Epidemiological study of equine piroplasmosis in Mongolia. **Veterinary Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 29-32, 2005.

BONADIMANN, S.; CORDEIRO, M.; BAUTISTA, J. L.; SILVA, J.; NICOLINO, R.; FONSECA, A.; LOPES, L. Serological and molecular detection of *Theileria equi* in horses from Sinop, Mato Grosso state, Brazil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.28, n. 3, 2021.

BORGES, L.; LEITE, R. Ixodid populations of the ears of equines in Minas Gerais and Bahia, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, n. 1, p. 87-89, 1998.

BOSCATTI, A. P.; ADELMAN, M. **De cavalos e homens: história, poder, estratégias e representações. Estudos de Sociologia**, v. 25, n. 49, 2020.

BOWHILL, T. Equine Piroplasmosis, or “Biliary Fever”. **Epidemiology & Infection**, v. 5, n. 1, p. 7-17, 1905.

BRAGA, M.D.; COSTA, F. N.; GOMES, D. R. M.; XAVIER, D. R.; ANDRÉ, M. R.; GONÇALVES, L. R.; MACHADO, R. Z. Genetic diversity of piroplasmids species in equids from island of São Luís, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, p. 331-339. 2017.

BRUNING, A. Equine piroplasmosis: an update on diagnosis, treatment and prevention. **British Veterinary Journal**, v. 152, n. 2, p. 139-151, 1996.

BULING, A.; CRIADO-FORNELIO, A.; RUAS, J.; WENDT, L. W.; DA ROSA-FARIAS, N. A.; PINHEIRO, M. S.; DOMINGUEZ-PENAFIEL, G. The role of wild mammals as reservoir hosts of *Babesia* and *Theileria*. **PARASSITOLOGIA**, v. 49, n. 79, 2007.

BURSZTYN, M. **Da utopia à exclusão: vivendo nas ruas em Brasília**. Brasília: Codeplan, 1997.

BUTLER, C.M.; NIJHOF, A.M.; VAN DER KOLK, J.H.; DE HASETH, O.B.; TAOUFIK, A.; JONGEJAN, F.; HOUWERS, D.J. Repeated high dose imidocarb dipropionate treatment did not eliminate *Babesia caballi* from naturally infected horses as determined by PCR-reverse line blot hybridization. **Vet. Parasitol.**, v. 151, p. 320–322, 2008.

CAMINO, E.; DE LA CRUZ, M. L.; DOMINGUEZ, L.; CARVAJAL, K. A.; FORES, P.; DE JUAN, L.; CRUZ-LOPEZ, F. Epidemiological situation of the exposure to agents causing equine piroplasmosis in Spanish purebred horses in Spain: Seroprevalence and associated risk factors. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 67, p. 81-86, 2018.

CAMINO, E.; DORREGO, A.; CARVAJAL, K. A.; BUENDIA-ANDRES, A.; DE JUAN, L.; DOMINGUEZ, L.; CRUZ-LOPEZ, F. (2019). Serological, molecular and hematological

diagnosis in horses with clinical suspicion of equine piroplasmosis: Pooling strengths. **Veterinary parasitology**, v, 275, 2019.

CAMPORA, A. L. **Animais e sociedade no Brasil dos séculos XVI a XIX**. Rio de Janeiro: Abramvet/Camphora, 2017.

CAMPOS, C. H. C. **Aspectos epidemiológicos de *Theileria equi*, *Babesia caballi* e *Borrelia spp.* em equinos de uso militar das regiões Sudeste e Sul do Brasil**. 2015. 108p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

CAMPOS, J.B., ANDRÉ, M.R., GONÇALVES, L.R., FRESCHI, C.R., SANTOS, F.M., DE OLIVEIRA, C.E., HERRERA, H.M. Assessment of equine piroplasmids in the Nhecolândia sub-region of Brazilian Pantanal wetland using serological, parasitological, molecular, and hematological approaches. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 10, p. 714-721, 2019.

CARINI, A. Sobre uma piroplasmose equina observada em São Paulo. **Arquivo da Sociedade de Medicina Cirúrgica de São Paulo**, v. 1, n. 1, p. 63-66, 1910.

CHAE, J.S., ALLSOPP, B.A., WAGHELA, S.D., PARK, J.H., KAKUDA, T., SUGIMOTO, C., ALLSOPP, M.T., WAGNER, G.G., HOLMAN, P.J. A study of the systematics of *Theileria* spp based upon small-subunit ribosomal RNA gene sequences. **Parasitol. Res.**, v. 85, p. 877–883, 1999.

COHEN, M. A.; CARLSON, G.; ZINKL, J. Equine Piroplasmosis. In: **Current therapy in equine medicine**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1983.

COSTA, R. O.; MELO, R. P. Nota prévia sobre ocorrência de *Babesia caballi* (NUTTALL, 1912) em *Equus caballus* no Brasil. **Veterinária**, v. 16, p. 74-75, 1963.

COSTA, M. R. T. et al. **A história dos equinos na Amazônia: ênfase ao cavalo marajoara**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). Embrapa Amazônia Oriental, 2008.

COSTA, S. C. L.; FREITAS, J. D. S.; SILVA, A. N. D.; LACERDA, L. C.; CRUZ, R. D. S.; CARVALHO, F. S.; MUNHOZ, A. D. Frequency and factors associated with *Theileria equi*, *Babesia caballi* and *Trypanosoma evansi* in equids from Bahia (Northeast Brazil). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, p. 47-58, 2019.

COULTOUS, R.M., MCDONALD, M., RAFTERY, A.G., SHIELS, B.R., SUTTON, D.G., WEIR, W. Analysis of *Theileria equi* diversity in The Gambia using a novel genotyping method. **Transboundary and Emerging Diseases** v. 67, p. 1213-1221, 2020.

COULTOUS, R. M.; SUTTON, D. G. M.; BODEN, L. A. A risk assessment of equine piroplasmosis entry, exposure and consequences in the UK. **Equine Veterinary Journal**, v. 55, n. 2, p. 282-294, 2023.

CRIADO-FORNELIO, A.; BULING, A.; CASADO, N.; GIMENEZ, C.; RUAS, J.; WENDT, L.; BARBA-CARRETERO, J. Molecular characterization of arthropod-borne hematozoans in

wild mammals from Brazil, Venezuela and Spain. **Acta Parasitologica**, v. 54, n. 3, p. 187-193. 2009.

DAHIYA, R.; SALAR, R. K.; MANDAL, K. D.; KUMAR, R.; TRIPATHI, B. N.; PAL, Y.; KUMAR, S. Risk factor analysis associated with *Theileria equi* infected equines in semi-arid and sub-humid ecological enzootic zones of India. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 12, p. 17-21, 2018.

DAHMANA, H.; AMANZOUGAGHENE, N.; DAVOUST, B.; NORMAND, T.; CARETTE, O.; DEMONCHEAUX, J. P.; MULOT, B.; FABRIZY, B.; SCANDOLA, P.; CHIK, M.; et al. Great diversity of Piroplasmida in Equidae in Africa and Europe, including potential new species. **Vet. Parasitol. Reg. Stud.Rep.**, v. 18, p. 100332, 2019.

DARLING, S. T. Equine piroplasmosis in Panama. **The Journal of Infectious Diseases**, p. 197-202, 1913.

DA SILVEIRA, A. W.; DE OLIVEIRA, G. G.; MENEZES SANTOS, L.; DA SILVA AZUAGA, L. B.; MACEDO COUTINHO, C. R.; ECHEVERRIA, J. T.; IZABEL DE SOUZA, A. Natural infection of the South American tapir (*Tapirus terrestris*) by *Theileria equi*. **Journal of wildlife diseases**, v. 53, n. 2, p. 411-413, 2017.

DENNIG, F. **Unsuccessful attempts at transmission of *Babesia equi* by *Anocentor nitens* and *Amblyomma cajennense***. 1988. 122p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Hannover Veterinary College.

DE SOUSA, K. C. M.; FERNANDES, M. P.; HERRERA, H. M.; FRESCHI, C. R.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Diversity of piroplasmids among wild and domestic mammals and ectoparasites in Pantanal wetland, Brazil. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 9, n. 2, p. 245-253, 2018.

DEL PINO, L. E. B.; MAÑÉS, M. A. Meana. Host and environmental factors as determinants of equine piroplasmosis seroprevalence in Central Spain. **Spanish journal of agricultural research**, v. 18, n. 3, p. 17, 2020.

DE SOUZA GONÇALVES, T.; BARROS, F. D. N. L.; INOUE, L. S.; DE FARIAS, D. M.; DOS SANTOS LIMA, J.; NOBRE, A. V.; SCOFIELD, A. Natural *Theileria equi* infection in captive *Tapirus terrestris* (Perissodactyla: Tapiridae) in the Brazilian Amazon. **Ticks and tick-borne diseases**, v.11, n. 4, 2020.

DE WAAL, T. Equine piroplasmosis: a review. **British Veterinary Journal**, v.148, n.1, p.6–14, 1992.

DE WAAL, D. T.; HEERDEN, J. V. Equine babesiosis. In: JAW, C., THOMSON, G. R., TUSTIN, R. C. (Ed.). **Infectious diseases of livestock with special reference to South Africa**. vol. 1. Cape Town: Oxford University Press, 1994. p. 293-304.

DÍAZ-SÁNCHEZ, A. A.; ROBLEJO-ARIAS, L.; MARRERO-PERERA, R.; CORONA-GONZÁLEZ, B. Piroplasmosis equina. **Revista de Salud Animal**, v. 42, n. 1, 2020.

DORREGO-RODRIGUEZ, A.; CAMINO, E.; GAGO, P.; BUENDIA-ANDRES, A.; ACURIO, K.; GONZALEZ, S.; CRUZ-LOPEZ, F. Haemato-biochemical characterization of equine piroplasmosis asymptomatic carriers and seropositive, real-time PCR negative horses. *Veterinary Parasitology*, 2023.

EMATER. **Informações agropecuárias do Distrito Federal – 2021**. 2022. Disponível em: <<https://emater.df.gov.br/informacoes-agropecuarias-do-distrito-federal/>>. Acessado em: 20 março de 2022.

EL-SABER BATIH; G., MAGDY BESHBIHY; A., STEPHEN ADEYEMI; O., NADWA, E.; RASHWAN, E.; YOKOYAMA, N.; IGARASHI, I. Safety and efficacy of hydroxyurea and eflornithine against most blood parasites *Babesia* and *Theileria*. *PLoS One*, v. 15, n. 2, 2020.

ERBSLOH, J. K. Babesiosis in the newborn foal. *Journal of Reproduction and fertility. Supplement*, n. 23, p. 725-726, 1975.

FAGERLAND, M.W., HOSMER, D.W. Tests for goodness of fit in ordinal logistic regression models. *Journal of Statistical Computation and Simulation*, v. 86, n. 3398-3418, 2016.

FERNANDES, K. R. **Biologia, diagnóstico morfológico e molecular da infecção experimental e natural de *Babesia equi* (Laveran, 1901) em *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887)**. 2007. 59f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ, Seropédica, 2007.

FORRESTER, S.J., HALL, N. The revolution of whole genome sequencing to study parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology* v. 195, n. 77-81, 2014.

FRIEDHOFF, K.T. Transmission of *Babesia*. In: M. Ristic (Editors). **Babesiosis of Domestic Animals and Man**. Boca Raton: CRC Press, 1988, pp. 23-52.

FRIEDHOFF, K. T.; TENTER, A. M.; MULLER, I. Haemoparasites of equines: impact on international trade of horses. *Revue Scientifique et Technique (International office of Epizootics)*, v.9, n.4, p.1187 – 1194, 1990.

FRIEDHOFF, K. T.; SOULE, C. An account on equine babesioses. *Rev Sci Tech*, v. 15, p. 1191–1201, 1996.

GARCIA-BOCANEGRA, I., ARENAS-MONTES, A., HERNANDEZ, E., ADASZEK, L., CARBONERO, A., ALMERIA, S., JAEN-TELLEZ, J.A., GUTIERREZ-PALOMINO, P. AND ARENAS, A. Seroprevalence and risk factors associated with *Babesia caballi* and *Theileria equi* infection in equids. *Vet. J.*, v. 195, p. 172–178, 2013.

GITHAKA, N., KONNAI, S., BISHOP, R., ODONGO, D., LEKOLOOL, I., KARIUKI, E., OHASHI, K. Identification and sequence characterization of novel *Theileria* genotypes from the waterbuck (*Kobus defassa*) in a *Theileria parva*-endemic area in Kenya. *Veterinary parasitology*, v. 202, n. 3-4 , p. 180-193, 2014.

GRAY, J.S. Identity of the causal agents of human babesiosis in Europe. *Int. J. Med. Microbiol.*, v.296, p.131–136. 2006.

GUIDI, E.; PRADIER, S.; LEBERT, I.; LEBLOND. A Piroplasmosis in an endemic área: analysis of the risk factors and their implications in the control of Theileriosis and Babesiosis in horses. **Parasitology Research**, v. 114, p. 71-83, 2015.

GUIMARÃES, A. M.; LIMA, J. D.; RIBEIRO, M. F. B.; CAMARGOS, E. R. S.; BOZZI, I. A. Ultrastructure of sporogoy in *Babesia equi* in salivary glands of adult female *Boophilus microplus* ticks. **Parasitology research**, v. 84, p. 69-74, 1997.

GUIMARÃES, A. M.; LIMA, J. D.; RIBEIRO, M. F. B. Sporogony and experimental transmission of *Babesia equi* by *Boophilus microplus*. **Parasitology Research**, v.84, n.4, p.323-327, 1998.

HADZIAVDIC, K.; LEKANG, K.; LANZEN, A.; JONASSEN, I.; THOMPSON, E.M.; TROEDSSON, C. Characterization of the 18S rRNA Gene for designing Universal Eukaryote Specific Primers. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014.

HARRELL, F.E., 2020. rms: Regression modeling strategies. R package version 6.1.0. <<https://CRAN.R-project.org/package=rms>>. Acessado em: Set. 2023.

HÉBERT, L.; POLLEDO, G.; LECOUTURIER, F.; GIORGI, M.; BECK, C.; LOWENSKI, S.; BECÛ, T. Serological evidence of equine infectious anaemia, West Nile fever, surra and equine piroplasmosis in a herd of horses in northern Argentina. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 24, 2021.

HEIM, A.; PASSOS, L.F.; RIBEIRO, M.F.B.; COSTA-JÚNIOR, L.; BASTOS, C.V.; CABRAL, D.D.; HIRZMANN, J.; PFISTER, K. Detection and molecular characterization of *Babesia caballi* and *Theileria equi* isolates from endemic areas of Brazil. **Parasitology Research**, v. 102, n. 1, p. 63–68, 2007.

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

HIRATO, K.; NINOMIYA, M.; UWANO, Y.; KUTH, T. Studies on the complement fixation reaction for equine piroplasmosis. **Jpn. J. Vet. Sci**, v. 7, p. 197-205, 1945.

HODGSON, J. **Equine exotic disease: a manual for horse owners**. Rural Industries Research and Development Corporation, Kingston, ACT, 2002. Disponível em:<<https://rirdc.infoservices.com.au/downloads/02-054.pdf>>. Acessado em Agosto 2023.

HOLBROOK, A. A.; ANTHONY, D. W.; JOHNSON, A. J. Observations on the development of *Babesia caballi* (Nuttall) in the tropical horse tick *Dermacentor nitens* Neumann. **The Journal of Protozoology**, v. 15, n.2, p. 391-396, 1968.

HOLBROOK, A. A. Biology of equine piroplasmosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 155, p. 453-454, 1969.

HOMER, M.J.; AGUILAR-DELFIN, I.; TELFORD, S.R.; KRAUSE, P.J.; PERSING, D.H. Babesiosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, n.3, p.451-469, 2000.

HORTA, P. P.; FIGUEIREDO, A. S. Nutaliose dos eqüideos em Minas Gerais (A “mijadeira” dos poldrinhos). **Rev Vet Zootec**, v. 4, n. 3, 1914.

HUGHES, W. T.; OZ, H. S. Successful prevention and treatment of babesiosis with atovaquone. **Journal of Infectious Diseases**, v. 172, n. 4, p. 1042-1046, 1995.

IBGE. **Produção Agropecuária. 2023.** Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/equinos/br>>. Acessado em: 10 set. 2023.

IRBY, J. R. Anthrax, screwworms and equine piroplasmosis: Subdued but not eradicated. In: **Proc. Am. Assoc. Equine Practns.** 2002.

JOACHIM, A.; CAVALLERI, J. V.; BERGER, S. Equine anaplasmosis and equine piroplasmosis in Germany, Austria and Switzerland-previously anecdotal, now relevant?. **Schweizer Archiv fur Tierheilkunde**, v. 164, n. 1, p. 35-50, 2022.

KAPPMAYER, L. S.; PERRYMAN, L.E.; HINES, S.A.; BASZLER, T.V.; KATZ, J.B.; HENNAGER, S.G.; KNOWLES, D.P. Detection of Equine Antibodies to *Babesia caballi* by Recombinant *B. caballi* Rhoptry-Associated Protein 1 in a Competitive-Inhibition Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 2285–2290, 1999.

KAPPMAYER, L.S.; THIAGARAJAN, M.; HERNDON, D.R.; RAMSAY, J.D.; CALER, E.; DJIKENG, A.; GILLESPIE, J.J. LAU, A.O.T.; ROALSON, E.H.; SILVA, J.C.; SILVA, M.G.; SUAREZ, C.E.; UETI, M.W.; NENE, V.M.; MEALEY, R.H.; KNOWLES, D.; BRAYTON, K.A. Comparative genomic analysis and phylogenetic position of *Theileria equi*. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 603, 2012.

KATZER F.; MCKELLAR E.; 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. **Mol Biochem Parasitol** v. 95, p. 33–44, 1998.

KERBER, C.E.; FERREIRA, F.; PEREIRA, M.C. Control of equine piroplasmosis in Brazil. **The Onderstepoort journal of veterinary research**, v. 66, n. 2, p. 123–127, 1999.

KERBER, C.E.; LABRUNA, M.B.; FERREIRA, F.; DE WAAL, D.T.; KNOWLES, D.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of equine Piroplasmosis 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.

KIM, C.M.; BLANCO, L.B.C.; ALHASSAN, A.; ISEKI, H.; YOKOYAMA, N.; XUAN, X.; IGARASHI, I. Diagnostic real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria equi* from equine blood samples. **Vet. Parasitol.** v. 151, p.158–163, 2008.

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.

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, 1992.

KNOWLES, D. Equine Babesiosis (piroplasmosis): A problem in the international movement of horses. **British Veterinary Journal**, v. 152, n. 2, p. 123-126, 1996.

KNOWLES, D.P., KAPPMAYER, L.S., HANEY, D., HERNDON, D.R., FRY, L.M., MUNRO, J.B., SILVA, J.C. Discovery of a novel species, *Theileria haneyi* n. sp., infective to equids, highlights exceptional genomic diversity within the genus *Theileria*: Implications for apicomplexan parasite surveillance. **International Journal for Parasitology**, v. 48, p. 679–690, 2018.

KOUAM, M. K.; KANTZOURA, V.; GAJADHAR, A. A.; THEIS, J. H.; PAPADOPOULOS, E.; THEODOROPOULOS, G. Seroprevalence of equine piroplasms and host-related factors associated with infection in Greece. **Veterinary Parasitology**, v. 169, n. 3-4, p. 273-278, 2010.

KUMAR, S.; KUMAR, R.; SUGIMOTO, C. A perspective on *Theileria equi* infections in donkeys. **Japanese Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 4, p. 171-180, 2009.

KUMAR, S., STECHER G., LI M., KNYAZ C., TAMURA K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, p. 1547-1549, 2018.

KUNZ, S. E.; KEMP, D. H. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. **Revue scientifique et technique. (International Office of Epizootics)**, v. 13, n. 4, p. 1249-1286, 1994.

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, n.1, p.1-14, 2001.

LABRUNA, M. B. Ecology of rickettsia in South America. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1166, n. 1, p. 156-166, 2009.

LAGRIED, W.W.; HUSTON, L.J.; BASARABA, R.J.; CRISMAN, M.V. The effect of stress on alveolar macrophage function in the horse: an overview. **Equine Pract.**, v. 10, p. 9-16, 1988. LAVERAN, A. Contribution a l'etude de *Piroplasma equi*. **CR Soc. Biol.**, v. 12, p. 385-388, 1901.

LEWIS, B. D.; PENZHORN, B. L.; VOLKMANN, D. H. Could treatment of pregnant mares prevent abortions due to equine piroplasmosis?: research communication. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 70, n. 2, p. 90-91, 1999.

LINHARES, G. F. C. **Aspectos biológicos e epidemiológicos das babesioses de eqüinos, com ênfase à microrregião de Goiânia, Goiás, Brasil. Itaguaí.** 1994. 105p. (Tese de Doutorado em Medicina Veterinária – Parasitologia Veterinária). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

LIU, Q., MELI, M.L., ZHANG, Y., MEILI, T., STIRN, M., RIOND, B., HOFMANN-LEHMANN, R. Sequence heterogeneity in the 18S rRNA gene in *Theileria equi* from horses presented in Switzerland. **Veterinary parasitology**, v. 221, p. 24-29, 2016.

LOBANOV, V. A.; PECKLE, M.; MASSARD, C. L.; BRAD SCANDRETT, W.; GAJADHAR, A. A. Development and validation of a duplex real-time PCR assay for the diagnosis of equine piroplasmosis. **Parasites & vectors**, v. 11, p. 1-12, 2018.

MACKAY, I. M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. **Clinical microbiology and infection**, v. 10, n. 3, p. 190-212, 2004.

MANS, B. J.; PIENAAR, R.; LATIF, A. A. A review of *Theileria* diagnostics and epidemiology. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 4, n. 1, p. 104-118, 2015.

MAPA. **Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo**. Secretaria de Mobilidade Social, do Produtor Rural e do Cooperativismo Comissão Técnica Permanente de Bem-estar Animal Câmara Setorial de Equideocultura. Brasília: MAPA, 2016.

MARLOW, C. H. B.; BESTER, R. C. Infectious causes of equine reproductive failure. **Infectious diseases of livestock with special reference to southern Africa**. Cape town: Oxford University Press, 1994.

MAURER, F. D. Equine piroplasmosis-another emerging disease. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 141, p. 699-702, 1962.

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

MEDRONHO, R. D. A.; BLOCH, K. V.; LUIZ, R. R.; WERNECK, G. L. **Epidemiologia**, 2^a ed. Editora Atheneu, 2019.

MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein 1998. **Parasitology Research**, v. 84, n. 6, p. 467-475, 1998.

MELO, J. B.; PIRES, D. A. F.; RIBEIRO, M. N.; SANTOS, D. O.; SILVA, H. G. O. Estudo zoológico de remanescentes da raça equina nordestina no município de Floresta, Pernambuco-Brasil. **Actas Iberoamericanas de Conservación Animal**, v.1, p. 71-74, 2011.

MOLTMANN, U. G.; MEHLHORN, H.; SCHEIN, E.; REHBEIN, G.; VOIGT, W. P.; ZWEYGARTH, E. Fine structure of *Babesia equi* Laveran, 1901 within lymphocytes and erythrocytes of horses: an in vivo and in vitro study. **The Journal of parasitology**, v. 69, p. 111-120, 1983.

MORETTI, A.; MANGILI, V.; SALVATORI, R.; MARESCA, C.; SCOCCIA, E.; TORINA, A.; PIETROBELLI, M. Prevalence and diagnosis of *Babesia* and *Theileria* infections in horses in Italy: a preliminary study. **The Veterinary Journal**, v. 184, n. 3, p. 346-350, 2010.

MUJICA, F. F.; PERRONE, T.; FORLANO, M.; CORONADO, A.; MELÉNDEZ, R. D.; BARRIOS, N.; GRANDA, F. Serological prevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in horses of Lara State, Venezuela. **Veterinary Parasitology**, v. 178, n. 1-2, p. 180-183, 2011.

MUJICA, L.F.F. *Babesia caballi* (Nuttall & Strickland, 1912): patogenicia, transmissão e alterações hemocitárias no carrapato *Anocentor nitens* (Neumann, 1897), vetor biológico nas Américas. [s.l.] Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Tese, 2002.

NADAL, C.; BONNET, S. I.; MARSOT, M. 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**, v. 69, n. 5, p. 2474-2498, 2022.

NAGORE, D., GARCÍA-SANMARTÍN, J., GARCÍA-PÉREZ, A.L., JUSTE, R.A., HURTADO, A. Detection and identification of equine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blotting: Epidemiological survey and phylogenetic analysis. **Veterinary Parasitology**, v. 123, p. 41–54, 2004.

NAVA S., BEATI L., LABRUNA M.B., CÁCERES A.G., MANGOLD A.J., GUGLIELMONE A.A. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum*, and *Amblyomma sculptum* (Ixodida: Ixodidae). **Ticks and tick-borne diseases**. v. 5, n. 3, p.252-276, 2014.

NEHRA, A. K., KUMARI, A., MOUDGIL, A. D., VOHRA, S. Revisiting the genotypes of *Theileria equi* based on the V4 hypervariable region of the 18S rRNA gene. **Frontiers in Veterinary Science**. v.11, n. 1303090, 2023.

NOGUEIRA, R. D. M. S.; SILVA, A. B.; SATO, T. P.; SÁ, J. C. D.; SANTOS, A. C. G. D.; AMORIM, E. F.; GAZÊTA, G. S. Molecular and serological detection of *Theileria equi*, *Babesia caballi* and *Anaplasma phagocytophilum* in horses and ticks in Maranhão, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, p. 1416-1422, 2017.

NUGRAHA, A. B.; CAHYANINGSIH, U.; AMROZI, A.; RIDWAN, Y.; AGUNGPRIYONO, S.; TAHER, D. M.; IGARASHI, I. Serological and molecular prevalence of equine piroplasmosis in Western Java, Indonesia. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 14, p. 1-6, 2018.

NUTTALL, G. H. F.; STRICKLAND, C. Die parasiten der pferdepiroplasmose des biliary fever. Zentralbl. Bakteriол. **Mikrobiol. Hyg. B**, v. 56, p. 524-525, 1910.

NUTTALL, G.H.F.; STRICKLAND, C. On the occurrence of two species of parasites in equine “Piroplasmosis” or “Biliary Fever”. **Parasitology**, v. 5, n. 1, p. 5–96, 1912.

ONYICHE, T. E.; SUGANUMA, K.; IGARASHI, I., YOKOYAMA, N.; XUAN, X.; THEKISOE, O. A review on equine piroplasmosis: epidemiology, vector ecology, risk factors, host immunity, diagnosis and control. **International journal of environmental research and public health**, v. 16, n. 10, p. 1736, 2019.

ONYICHE, T. E.; TAOIE, M. O.; MOLEFE, N. I.; BIU, A. A.; LUKA, J.; OMEH, I. J.; THEKISOE, O. Equine piroplasmosis: An insight into global exposure of equids from 1990 to 2019 by systematic review and meta-analysis. **Parasitology**, v. 147, n. 13, p. 1411-1424, 2020.

PASOLINI, M. P.; PAGANO, T. B.; COSTAGLIOLA, A.; BIASE, D. D.; LAMAGNA, B.; AULETTA, L.; PACIELLO, O. Inflammatory myopathy in horses with chronic piroplasmosis. **Veterinary pathology**, v. 55, n. 1, p. 133-143, 2018.

PECKLE, M.; PIRES, M. S.; DOS SANTOS, T. M.; ROIER, E. C.; DA SILVA, C. B.; VILELA, J. A.; MASSARD, C. L. Molecular epidemiology of *Theileria equi* in horses and their association with possible tick vectors in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitology research**, v. 112, p. 2017-2025, 2013.

PECKLE, M., PIRES, M.S., DA SILVA, C.B., DA COSTA, R.L., VITARI, G.L.V., SENRA, M.V.X., MASSARD, C.L. Molecular characterization of *Theileria equi* in horses from the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Ticks and tick-borne diseases** v. 9, n. 349-353, 2018.

PECKLE, M.; SANTOS, H.; PIRES, M., SILVA, C., COSTA, R.; VITARI, G.; MASSARD, C. Dynamics of *Theileria equi* infection in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* during the parasitic phase in a chronically infected horse. **Pathogens**, v. 11; n. 5, p. 525, 2022.

PEIXOTO, M. P. **Equine Piroplasmosis: genetic diversity of *Theileria equi* and *Babesia caballi* of naturally infected horses from the state of Rio de Janeiro and the dynamics of *Theileria equi* infection in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. 2017. 155f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ, Seropédica, 2017.

PEREIRA, M. C.; MASSARD, C. L.; FACCINI, J. L. H.; SIQUEIRA, L. F. G. Variação da sorotitulação ao teste de fixação de complemento para *Babesia equi* e *Babesia caballi* em eqüinos da região serrana do Rio de Janeiro. **Ars Veterinaria**, v. 21, n. 3, p. 338-343, 2005.

PEREZ, C. A.; ALMEIDA, A.F.; ALMEIDA, A.; CARVALHO, V.B.; BALESTRIN, D.C.; GUIMARÃES, M.S.; COSTA, J.C.; RAMOS, L.A.; ARRUDA-SANTOS, A.D.; MÁXIMOESPÍNDOLA, C.P.; BARROS-BATTESTI, D.M. Carrapatos do gênero *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) e suas relações com os hospedeiros em área endêmica para Febre Maculosa no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 4, p.210- 217, 2008.

PFEIFER BARBOSA, I. B.; FRIEDHOFF, K.T.; MASSARD, C.L.; LINHARES, G.F.C. Diagnosis of natural infection with *Babesia caballi* (Nuttall & Strickland, 1910) in horses and *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) in Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v. 15, p. 105–107, 1992.

PFEIFER BARBOSA, I. B.; BOSE, R.; PEYMANN, B.; FRIEDHOFF, K.T. Epidemiological aspects of equine babesioses in a herd of horses in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 58, n. 1-2, p. 1–8, 1995.

PHIPPS, L. P.; OTTER, A. Transplacental transmission of *Theileria equi* in two foals born and reared in the United Kingdom. **The Veterinary Record**, v. 154, n. 13, p. 406-408, 2004.

POSNETT, E. S.; FEHRSEN, J.; DE WAAL, D. T.; AMBROSIO, R. E. Detection of *Babesia equi* in infected horses and carrier animals using a DNA probe. **Veterinary parasitology**, v. 39, n. 1-2, p. 19-32, 1991.

POTGIETER, F. T.; DE WAAL, D. T.; POSNETT, E. S. Transmission and diagnosis of equine babesiosis in South Africa. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 139-142, 1992.

QABLAN, M. A.; SLOBODA, M.; JIRKŮ, M.; OBORNÍK, M.; DWAIRI, S.; AMR, Z. S.; MODRÝ, D. Quest for the piroplasms in camels: identification of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in Jordanian dromedaries by PCR. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 3-4, p. 456-460, 2012.

QABLAN, M.A.; OBORNÍK, M.; PETRŽELKOVÁ, K.J.; SLOBODA, M. Infections by *Babesia caballi* and *Theileria equi* in Jordanian equids: epidemiology and genetic diversity. **Parasitology**, v. 140, n. 9, p. 1096–103, 2013.

QUINTANA NIZOLI, L.; MENDES GÖTZE, M.; RODRIGUES FÉLIX, S.; DA SILVA, S.; NOGUEIRA, W.; EDUARDO, C. Frequency of seropositive equines for *Theileria equi* in the Southern Rio Grande do Sul State, Brazil. **Parasitologia latinoamericana**, v. 63, n. 1-2-3-4, p. 46-50, 2008.

RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, A., UCHOA, F., DE AZEVEDO SERPA, M. C., BINDER, L. C., RODRIGUES, A. C., SZABÓ, M. P., LABRUNA, M. B. Clinical and serological evaluation of capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) successively exposed to an *Amblyomma sculptum*-derived strain of *Rickettsia rickettsii*. **Scientific Reports**, v. 10, n. 924, 2020.

RAMBERSAD, J., C.; 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, n. 2, p. 81-87, 2003.

RAMSAY, J. D.; UETI, M. W.; JOHNSON, W. C.; SCOLES, G. A.; KNOWLES, D. P.; MEALEY, R. H. Lymphocytes and macrophages are infected by *Theileria equi*, but T cells and B cells are not required to establish infection in vivo. **PLoS One**, v. 8, n.10, 2013.

RAPOPORT, A.; AHARONSON-RAZ, K.; BERLIN, D.; TAL, S.; GOTTLIEB, Y.; KLEMENT, E.; STEINMAN, A. Molecular characterization of the *Babesia caballi* rap-1 gene and epidemiological survey in horses in Israel. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 23, p. 115–120, 2014.

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

ROBERTS, L.S.; JANOVY, J. Parasitic Protozoa: Form, Function, and Classification. In:____, **Foundations of Parasitology**, 7 ed., p.42-60. 2005.

ROBY, T.O.; ANTHONY, D.W. Transmission of Equine Piroplasmosis by *Dermacentor nitens* Neumann. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 142, n. 7, 1963.

RONQUIST F, TESLENKO M., VAN DER MARK P., AYRES D.L., DARLING A., HOHNA S., LARGET B., LIU L., SUCHARD M.A., HUELSENBECK J. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, p. 539–542, 2012.

ROTHSCHILD, C. Equine Piroplasmosis. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.33, n.1, p. 497-508, 2013.

ROTHSCHILD, C. M.; KNOWLES, D. P. Equine piroplasmosis. **Equine infectious diseases**, p. 465-473, 2007.

SALIM, B.; BAKHEIT, M.A.; KAMAU, J.; NAKAMURA, I.; SUGIMOTO, C. Nucleotide sequence heterogeneity in the small subunit ribosomal RNA gene within *Theileria equi* from horses in Sudan. **Parasitology Research**, v. 106, n. 2, p. 493–498, 2010.

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v. 74, n. 5463–5467, 1977.

SANT, C.; D'ABADIE, R.; PARGASS, I.; BASU, A. K.; ASGARALI, Z.; CHARLES, R. A.; GEORGES, K. C. Prospective study investigating transplacental transmission of equine piroplasmosis in thoroughbred foals in Trinidad. **Veterinary parasitology**, v. 226, p. 132-137, 2016.

SANT, C., ALLICOCK, O.M., D'ABADIE, R., CHARLES, R.A., GEORGES, K. Phylogenetic analysis of *Theileria equi* and *Babesia caballi* sequences from thoroughbred mares and foals in Trinidad. **Parasitology research**, v. 118, n. 1171-1177, 2019.

SANTOS, T. M. D.; ROIER, E. C. R.; SANTOS, H. A.; PIRES, M. S.; VILELA, J. A. R.; MORAES, L. M. D. B.; 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, p. 235-241, 2011.

SANTOS, S. A.; PAIVA, S.; COMASTRI FILHO, J. A.; RAMOS, A.; JULIANO, R.; NOGUEIRA, M.; PERES, I. Histórico, vivências e desafios do núcleo de conservação do cavalo Pantaneiro. **Revista Científica de Produção Animal**, v.22, n.2, p.67-72, 2020a.

SANTOS, A. C. et al. ***Theileria equi* e piroplasmose equina**. Rio Grande do Sul: Editora Santa Cruz, 2020b.

SCHEIN, E.; REHBEIN, G.; VOIGT, W. P.; ZWEYGARTH, E. *Babesia equi* (Laveran 1901): Development in horses and in lymphocyte culture. **Tropenmedizin und Parasitologie**, v. 32, n. 4, p. 223-227, 1981.

SCHEIN, E. Equine babesiosis. **Babesiosis of domestic animals and man**, v. 197, p. 208, 1988.

SCHEIN, F. B.; MAIA, M. O.; WITTER, R.; MARCILI, A.; CAMARGO, L. M. D.; DUTRA, V.; PACHECO, R. D. C. Molecular survey and genetic diversity of piroplasmids in equids from Midwestern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, p. 464-472, 2018.

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

SCOLES, G. A.; UETI, M. W. Vector Ecology of Equine Piroplasmosis. **Annual Review of Entomology**, v. 60, n. 1, p. 561–580, 2015.

SCHWINT, O.N.; UETI, M.W.; PALMER, G.H.; KAPPMAYER, L.S.; HINES, M.T.; CORDES, R.T.; XUALES, D.P.; SCOLES, G.A. Imidocarb dipropionate clears persistent *Babesia caballi* infection with elimination of transmission potential. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 53, n. 4327–4332, 2009.

SEAB. **Equideocultura**. Departamento de Economia Rural. Paraná: SEAB, 2017.

SELIM, A.; KHATER, H. Seroprevalence and risk factors associated with Equine piroplasmosis in North Egypt. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 73, p. 101549, 2020.

SEO, M. G.; YUN, S. H.; CHOI, S. K.; CHO, G. J.; PARK, Y. S.; KWON, O. D.; KWAK, D. Seroprevalence of equine piroplasms in the Republic of Korea. **Veterinary Parasitology**, v. 179, n. 1-3, p. 224-226, 2011.

SEVINC, F., MADEN, M., KUMAS, C., SEVINC, M., EKICI, O.D., 2008. A comparative study on the prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in horse sub-populations in Turkey. **Veterinary Parasitology** 156,173-117.

SHORT, M. A.; CLARK, C. K.; HARVEY, J. W.; WENZLOW, N.; HAWKINS, I. K.; ALLRED, D. R.; TRAUB-DARGATZ, J. L. Outbreak of equine piroplasmosis in Florida. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 240, n. 5, p. 588-595, 2012.

SINGLA, L.D., SUMBRIA, D. Cutting edge meticulous appraisal of equine piroplasmosis in India and in rest of the. **Indian J. Vet. Med**, v. 39, p.1-10, 2019.

SOUZA, E. A. R. D.; ARAUJO, A. D. C.; PIRES, L. C. S. R.; FRESCHI, C. R.; AZEVEDO, S. S., MACHADO, R. Z.; HORTA, M. C. Detecção sorológica e fatores de riscos para piroplasmose equina na região semiárida de Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.. 28, p. 685-691, 2019.

SUDAN, V.; JAISWAL, A.K.; SRIVASTAVA, A.; SAXENA, A.; SHANKER, D. A rare clinical presentation of transplacental transmission and subsequent abortion by *Babesia (Theileria) equi* in a mare. **J. Parasit. Dis.**, v. 39, p. 336–338, 2015.

SUMBRIA, D.; SINGLA, L. D. Recent Diagnostic and control approaches in Equine piroplasmosis. **Veterinaria**, v. 2, n. 1, p. 1-6, 2015.

SUMBRIA, D., SINGLA, L.D., SHARMA, A. *Theileria equi* and *Babesia caballi* infection of equids in Punjab, India: a serological and molecular survey. **Tropical animal health and production**, v. 48, p. 45-52, 2016.

TAMZALI, Y. Equine piroplasmosis: An updated review. **Equine Veterinary Education**, v. 25, n. 11, p. 590-598, 2013.

TENTER, A. M.; FRIEDHOFF, K. T. Serodiagnosis of experimental and natural *Babesia equi* and *B. caballi* infections. **Veterinary parasitology**, v. 20, n. 1-3, p. 49-61, 1986.

TIROSH-LEVY, S.; GOTTLIEB, Y.; APANASKEVICH, D. A.; MUMCUOGLU, K. Y.; STEINMAN, A. Species distribution and seasonal dynamics of equine tick infestation in two Mediterranean climate niches in Israel. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2018.

TIROSH-LEVY, S.; GOTTLIEB, Y.; FRY, L. M.; KNOWLES, D. P.; STEINMAN, A. Twenty years of equine piroplasmosis research: Global distribution, molecular diagnosis, and phylogeny. **Pathogens**, v. 9, n. 11, p. 926, 2020.

TORRES, A. P.; JARDIM, W. R. **Criação do cavalo e de outros equinos**. São Paulo: Nobel, 1992.

TRAUB-DARGATZ, J.; SHORT, M.; PELZEL, A.; NORMAN, T.; KNOWLES, D. P. Equine piroplasmosis. In **AAEP Proceedings**. 2010.

TURAKI, U. A.; KUMSHA, H.; BIU, A.; BOKKO, P. Prevalence of Piroplasmosis amongst local horses in Northeastern Nigeria. **IOSR J. Agri. Vet. Sci**, v. 4, n. 27, 2014.

TUVSHINTULGA, B.; ABOULAILA, M.; DAVAASUREN, B.; ISHIYAMA, A.; SIVAKUMAR, T.; YOKOYAMA, N.; IGARASHI, I. Clofazimine inhibits the growth of *Babesia* and *Theileria* parasites in vitro and in vivo. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 5, p. 2739-2746, 2016.

UETI, M. W.; PALMER, G. H.; KAPPMAYER, L. S.; SCOLES, G. A.; KNOWLES, D. P. Expression of equi merozoite antigen 2 during development of *Babesia equi* in the midgut and salivary gland of the vector tick *Boophilus microplus*. *Journal of clinical microbiology*, v. 41, n. 12, p. 5803-5809, 2003.

UETI, W.M.; PALMER, G.H.; KAPPMAYER, L.S.; STATFIELD, M.; SCOLES, G.A.; KNOWLES, P.D. Ability of vector tick *Boophilus microplus* to acquire and transmit *Babesia equi* following feeding on chronically infected horses with low-level parasitemia. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.8, p.3755-3759, 2005.

UETI, W.M.; PALMER, G.H.; SCOLES, G.A.; KAPPMAYER, L.S.; KNOWLES, P.D. 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.

UILENBERG, G. *Babesia*—a historical overview. **Veterinary parasitology**, v. 138, n. 1-2, p. 3-10, 2006.

USDA. **Equine piroplasmosis**. 2012. Disponível em: <http://www.aphis.usda.gov/animal_health/animal_diseases/piroplasmosis>. Acessado em: 18 out. 2022.

VAN DE PEER, Y., DE RIJK, P., WUYTS, J., WINKELMANS, T., DE WACHTER, R. The European small subunit ribosomal RNA database. **Nucleic acids research**, v. 28, p. 175-176, 2000.

VENABLES, W.N., RIPLEY, B.D., **Modern applied statistics** with S, 2002, 4° ed. Springer.

VIAL, H. J.; GORENFLOT, A. Chemotherapy against babesiosis. **Veterinary parasitology**, v. 138, n. 1-2, p. 147-160, 2006.

VIEIRA, T. S.; VIEIRA, R. F.; FINGER, M. A.; NASCIMENTO, D. A.; SICUPIRA, P. M.; DUTRA, L. H.; VIDOTTO, O. Seroepidemiological survey of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses from a rural and from urban areas of Paraná State, southern Brazil. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 4, n. 6, p. 537-541, 2013.

VIEIRA, M. I. B.; COSTA, M. M.; DE OLIVEIRA, M. T.; GONÇALVES, L. R.; ANDRÉ, M. R.; MACHADO, R. Z. Serological detection and molecular characterization of piroplasmids in equids in Brazil. **Acta tropica**, v. 179, p. 81-87, 2018.

VITARI, G. L. V. **Diversidade genética da sequência 18S do DNA ribossomal de *Theileria equi* em equinos oriundos das cinco regiões geográficas do Brasil**. 2018. 76f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ, Seropédica, 2018.

VITARI, G.L., COSTA, R.L., ABREU, A.P.M., PECKLE, M., SILVA, C.B., PAULINO, P.G., SANTOS, H.A. Genetic diversity of *Theileria equi* from horses In different regions of Brazil based on the 18S rRNA gene. **Journal of Parasitology**, v. 105, p. 186-194, 2019.

WANG, J., LIU, J., YANG, J., WANG, X., LI, Z., JIANLIN, X., YIN, H. The first molecular detection and genetic diversity of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in horses of Gansu province China. **Ticks Tick Borne Dis** v. 10, p. 528–532, 2019.

WISE, L. N.; KAPPMAYER, R. H.; MEALEY; KNOWLES, D. P. Review of Equine Piroplasmosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, n. 6, p. 1334–1346, 2013.

WISE, L. N.; PELZEL-MCCLUSKEY, A. M.; MEALEY, R. H.; KNOWLES, D. P. Equine piroplasmosis. **Veterinary Clinics: Equine Practice**, v. 30, n. 3, p. 677-693, 2014.

WISE, L. N.; KAPPMAYER, L. S.; KNOWLES, D. P.; WHITE, S. N. Evolution and diversity of the EMA families of the divergent equid parasites, *Theileria equi* and *T. haneyi*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 68, p. 153-160, 2019.

WOAH. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. In: OIE Terrestrial Manual, v. 2 , 6 ed. 2014.

XUAN, X.; CHAHAN, B.; HUANG, X.; YOKOYAMA, N.; MAKALA, L. H.; IGARASHI, I.; MIKAMI, T. Diagnosis of equine piroplasmosis in Xinjiang province of China by the enzyme-linked immunosorbent assays using recombinant antigens. **Veterinary Parasitology**, v. 108, n. 2, p. 179-182, 2002.

XUAN, X.; LARSEN, A.; IKADAI, H.; TANAKA, T.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; MIKAMI, T. Expression of *Babesia equi* merozoite antigen 1 in insect cells by recombinant baculovirus and evaluation of its diagnostic potential in an enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 705-709, 2001.

YAMAMURA, M.H.; DIAS, R.F.JR.; CARVALHO, L.; PEREIRA, A.B. L.; COSTA, P.E. M.; VIVOTTO, O. *Babesia equi* (Laveran, 1901) in a horse of the Quarter horse breed in Londrina. In: II Encontro de Pesquisas Veterinárias, Londrina, 1986.

ZAPF, F.; SCHEIN, E. The development of *Babesia (Theileria) equi* (Laveran, 1901) in the gut and the haemolymph of the vector ticks, Hyalomma species. **Parasitology research**, v. 80, p. 297-302, 1994.

ZOBBA, R.; ARDU, M.; NICCOLINI, S.; CHESSA, B.; MANNA, L.; COCCO, R.; PARPAGLIA, M. L. P. Clinical and laboratory findings in equine piroplasmosis. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, n. 5, p. 301-308, 2008.