



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA – UFRB
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS – CCAAB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

JULIANA SOUZA SANTOS

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Theileria equi* EM ASININOS NA
BAHIA UTILIZANDO A TÉCNICA DE qPCR**

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

Fevereiro – 2022

JULIANA SOUZA SANTOS

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Theileria equi* EM ASININOS NA
BAHIA UTILIZANDO A TÉCNICA DE qPCR**

Trabalho de conclusão de curso submetido ao Colegiado de Graduação de Medicina Veterinária do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Médica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Wendell Marcelo de Souza Perinotto.

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

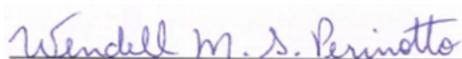
Fevereiro – 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
COLEGIADO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CCA106 – TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

COMISSÃO EXAMINADORA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

JULIANA SOUZA SANTOS

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Theileria equi* EM ASININOS NA
BAHIA UTILIZANDO A TÉCNICA DE qPCR



Prof. Dr. Wendell Marcelo de Souza Perinotto
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Me. Salvador Santana Silva Júnior



Prof. Dr. José Carlos de Oliveira Filho
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Cruz das Almas, 23 de fevereiro de 2022.

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por ter me dado o dom da vida, a paciência e sabedoria para entender e aprender com cada momento de dificuldade. Só Ele sabe tudo o que vivi para chegar onde estou.

Aos meus pais, Dona Graça e Sr. Joaquim, por terem sido os melhores pais do mundo, por cada ensinamento de vida dado, por serem meu porto seguro e mesmo distante sempre estiveram ao meu lado, me motivando a seguir sempre em frente de cabeça erguida. O sonho de vocês se realizou: os dois filhos possuem ensino superior.

Ao meu irmão Rafael e a minha cunhada Catarina, por todo apoio e confiança, e por terem me dado o presente mais lindo da minha vida, minha sobrinha/afilhada Alice que foi e é o meu maior estímulo para buscar cada dia ser mais forte.

Ao meu companheiro Tiago, por toda força e incentivo, por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis da graduação, sendo sempre um grande estimulador nas conquistas da minha vida.

Aos amigos de vida Marilândia e Romário, e aos amigos de caminhada, Elis, Isabella, Marília, Maria Júlia, Grazielle, Uilson, Carla Miranda, Rafael Novaes. Vocês foram muito importantes para que eu finalizasse mais esse ciclo da minha vida.

Ao grande mestre Wendell, por ter sido não só para mim, mas para todos os alunos que tem a honra de lhe conhecer, muito mais que um docente: um amigo, um grande incentivador. Seu olhar humano sobre os alunos e seu prazer em ensinar lhe tornaram um grande docente.

A instituição UFRB – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, aos demais colegas e docentes, por compartilharem comigo toda essa trajetória me formando como estudante, pessoa, cidadã e acima de tudo, como mulher.

A todas as empresas que estagiei, ProntoVet sob a responsabilidade do Médico Veterinário Me. Felipe Sento Sé e CentralVet sob a responsabilidade dos Médicos Veterinários Me. Salvador Júnior e Elânio Júnior, juntamente com todos os funcionários por me receber de braços abertos, sempre apoiando e me ensinando tudo que sabiam. Enfim, a todos o meu muito obrigado por tudo.

*O jumento é nosso irmão, quer queira, quer não
O jumento sempre foi o maior "desenvolvimentista"
do sertão...*

(Luiz Gonzaga – Apologia ao jumento)

SANTOS, Juliana Souza, **Diagnóstico molecular de *Theileria equi* em asininos na Bahia utilizando a técnica de qPCR**. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2022. Orientador: Prof. Dr. Wendell Marcelo de Souza Perinotto.

RESUMO

Os asininos (*Equus asinus*) são animais historicamente envolvidos com o desenvolvimento da sociedade, sendo principalmente utilizado para o transporte de pessoas e cargas. Porém, apesar de sua marcante presença, principalmente na região Nordeste do Brasil, a saúde desses animais, mostra-se em descaso, deixando-os susceptíveis a diversas doenças, como a Theileriose. A Theileriose é uma doença que pode acometer os equídeos de forma geral, inclusive os asininos. Trata-se de uma enfermidade parasitária infecciosa causada pelo hemoprotozoário *Theileria equi*, causando prejuízos de forma direta, relacionado a custos com tratamento, casos de aborto, queda de desempenho de animais atletas, como de forma indireta, através do impedimento da comercialização, restrição de trânsito e participação em eventos. Visando o diagnóstico dessa enfermidade, e a partir do desenvolvimento de técnicas moleculares mais eficientes, tem se mostrado cada vez mais frequente, a utilização do PCR em tempo real (qPCR) na identificação de *T. equi*. Tendo em vista o descuido com o qual os asininos sempre foram tratados e, devido à baixa sensibilidade dos testes utilizados na rotina para identificação dos agentes da Piroplasmose, o presente estudo tem como objetivo avaliar a presença de *T. equi* em asininos no estado da Bahia, por meio da técnica de qPCR. Foi realizada a coleta sanguínea em 200 asininos, utilizando tubos a vácuo de EDTA, através da venopunção da veia jugular. A detecção molecular de *T. equi* realizou-se por meio do sistema TaqMan® de qPCR. Obteve-se resultados positivo em 18% (36/200) das amostras pesquisadas. A partir dos resultados encontrados no presente trabalho, conclui-se que utilizando a técnica de qPCR foi possível detectar material genético de *T. equi* em jumentos naturalmente infectados no estado da Bahia, demonstrando a circulação desses hemoparasitos nos asininos na região.

PALAVRAS-CHAVE: Asinino. Piroplasmose. Theileriose.

SANTOS, Juliana Souza, **Molecular diagnosis of *Theileria equi* in donkeys from Bahia by qPCR technique**. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2022. Orientador: Prof. Dr. Wendell Marcelo de Souza Perinotto.

ABSTRACT

The donkeys (*Equus asinus*) are animals historically involved with the development of society, being mainly used for transportation of people and loads. However, despite their strong presence, especially in the Northeast of Brazil, the health of these animals is neglected, leaving them susceptible to various diseases such as the Theileriosis. Theileriosis is a disease that can affect horses in general, including donkeys. It is an infectious parasitic disease caused by the hemoproteoan *Theileria equi*, causing losses directly, related to treatment costs, cases of abortion, decreased performance of athletic animals, and indirectly, by preventing the commercialization, transit restriction and participation in events. Aiming the diagnosis of this disease, and from the development of more efficient molecular techniques, the use of real-time PCR (qPCR) in the identification of *T. equi* has become more and more frequent. Considering the carelessness with which donkeys have always been treated and due to the low sensitivity of the tests routinely used to identify the agents of pyroplasmiasis, the present study aims to evaluate the presence of *T. equi* in donkeys in the state of Bahia, through the qPCR technique. Blood was collected from 200 donkeys, using EDTA vacuum tubes, through jugular vein venipuncture. The molecular detection of *T. equi* was done using the TaqMan® qPCR system. Positive results were obtained in 18% (36/200) of the samples. From the results found in this study, it is concluded that using the qPCR technique it was possible to detect genetic material of *T. equi* in naturally infected donkeys in the state of Bahia, demonstrating the circulation of these hemoparasites in donkeys in the region.

KEYWORDS: Donkey. Piroplasmiasis. Theileriosis

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Percentual de distribuição do rebanho asinino sobre as regiões do Brasil .. 17
- Gráfico 2.** Percentagem de animais positivos e negativos ao exame de qPCR 33

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estágios intraeritrocíticos de *Theileria equi*. A cruz de Malta característica de quatro microrganismos pode ser notada no interior do eritrócito 21
- Figura 2.** Representação esquemática do ciclo de vida de *T. equi* 22

LISTA DE ABREVIações

cELISA – Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

CEUA – Comissão de Ética do Uso de Animais

Cq – *Quantification cycle*

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

EDTA – Ácido diaminotetraacético

EMA – *equi merozoite antigen*

FAO – Food and Agriculture Organization

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IFAT – Indirect Fluorescent Antibody Test

IgG – imunoglobulinas G

IgM – imunoglobulinas M

kg – quilograma

µL – microlitro

mg – miligrama

OIE – Organização Internacional de Saúde Animal

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

qPCR – PCR em tempo real

RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta

rRNA – Ácido Ribonucléico ribossômico

TFC – Teste de Fixação de Complemento

T. equi – *Theileria equi*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	15
2.1 Geral	155
2.2 Específicos	166
3. REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 Asininos: Símbolo Nordestino de Resistência	166
3.2 Agente etiológico: <i>Theileria equi</i>	188
3.2.1 Taxonomia.....	Erro! Indicador não definido. 8
3.3 Epidemiologia	188
3.3.1 Prevalência e Distribuição Geográfica.....	188
3.3.2 Transmissão	199
3.4 Ciclo de Vida.....	20
3.5 Sinais Clínicos	222
3.6 Aspectos imunológicos	233
3.7 Diagnóstico	244
3.7.1 Métodos diretos	244
3.7.1.1 Esfregaço sanguíneo	24
3.7.1.2 Técnicas moleculares	25
3.7.2 Métodos indiretos (sorologia)	266
3.7.2.1 Teste de Fixação de Complemento (TFC)	26
3.7.2.2 c-ELISA	26
3.7.2.3 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	27
3.8 Achados da Patologia Clínica	277

3.9 Tratamento	288
3.10 Prevenção e Controle	299
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Local de Estudo	30
4.2 Coleta e Envio de Amostras	30
4.3 Extração de DNA total	31
4.4 Detecção Molecular de <i>Theileria equi</i> utilizando a PCR em tempo real ..	31
4.5 Análise estatística	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
6. CONCLUSÃO	36
7. REFERÊNCIAS	37
ANEXO I	49
ANEXO II	50
ANEXO III	51

1. INTRODUÇÃO

O processo de domesticação dos equídeos, compreende desde os primórdios, onde ainda eram considerados fonte alimentar. Posteriormente, em convergência com a evolução humana, estes passaram a ser empregados em conquistas de terra, guerras, tração, esporte e, finalmente lazer, estando assim intimamente ligados com o desenvolvimento das civilizações (BRASIL, 2016).

Nos últimos anos, a Equideocultura, mostra-se em ascensão, uma vez que, cada dia mais estes animais venham sendo utilizados em diversas atividades, desde esporte, trabalho, ou até mesmo aplicação em terapias alternativas ligadas a Medicina (ex. Equoterapia). Apesar da posição de destaque dos equinos (cavalos e éguas) nessa atividade, segundo Murad e Carrijo Junior (2016), a Equideocultura abrange também a criação de asininos (asnos, jumentos e jegues) e muares (mulas, burros e bardotos).

Presente em todas as regiões do Brasil, o asinino sempre assumiu um papel importante na economia das famílias pobres, sendo direcionados, principalmente para transporte de pessoas, água, carga e tração (POLIDORI; VINCENZETTI, 2012). Em todo o mundo, os asininos também são utilizados no comércio de carne, leite e pele (POLIDORI; VINCENZETTI, 2012, 2013). Em especial, na região Nordeste, este animal é considerado símbolo cultural, religioso e socioeconômico de resistência.

Porém, apesar de sua grande importância no desenvolvimento de diversos países, principalmente do Brasil, a saúde destes animais mostra-se negligenciada. Com cuidados veterinários insuficientes, os asininos encontram-se expostos a numerosos agentes de doenças que afetam negativamente a esperança de vida e diminuem a sua capacidade de trabalho (FAO, 2011; RAHMAN; REED, 2014; REGAN *et al.*, 2014; STRINGER, 2014; VALETTE, 2014; FITSUM; AHMED, 2015; ZEWDIE *et al.*, 2015).

Uma das enfermidades que acometem frequentemente os equídeos domésticos no geral, mais especificamente os asininos, é a Theileriose. Trata-se de uma enfermidade parasitária infecciosa causada pelo hemoprotozoário *Theileria equi* que desenvolve-se inicialmente em linfócitos, posteriormente infectando hemácias (SANTOS *et al.*, 2020).

A Theileriose Equina, também conhecida como Nutaliose, Febre Biliar ou Piroplasmose Equina (JARDIM, 2014), apresenta distribuição cosmopolita, estando diretamente relacionado com a presença dos seus vetores, carrapatos da família Ixodidae (REGO, 2008).

A doença pode se apresentar de forma aguda, subaguda ou crônica (OIE, 2014), variando de animais assintomáticos à apresentação de sintomas como febre, inapetência, anemia, perda de peso, e até mesmo, óbito (SANTOS et al., 2020).

Esta enfermidade vem causando diversos danos de ordem direta, como queda no desempenho de animais atletas, alta taxa de mortalidade em animais que adquirem a forma aguda da doença, custos com tratamento, casos de aborto, etc., e indireta, onde podemos citar o impedimento da comercialização de equídeos, restrição no trânsito de animais e participação de eventos, causando assim, grandes prejuízos aos animais acometidos e ao próprio comércio de equídeos (NANTES et al., 2008; SOUTO et al., 2014).

Para o diagnóstico deve-se levar em consideração aspectos como anamnese, exame físico, epidemiologia e exames laboratoriais específicos, sendo estes, hematológico, imunológico, parasitológico e molecular. A partir do desenvolvimento da biologia molecular na identificação de agentes patogênicos, tem se mostrado cada vez mais frequente a utilização da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e de hibridização de ácidos nucleicos (sondas moleculares), como é o caso do PCR em tempo real (qPCR), para a detecção de genes específicos de *T. equi*, oferecendo-nos assim, uma sensibilidade maior (WISE et al, 2014).

Devido o abandono ao qual atualmente os asininos sobrevivem, são escassos os estudos relacionados a saúde desta espécie, principalmente envolvidos com a investigação de hemoparasitoses no geral, mais especificamente sobre o diagnóstico de Theileriose.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar a presença de *T. equi* em asininos no estado da Bahia, por diagnóstico molecular.

2.2 Específico

- Investigar a infecção por *T. equi* em asininos naturalmente infectados localizados no Estado da Bahia, por meio da técnica molecular de qPCR.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Asininos: Símbolo Nordestino de Resistência

Os asininos, também conhecidos como jumentos, asnos ou jegues, são animais mamíferos, herbívoros, monogástricos e ungulados, bastante utilizados como meio de transporte, animais de tração e carga, no auxílio do trabalho rural e, principalmente na agricultura de subsistência (BARZEV, 2004; BURDEN; THIEMANN, 2015), comum em países subdesenvolvidos. Em países da Ásia e Europa estes animais servem como fonte de alimento, estando relacionados com a produção de leite e carne (SIMON; XIAOLING; NIKKHAH, 2012; ALI et al., 2014).

Pertencem ao reino Animalia, filo Chordata, classe Mammalia, ordem Perissodactyla, família Equidae, gênero *Equus*, espécie *Equus asinus*, (ARANGUREN et al., 2002; GRINDER et al., 2006). Apesar de os jumentos derivarem do mesmo tronco filogenético dos equinos (*E. caballus*) (HENRY et al., 2009; PIMENTEL et al., 2014), apresentam número de cromossomos diferentes: asininos possuem 62 cromossomos e equinos 64 cromossomos. Em casos de cruzamento entre essas duas espécies, resultará em filhotes muares (híbridos), com 63 cromossomos e inférteis.

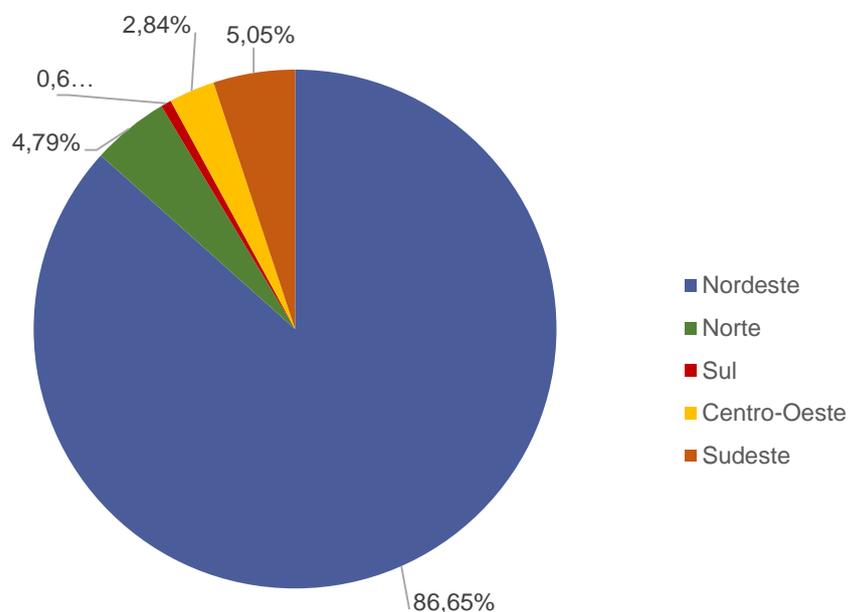
Diversas são as teorias a respeito da origem dos asininos domésticos. Darwin (1859), relata sobre a descendência de um único tronco africano de origem. Já Lorenzo (1997), Almeida (2009) e Salles et al., (2013), acreditam na existência de dois ancestrais: *Equus asinus europeus*, provavelmente com origem na região da bacia do Mediterrâneo, e o *Equus asinus africanus*, originário do Norte da África, da bacia do Nilo ou atual Etiópia.

Segundo Luppi e Borelli (2007), os jumentos estão entre os primeiros animais domesticados pelo homem, sendo este processo, realizado há cerca de 6.000 anos atrás em território egípcio (ROSSEL et al., 2008). Quanto a introdução desta espécie no Brasil, acredita-se que ocorreu por volta de 1534, trazidos por Martín Afonso de Souza, dos Arquipélagos das Madeiras e das Canárias, e foram levados para o

estado da Bahia no ano de 1549 por Thomé de Souza, vindos de Cabo Verde (MARIANTE & CAVALCANTE, 2006). Com o passar dos anos, estes animais mostraram-se presentes em todo o território brasileiro.

Segundo números apresentados pelo IBGE (2017), através do Censo Agropecuário, o efetivo do rebanho asinino do Brasil corresponde a 376.874 cabeças. Este efetivo é demonstrado de forma distribuída entre os estados, havendo posição de destaque para a região Nordeste, que detém 86,65% do rebanho asinino brasileiro (Gráfico 1), correspondendo a cerca de 326.569 cabeças.

Gráfico 1. Percentual de distribuição do rebanho asinino sobre as regiões do Brasil



Fonte: IBGE (2017).

Devido a sua marcante presença na história do Nordeste, a sua resistência e capacidade de adaptação ao semiárido nordestino, servindo como, além de mecanismo de transporte de cargas, companheiro de batalhas diárias contra a seca e a fome do povo que ali habita, o jumento é considerado símbolo cultural desta região. Porém, apesar de sua importância e de todo simbolismo envolto nestes animais, são escassos os estudos voltados a sua saúde.

3.2 Agente etiológico: *Theileria equi*

3.2.1 Taxonomia

O agente etiológico da Theileriose, foi descrito pela primeira vez por Laveran (1901), que observou protozoários em forma de pêra em esfregaços sanguíneos de equinos da África, denominando-o assim como *Piroplasma equi*. Em seguida, Nuttall (1910), devido as diferenças morfológicas entre o até então *P. equi* e as demais espécies do gênero *Piroplasma*, propôs a mudança na denominação para *Nutallia equi*. Porém, trabalhos de nomenclatura e sistemática realizados posteriormente, inseriram este agente ao gênero *Babesia*, sendo então chamado *Babesia equi*.

Entretanto, a presença de *B. equi* no gênero *Babesia* foi questionada por vários estudiosos, os quais apontaram diferenças desta espécie com as demais do gênero. Características como transmissão transovariana não relatada, o fato de realizar esquizogonia em linfócitos, comum ao gênero *Theileria sp.*, e, finalmente, apresentar resistência aos compostos babesicidas, fizeram com que fosse realocado ao gênero *Theileria*, nomeado então como *Theileria equi* (SIGRIST, 1983; MEHLHORN & SCHEIN, 1984; MEHLHORN & SCHEIN, 1998).

- Reino: Protista;
- Sub-reino: Protozoa Goldfuss, 1818;
- Filo: Apicomplexa Levine, 1970;
- Classe: Sporozoea Leuckart, 1879;
- Sub-classe: Piroplasmae Levine, 1961;
- Ordem: Piroplasmida Wenyon, 1926;
- Família: Theileriidae Du Toit, 1918;
- Gênero: *Theileria* Bettencourt, 1907;
- Espécie: *Theileria equi* (LAVÉLAN, 1901) Mehlhorn e Schein, 1998.

3.3 Epidemiologia

3.3.1 Prevalência e Distribuição Geográfica

A Theileriose equina é uma doença de ampla distribuição geográfica, estando presente principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo,

disseminando-se pelos continentes americanos, africano, europeu e asiático, com prevalência oscilando entre os 15-100% (SANTOS et al., 2020).

Em estudo conduzido por Laus et al. (2015), onde foi avaliado a infecção por *T. equi* em 138 burros italianos, detectou-se soroprevalência de 40,6%. No norte do Quênia, uma pesquisa de prevalência em burros (*Equus africanus asinus*), conduzida por Hawkins et al. (2015), utilizando amostras de sangue de 71 animais, obteve resultado de 72% (51/71) das amostras positivas.

A América do Sul é considerada endêmica para esta hemoparasitose. No Brasil, uma investigação foi realizada por Machado et al. (2012), objetivando detectar infecção ou exposição de burros a *T. equi* em São Paulo, apresentando resultado de 73,86% (65/88) de animais soropositivos.

Países como Canadá, Nova Zelândia, Austrália, Japão, Alemanha, Reino Unido, Irlanda, Holanda e Países Baixos são considerados livres do parasito (LEAL, 2010).

Essa disposição geográfica da doença está intimamente relacionada com a expressiva presença do carrapato vetor, responsável pela transmissão biológica desta enfermidade.

3.3.2 Transmissão

A *Theileria equi* apresenta como hospedeiros intermediários os equídeos e como hospedeiros definitivos/vetores, os carrapatos da família Ixodidae, sendo especialmente encontrados nas espécies *Dermacentor*, *Hyalomma* e *Rhipicephalus* (MONTEIRO, 2017).

No Brasil, temos como principal transmissor do protozoário, o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Desta forma, sabendo que esta é uma espécie de carrapato que infesta bovinos, a criação concomitante de equinos e bovinos, sugere fator de risco para a ocorrência desta hemoparasitose. Em estudo realizado por Torres et al. (2012) no Rio Grande do Sul, obteve-se taxa de positividade para *T. equi* de 12% em equinos que não convivem com bovinos, e os que convivem diretamente apresentaram sorologia positiva de 81,2%.

Segundo Wise et al. (2014), o ciclo de vida do carrapato vetor compreende quatro estádios: ovo, larva, ninfa e adulto. A transmissão nos vetores biológicos pode ocorrer de forma transestadial, na qual as larvas se infectam ao realizarem repasto sanguíneo em equídeos portadores de *T. equi*, mantendo o hemoparasito em suas glândulas salivares ao mudarem para ninfa e, posteriormente adulto. Deste modo, larvas, ninfas e adultos ao se alimentarem num animal infectado poderão transmitir o parasito a outro animal. Outra forma de transmissão no vetor é a intraestadial, onde macho adulto de *R. microplus* adquire o parasito durante sua alimentação em animais infectados, infectando outros animais (SANTOS et al., 2020).

Além da transmissão biológica de *T. equi* ocorrida através da picada do carrapato vetor, esse piroplasma pode ser transmitido de forma iatrogênica mediante exposição a sangue infectado, podendo ocorrer em locais onde se tenha o costume de reutilização de seringas e agulhas; como também há relatos de transmissão transplacentária (LEAL, 2010; WISE et al., 2013; SANTOS et al., 2020).

3.4 Ciclo de Vida

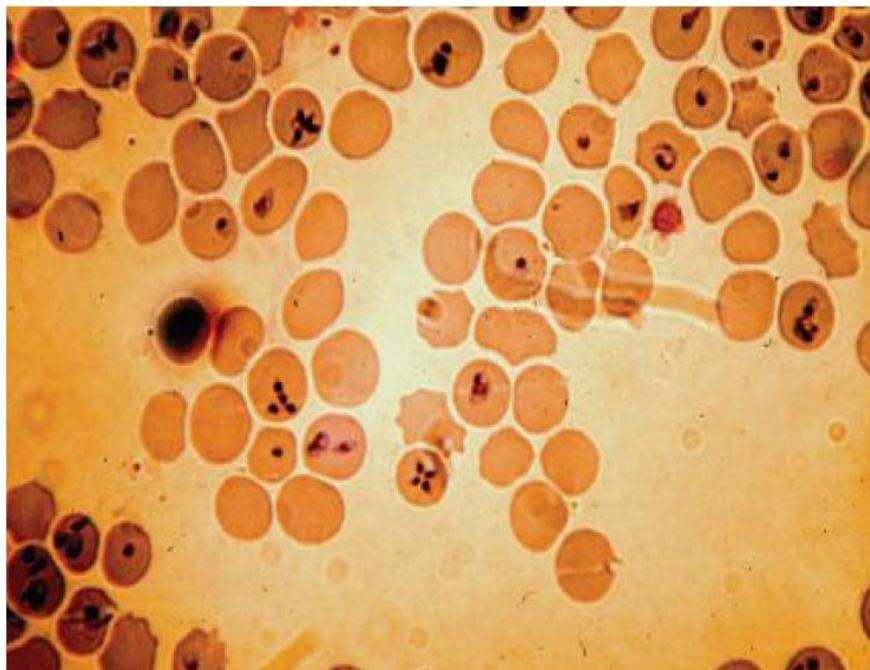
O ciclo de vida de *T. equi* corresponde a três fases distintas, onde ocorrem as reproduções sexuada e assexuada, distribuídas entre os hospedeiros, sucedendo da seguinte forma, segundo Mehlhorn e Schein (1998), representado na Figura 2:

- Esquizogonia: os carrapatos vetores inoculam a forma infectante, os esporozoítos, através da saliva, no momento da picada. Estes, por sua vez, após entrarem na corrente sanguínea, penetram nos linfócitos do hospedeiro vertebrado, decorrendo a formação de macroesquizontes e microesquizontes, resultando em aproximadamente 200 merozoítos por célula infectada. Após, os merozoítos penetram nos eritrócitos e iniciam a divisão por fissão binária, originando as formas piriformes, que podem agrupar-se em quatro formando a “Cruz de Malta” (Figura 1). Posterior a ruptura dos eritrócitos, os merozoítos podem cursar três destinos diferentes: ficar livres na circulação, podendo ser fagocitados por leucócitos ou simplesmente degenerar; adentrar em outras hemácias ou apenas aderir à sua superfície continuando a infecção; ou penetrar em novo eritrócito e mudarem de forma, tornando-se esféricos/ovoides, sendo chamados de gamontes.

- Gamogonia: durante o repasto sanguíneo, o carrapato vetor ingere os gamontes. Estes permanecem no intestino do vetor crescendo rapidamente. Após, iniciam o processo de divisão nuclear, podendo dividir-se em microgamontes mononucleados que darão origem aos microgametas. Alguns gamontes não mudam, e são considerados macrogametas multinucleares. Os micro e macrogametas se fundem para formar os zigotos. Dentro dos zigotos forma-se o cineto, o qual será transportado até as glândulas salivares dos carrapatos por meio da hemolinfa (PIOTTO, 2009; LEAL, 2010; ZEIBIG, 2014).

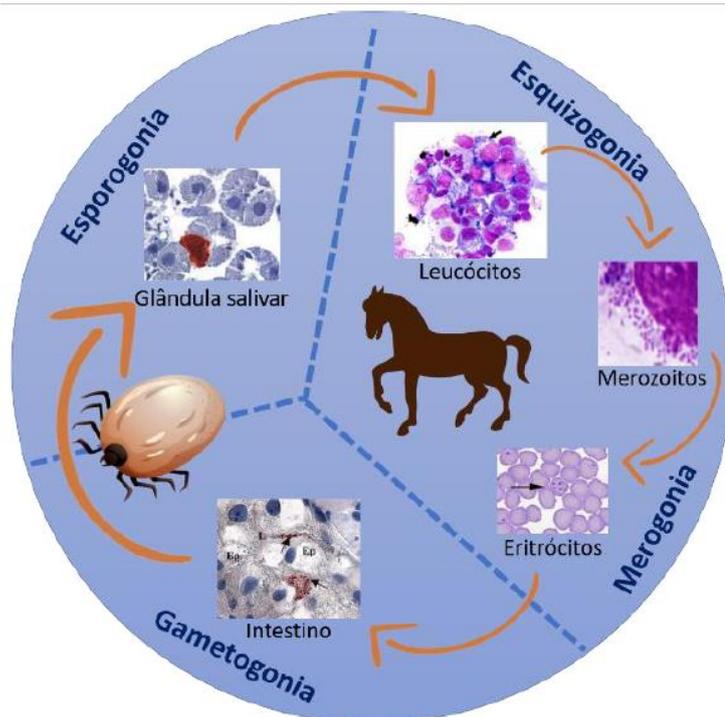
- Esporogonia: a esporogonia tem início quando os cinetos penetram a glândula salivar dos carrapatos vetores, formando grandes massas esporogônicas multinucleares no interior das células hospedeiras, chamadas esporontes. Estes esporontes se dividem em esporoblastos multinucleados e posteriormente em esporozoítos de tamanho menor, que será inoculado nos hospedeiros vertebrados juntamente com a saliva dos carrapatos na ocasião do repasto sanguíneo, assim, iniciando um novo ciclo.

Figura 1. Estágios intraeritrocíticos de *Theileria equi*. A cruz de Malta característica de quatro microrganismos pode ser notada **no interior**



Fonte: MONTEIRO (2017).

Figura 2. Representação esquemática do ciclo de vida de *T. Equi*.



Fonte: SANTOS et al. (2020), adaptado de SCOLES e UETI (2015)

3.5 Sinais Clínicos

A Theileriose equina é uma enfermidade que acomete equídeos (equinos, asininos e muares), podendo se manifestar clinicamente nas formas aguda, subaguda e crônica, apresentando período de incubação de 10-21 dias (MEHLHORN & SCHEIN, 1998; TAYLOR, 2017).

Na forma aguda o animal pode apresentar febre, anorexia, apatia, anemia, icterícia, hemoglobinúria, taquicardia, sudorese; edema em cabeça, pernas e parte ventral do corpo. Há relatos ainda de envolvimento gastrointestinal, onde os animais afetados apresentam-se constipados, podendo manifestar sinais de cólica (OIE, 2014; TAYLOR, 2017; SANTOS et al., 2020).

Em casos considerados subagudos, a sintomatologia apresentada é parecida, podendo expor sinais como perda de peso progressiva, febre intermitente, coloração de mucosas variando do rosa pálido ou amarelo pálido com ocasional presença de petéquias e equimoses, constipação seguido de diarreia, sinais de cólica, coloração

de urina variando do amarelo escuro ao vermelho devido ao pigmento da hemoglobina (BAPTISTA, 2010; SANTOS, 2011; SANTOS et al., 2020).

Segundo Farias (2007) e Santos et al. (2020), apesar da importância clínica apresentada na forma aguda desta doença, a maioria dos animais desenvolve a forma crônica, expondo sinais clínicos inespecíficos como inapetência, perda de peso, baixa condição corporal e possivelmente anemia.

Alguns autores descrevem uma outra forma de apresentação clínica da doença: a forma hiperaguda. Apesar de rara, trata-se de uma condição que tem se tornado relevante nos últimos anos. Esta cursa com o aparecimento de sinais clínicos de forma abrupta ou o não aparecimento, seguido de colapso e morte em 1 a 2 dias, sendo observado em animais adultos sem prévia exposição, recentemente introduzidos em localidades endêmicas ou em potros neonatais (WISE et al., 2014; TAYLOR, 2017; SANTOS et al., 2020).

Há ainda relatos de infecção transplacentária em fêmeas prenhez causando aborto (OLIVEIRA et al., 2019) ou nascimento de animais portadores da doença apresentando sintomatologia de fraqueza, apatia e diminuição do reflexo de sucção, podendo cursar com os sintomas expostos pelos animais adultos (SANTOS et al., 2020).

3.6 Aspectos imunológicos

Segundo Santos et al. (2020), ainda não está bem elucidado os mecanismos precisos envolvidos com o desenvolvimento da imunidade adaptativa relacionado com o controle da Theileriose equina, porém, sendo possível o envolvimento das respostas humoral e celular, havendo respostas de células T específicas contra os merozoítos nos eritrócitos e, também, contra os esporozoítos em estágios anteriores.

Após a ruptura das hemácias os parasitos tornam-se susceptíveis a ação dos anticorpos. Estes irão neutralizar os parasitos bloqueando sua entrada nas células, opsonizando os eritrócitos infectados e, por fim, promovendo a lise celular. Há gradativo aumento nos títulos de anticorpos após a infecção podendo ser detectados em 7-10 dias, dependendo da técnica de imunodiagnóstico utilizada, e atingem o título máximo em 30-45 dias. Após este período os níveis de anticorpos caem

lentamente atingindo níveis indetectáveis após alguns meses, caso não ocorra reinfeção (KERBER, 2005; CUNHA et al., 2006; SANTOS et al., 2020).

Anticorpos direcionados contra as proteínas de superfície de merozoítos são produzidos, através do reconhecimento de antígenos na superfície dos merozoítos, também chamados de EMAs (*equi merozoite antigen*), que são expressos em diferentes estágios do ciclo do protozoário: EMA-1 e EMA-2 são expressos em várias etapas; no entanto, EMA-2 é um dos primeiros antígenos a serem reconhecidos pelo sistema imunológico (SANTOS et al., 2020).

3.7 Diagnóstico

A Theileriose trata-se de uma enfermidade de grande importância mundial, devido ao impacto econômico causado e distribuição cosmopolita do agente vetor. Dessa forma, o diagnóstico e identificação do agente são extremamente importantes não somente para a adoção de medidas de controle adequadas, mas também para a realização de estudos epidemiológicos envolvendo *T. equi* (SANTOS, 2011).

O diagnóstico irá se basear no histórico do animal, epidemiologia do local e exame clínico, associados a exames laboratoriais diretos e indiretos. Os métodos diretos baseiam-se na identificação de *T. equi*, que pode ser através do esfregaço sanguíneo ou do PCR. Já os métodos indiretos se fundamentam na detecção de anticorpos, sendo eles o TFC, o c-ELISA e a RIFI (PECKLE, 2013). Estes dois últimos são preconizados pela Organização Mundial de Saúde Animal para o diagnóstico de *T. equi*, principalmente relacionado com o trânsito internacional desses animais (OIE, 2014). Todos os métodos apresentam vantagens e desvantagens, devendo ser levado em consideração no momento da escolha a indicação que cada um apresenta.

3.7.1 Métodos diretos

3.7.1.1 Esfregaço sanguíneo

A presença do parasito nos eritrócitos, detectados em esfregaços sanguíneos corados por Giemsa, constitui-se no método mais antigo, de fácil realização e mais utilizado comumente para o diagnóstico de Theileriose equina. A amostra sanguínea é coletada a partir de capilares cutâneos superficiais ou esfregaço de órgãos durante a fase aguda da doença (OIE, 2014). Em esfregaços de animais positivos será

possível observar a presença de quatro pequenos merozoítos arranjados na forma denominada “Cruz de Malta”, característico da infecção por *T. equi* (REGO, 2008).

Este método apresenta alta eficácia durante a fase aguda da doença, porém apresenta falhas, como a não detecção do parasito no sangue de animais com baixa parasitemia, pouca precisão na identificação do agente em portadores crônicos e, devido ao pequeno tamanho, *T. equi* pode ser confundido com artefatos (REGO, 2008; LEAL, 2010; SANTOS, 2011; SANTOS et al., 2020).

Desta forma, devido a sua alta especificidade e baixa sensibilidade, o resultado negativo obtido pelo exame microscópico não exclui a presença da Piroplasmose equina (OIE, 2014).

3.7.1.2 Técnicas moleculares

Infecções por *T. equi* vem sendo, cada vez mais diagnosticadas por meio de testes moleculares.

Os primeiros indícios de desenvolvimento de testes moleculares datam do início da década de 90, onde contou-se com sondas de DNA espécies-específicas, providas para detectar parasitos em amostras de sangue de animais infectados tanto naturalmente quanto experimentalmente (POSNETT et al., 1991; POTGIETER et al., 1992). Porém, essa técnica de hibridização através de sondas de DNA foram substituídas pela reação em cadeia de polimerase (PCR), uma vez que essa apresenta maior especificidade e menor custo quando comparada ao método anterior (OHTA et al., 1995).

Segundo Antunes (2008), a técnica de PCR é bastante utilizada nos dias atuais, consistindo na amplificação de fragmentos específico do DNA, a partir da utilização de *primers*, até que sua concentração possa ser detectável (LEAL, 2010). Esta técnica apresenta altos índices de sensibilidade e especificidade, desempenhando importante papel no diagnóstico de *T. equi* mesmo em amostras com níveis muito baixos de parasitemia (NICOLAIEWSKY et al., 2001; OIE, 2014).

Nos últimos anos, a PCR em tempo real (qPCR) vem apresentando resultados satisfatórios na detecção de patógenos transmitidos por carrapatos em amostras de sangue, sendo caracterizada como um método alternativo para o ensaio da PCR convencional, pois utilizam marcadores moleculares específicos (sondas), que aumenta ainda mais a especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade do teste (LEUTENEGGER, 2001; UETI et al., 2005; 2008; KIM et al., 2008).

Segundo Paulauska et al. (2008), também é possível a detecção do DNA de *T. equi* por meio de qPCR em tecidos do carrapato.

3.7.2 Métodos indiretos (sorologia)

3.7.2.1 Teste de Fixação de Complemento (TFC)

O TFC é considerado, desde 1969, método de referência para a detecção de anticorpos contra *Theileria equi* (NIZOLI, 2005).

Esta técnica baseia-se na pesquisa de IgM, que, em infecções agudas, apresenta elevada concentração, atingindo níveis detectáveis antes das demais imunoglobulinas. Porém, esta imunoglobulina sofre decréscimo produtivo devido a evolução da doença, havendo inicialmente aumento dos níveis de IgG, e posteriormente, redução nos níveis totais de imunoglobulinas quando instala-se a fase crônica da enfermidade, sendo possível observar perda de sensibilidade do teste (OGUNREMI, 2008).

Além disso, segundo Brüning (1996) este teste apresenta outra desvantagem pertinente que é a possibilidade de reação cruzada com *Babesia caballi*. Desta forma, a OIE (2014) determinou que a RIFI ou mesmo o ELISA podem ser utilizados em substituição ao TFC.

3.7.2.2 c-ELISA

Segundo Cunha et al. (2006), equídeos infectados com *T. equi* desenvolvem altos níveis de anticorpos contra proteínas presentes na superfície de merozoítos, sugerindo que estão diretamente envolvidos no controle da multiplicação e eliminação do parasito, uma vez que desenvolvem importante papel no reconhecimento do mesmo.

Desta forma, o c-ELISA (Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) é considerado o teste sorológico mais sensível para detecção da infecção crônica ou inaparente de *T. equi*, pois detecta as respostas de anticorpos para proteínas EMA-1 (*equi merozoite antigen-1*) e EMA-2 (*equi merozoite antigen-2*), que são antígenos presentes na superfície do merozoíto, reconhecidos por anticorpos de equinos infectados (WISE et al., 2014).

Esse método sorológico apresenta maior sensibilidade (95,5%) e especificidade (99%) necessárias ao diagnóstico de Theileriose quando comparadas a outros métodos sorológicos (CUNHA et al., 2002).

3.7.2.3 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A Reação de Imunofluorescência Indireta é amplamente utilizada principalmente em diagnósticos e estudos soro-epidemiológicos, uma vez que apresenta maior sensibilidade e especificidade na detecção de anticorpos anti-*T. equi* quando comparada ao TFC (BALDANI et al., 2007).

Nesse teste, o antígeno do parasita se liga ao vidro e reage com o soro sanguíneo. Os anticorpos ligados aos antígenos podem ser visualizados sob uma luz ultra violeta após a adição de fluoresceína (BRÜNING, 1996).

Entretanto, segundo Brüning (1996) e Baldani et al. (2007), apesar de apresentar maior sensibilidade e especificidade que o TFC, possui desvantagens referentes a dificuldade na padronização da técnica, possibilidade de reação cruzada com *B. caballi*, além da leitura ser subjetiva, variando conforme a experiência do leitor.

3.8 Achados da Patologia Clínica

Estudos realizados relatam sobre a ocorrência de alterações hematológicas em animais infectados por *T. equi*, sendo as principais, diminuição da contagem de hemácias e plaquetas, como também da concentração de hemoglobina (ZOBBA et al., 2008; SANTOS et al., 2020).

A anemia apresentada em infecções por *T. equi*, normalmente é do tipo normocítica e normocrômica (ALSAAD, 2010). Ainda, foi observado por Zobba et al. (2008), redução nos níveis plasmáticos de fibrinogênio, albumina e íons ferro.

Porém, algumas pesquisas demonstram pouca significância na utilização somente dos achados hematológicos no diagnóstico de Theileriose.

Segundo estudos conduzidos por Dória et al. (2016), visando a pesquisa de hemoparasitas (*B. caballi*, *T. equi* e infecções mistas) utilizando 30 animais (15 equinos de esporte e 15 equinos de tração), verificou-se que apenas os equinos de tração apresentaram valores médios de hemácias, hematócrito e hemoglobina abaixo do considerado fisiológico para a espécie, embora 100% dos animais, de ambos os grupos tenham sido considerados positivos para hemoparasitoses por PCR. Dos animais de tração, 20% (3 equinos) apresentaram resultados positivos para *T. equi* e 73,33% (11 equinos) apresentaram resultados positivos para ambos

os hemoparasitas. Já no grupo de esporte 13,3% (2 equinos) tinham apenas *T. equi* e 53,3% (8 equinos) apresentavam infecção mista.

Outro estudo realizado por Rodrigues (2018), obteve resultado positivo em 36,80% (53/144) das amostras. Nos hemogramas das amostras positivas, foi observado anemia normocítica normocrômica, leucocitose e aumento de fibrinogênio, porém, a maioria não apresentou alterações hematológicas.

3.9 Tratamento

Segundo Rego (2008), a aplicabilidade do tratamento, visa inicialmente, restabelecer fisicamente o animal minimizando a sintomatologia clínica, e posteriormente, dar seguimento a eliminação do protozoário, quando possível.

Porém, ainda não há medicamentos eficazes na remoção completa de *T. equi* do organismo do animal, assim mantendo-se portador assintomático por toda a vida (OIE, 2014; RODRIGUES, 2018).

Há diversos estudos baseados na utilização de babesicidas convencionais como Dipropionato de Imidocarb, sendo descrito como potente inibidor de crescimento de *T. equi* (NANTES, 2008; GIMENEZ, 2018). A posologia recomendada para recuperação da infecção é de 2 a 3 mg/kg PV, administradas por via intramuscular a cada 24 horas (MONTEIRO, 2017).

Há relatos sobre a administração de quatro doses de 4 mg/kg PV, com intervalos de 72 horas para a eliminação da infecção (THOMASSIAN, 2005; LEAL, 2010; SILVA, 2011; GRAUSE et al., 2013). Porém, já há estudos que trazem essa terapia com doses altas, como causadora de inúmeras reações adversas, como agitação, cólicas espasmódicas, sudorese, reação local a injeção, além de hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e distúrbios em sistema nervoso central (REGO, 2008; DONNELLAN et al., 2013; MONTEIRO, 2017; GIMENEZ, 2018; BESHBIHY et al., 2020; OLIVEIRA; SILVA, 2021).

Baptista (2010) e Chaudhry (2014) trazem que o uso da Parvaquone apresenta bons resultados em infecções por *T. equi*, pois eliminam a sintomatologia clínica. Monteiro (2017), ainda relata sobre a possibilidade de tratamento com Diisetonato de Amicarbalina na dose de 9 a 10 mg/kg, como dose única, ou como

dose dividida no decorrer de 24 h, como também, a administração de Aceturato de Diminazeno respeitando a posologia de 6 a 12 mg/kg PV, administrado duas vezes em um período de 48 horas, produzindo recuperação clínica.

Outro método de tratamento trazido por Macedo et al. (2021), é a utilização da homeopatia, ao qual foi implementado em um animal que apresentava sintomatologia clínica sugestiva da doença e resultado de esfregaço sanguíneo positivo para *T. equi*, obtendo resultado negativo após 30 dias de terapia.

3.10 Prevenção e Controle

A prevenção e o controle da Theileriose baseia-se na epidemiologia do local, uma vez que a principal forma de transmissão é através da picada do carrapato vetor. Medidas profiláticas são mais intensamente trabalhadas em regiões endêmicas.

Essas medidas correspondem ao controle do ixodídeo associado à sanidade dos animais susceptíveis, uso de materiais estéreis e não reutilização de materiais descartáveis em procedimentos clínicos, exames hematológicos periódicos e manutenção da higiene geral (SILVA et al., 2011).

Para o controle do vetor biológico de *T. equi* no animal e no ambiente, são utilizados acaricidas químicos, principalmente a base de piretrinas, piretróides, carbamatos e organofosforados (REGO, 2008). Porém, por muitas vezes, estes produtos são utilizados de forma indiscriminada e fora da posologia recomendada, levando a ocorrência de intoxicações nos animais, como também, de desenvolvimento de resistência ao princípio ativo dos mesmos.

Desta forma, estudos relacionados à monitorização do *Rhipicephalus microplus*, vem trazendo resultados satisfatórios quanto à possibilidade de implantação do controle biológico, através do uso de fungos entomopatogênicos (RIVERA-CERVANTES, 2017).

Em áreas endêmicas é interessante manter um constante número de vetores biológicos visando o equilíbrio para que não causem um efeito espoliativo a pele e a saúde do animal, no entanto, mantendo a taxa de inoculação de *T. equi*, assim, estimulando a produção constante de anticorpos assegurando estado de portador nos animais (LEAL, 2010).

Desinfetantes e saneamento não são eficazes contra a propagação de infecções transmitidas por carrapatos. No entanto, a eliminação do contato com carrapatos e a prevenção da transferência de sangue de um animal para outro são vitais para um bom controle (OIE, 2014).

Santos et al. (2020) possui dados publicados sobre estudos relacionados a produção de vacinas, contendo o antígeno recombinante EMA, sendo aplicadas em éguas gestantes, obtendo estímulo da produção de IgG total, que se fez presente no colostro, e após a primeira mamada, se manteve circulante até os dois meses de vida, caracterizando-a como uma forma de profilaxia promissora para o controle das infecções por *T. equi*.

Animais portadores ou carrapatos infectados podem introduzir a doença em novas regiões (OIE, 2014). Sendo assim, justifica-se a necessidade de países livres realizarem a vigilância epidemiológica, além do emprego de ações de defesa animal e barreiras sanitárias, com a finalidade de impedir a livre circulação e o comércio de equinos provenientes de países considerados endêmicos (REGO, 2008; PIEREZAN, 2009; LEAL, 2010; OIE, 2014).

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1 Local de Estudo

Os animais aos quais foi realizado coleta sanguínea, estavam abrigados em uma Organização Não Governamental situada na cidade de Euclides da Cunha, localizada no estado da Bahia, a cerca de 311 km de distância da capital, Salvador. A cidade apresenta clima semiárido, com área equivalente a 2.028,421 m², latitude 10°30'27" sul e longitude 39°00'57" oeste, estando a uma altitude de 472 metros.

4.2 Coleta e Envio de Amostras

Na propriedade onde realizou-se as coletas, haviam mais de 1000 asininos confinados, advindos das mais diversas cidades da região Nordeste, que seriam destinados ao abate no frigorífico. Esses animais encontravam-se confinados no local devido à suspeita de casos de Mormo no rebanho.

Foi coletada 200 amostras de sangue total em tubos a vácuo, estéreis contendo ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) à 10% (ANEXO I), através da técnica de venopunção da jugular. A amostragem foi realizada por conveniência.

As amostras foram devidamente identificadas conforme a cor e a numeração apresentada no brinco dos animais, sendo acondicionadas em recipiente térmico refrigerado e transportadas ao Laboratório de Hemoparasitos e Vetores da Estação Experimental de Pesquisa Parasitológica W.O. Neitz (E.E.P.P. W.O. Neitz), na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro para realização das análises moleculares.

O uso dos animais envolvidos na pesquisa foi previamente aprovado pela CEUA (Comissão de Ética do Uso de Animais), processo número 21/2019 (ANEXO II).

4.3 Extração de DNA total

O processo de extração de DNA das amostras de sangue foi realizada utilizando Dneasy Blood and Tissue Kit (Qiagen®), como recomendado pelo fabricante. Esta etapa foi realizada a partir de 100 µL de cada amostra. Em seguida, o DNA obtido foi ressuspenso em 100µL de Tampão AE (do próprio kit), e quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop® ND-2000 (Nanodrop Technologies, DE, USA).

As amostras de DNA foram aliquotadas, de forma que cada uma sofresse degelo poucas vezes, mantendo a integridade do DNA e a confiabilidade da técnica, e armazenadas a -80°C até o momento da utilização.

4.4 Detecção Molecular de *T. equi* utilizando qPCR

A detecção molecular de *T. equi* realizou-se por meio do sistema TaqMan® de qPCR através da utilização dos iniciadores, protocolo e condições de termociclagem segundo Kim et al. (2008). Objetivando amplificar o fragmento de 85pb de DNA do gene *18S rRNA*, foi utilizado um par de “primers” (oligonucleotídeos iniciadores): Be18SF (5'-GCGGTGTTTCGGTGATTCATA-3') e Be18SR (5'-TGATAGGTCAGAACTTGAATGATACATC-3'), e uma sonda de hidrólise denominada Be18SP (5'-AAATTAGCGAATCGCATGGCTT-3'), marcada na

extremidade 5' com um "Reporter Dye" 6-carboxyfluoresceína (FAM) e na extremidade 3' com o "Quencher Dye" 6-carboxytetramethylrhodamine (TAMRA).

O volume final empregado nas reações correspondeu a 20µL, sendo realizadas no equipamento StepOne Plus® (Applied Biosystems), compostas por: 1X de TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 450nM de cada "primer" (Be18SF e Be18SR), 250nM da sonda (Be18SP) e 5µL de DNA total.

As condições de termociclagem foram: ciclo inicial de 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, e 45 ciclos a 95 °C por 20 segundos, seguidos de 55 °C por 1 minuto (KIM et al., 2008).

Amostras que apresentaram *Quantification cycle* (Cq) inferior ou igual a 40 ciclos foram consideradas positivas. Em cada placa da qPCR foram inseridos dois controles positivos e dois controles negativos. O controle negativo era composto por água ultrapura (Nuclease-Free Water, AmbionR) e o controle positivo correspondia ao DNA de uma amostra de sangue de equino cronicamente infectado por *T. equi* mantida no laboratório.

4.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio de percentagem e análise descritiva dos dados. Além disso, foram avaliadas as percentagens obtidas entre animais positivos e negativos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

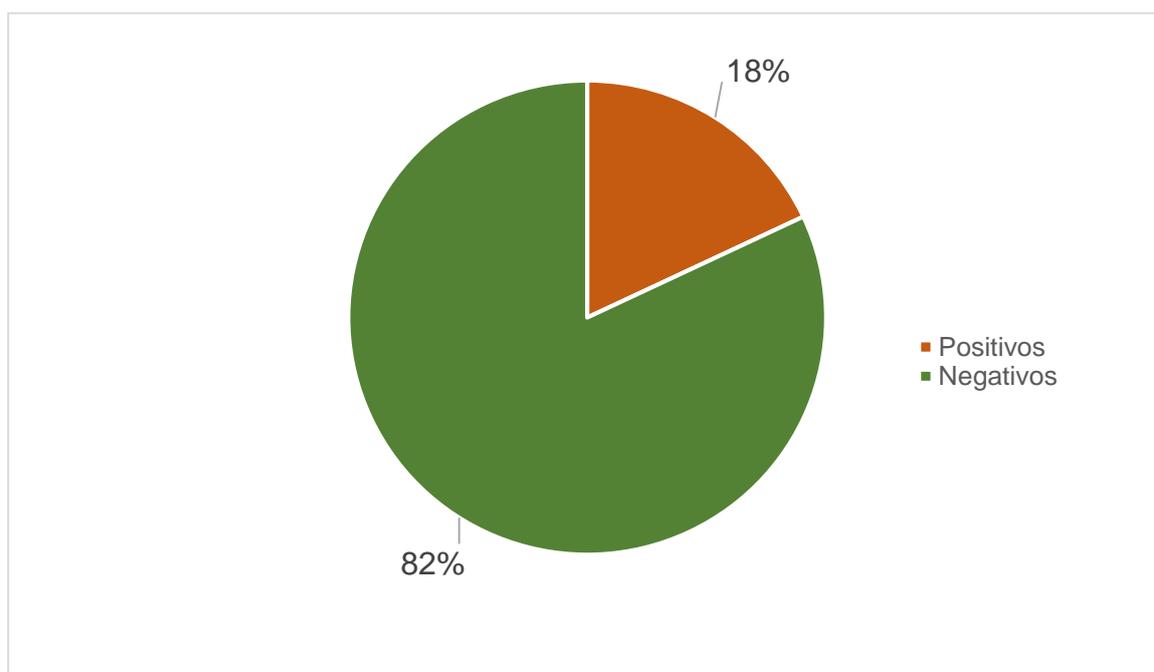
No presente estudo, utilizando a técnica de qPCR, foi possível verificar a presença de DNA de *T. equi* em 18% (36/200) das amostras analisadas (Gráfico 2).

Esses resultados diferem dos encontrados por outros autores. Costa et al. (2019), que realizaram pesquisa de hemoparasitas (*T. equi*, *Babesia caballi* e *Trypanosoma evansi*), por meio de técnicas moleculares, em equídeos presentes na microrregião de Ilhéus-Itabuna no Estado da Bahia, local de clima tropical úmido, encontrou resultado positivo para *T. equi* em 83,5% das amostras (475/569), obtendo 30,3% de positividade entre os jumentos (10/33). Apesar de ser um estudo

que também foi realizado na região Nordeste do país, essa diferença nos resultados apresentados pode estar relacionado a diferença climática entre os locais, levando a variabilidade na manutenção do ciclo de vida do artrópode vetor (WISE et al., 2013; OIE, 2014).

Garcia et al. (2019), relataram que *R. microplus*, carrapato responsável pela transmissão de *T. equi* no Brasil, adaptou-se a todas as regiões do país devido as condições climáticas favoráveis. Porém, estes fatores climáticos influenciam diretamente as gerações anuais deste carrapato. Campos Pereira et al. (2008) e Cruz (2017) demonstraram que na região Sul do país foi possível ser observadas três gerações do ixodídeo ao longo do ano, enquanto que nas regiões Sudeste e Centro-Oeste observam-se de quatro a cinco gerações. Em outro estudo conduzido na Caatinga por Barros et al. (2017), os autores sugeriram que esse bioma não é favorável à sobrevivência das larvas desta espécie de carrapato no período da seca e que as gerações estão diretamente influenciadas pelas chuvas.

Gráfico 2. Percentagem de animais positivos e negativos ao exame de qPCR



Durante o processo de coleta das amostras foi observado que os animais de forma geral, apresentavam-se apáticos, caquéticos, desnutridos, com aumento de volume abdominal (ANEXO III) e mucosas hipocoradas (pálidas). Esses achados

nos animais positivados para *T. equi* condizem com os sinais clínicos relatados pela OIE (2014), Taylor (2017) e Santos et al. (2020). Porém, a presença destes sinais clínicos nos demais animais, levam a crer que havia outras doenças concomitantes no rebanho, que estariam afetando negativamente a saúde destes animais.

Outro aspecto observado durante a coleta foi a presença de carrapatos na região das orelhas de alguns dos animais, assim reforçando a importância da presença do vetor biológico na ocorrência da Theileriose nos rebanhos equídeos (RODRIGUES, 2018; SCHUEROFF et al., 2019; SANTOS et al., 2020).

Os jumentos são animais que apresentam alta rusticidade, força e resistência, podendo sobreviver em locais com altas temperaturas, escassez hídrica e alimento de baixa qualidade nutricional, fazendo deles, animais adaptáveis ao clima semiárido presente de forma significativa nos estados que compõem a região Nordeste do Brasil, desenvolvendo atividades de carga e tração, onde a maioria dos criadores de asininos é composto por agricultores familiares, (MARQUES et al., 2013; SALLES, 2013).

Em estudo realizado por Costa (2017), onde realizou a pesquisa de hemoparasitos em equídeos da microrregião de Ilhéus-Itabuna no Estado da Bahia por meio de técnica molecular, obteve um menor número de asininos (72,7%; 24/33) e muares (75%; 6/8) positivos para *T. equi* em relação aos equinos (84,3%; 445/528), sugerindo menor suscetibilidade dos mesmos à infecção, ou maior habilidade destas espécies em controlar a infecção.

Segundo Almeida (2009), após a mecanização dos meios de transporte, houve significativa diminuição dos asininos, os quais passaram a ser abandonados, abatidos e vítimas de acidente nas estradas. Essa situação se mostrou de forma marcante nesta pesquisa, uma vez que os animais envolvidos no presente estudo, se apresentavam em situação de total abandono, onde não se sabia a procedência ou idade dos mesmos.

O Brasil é considerado um país endêmico para a Theileriose onde a circulação deste protozoário já foi relatada em todas as regiões, revelando uma alta prevalência de *T. equi*, especialmente em equinos (LINHARES, 1994; PFEIFER-BARBOSA et al., 1995; BATTSETSEG et al., 2002; SANTOS et al., 2011; PECKLE et al., 2013).

Alguns autores citam a grande aplicabilidade a qual tem demonstrado a técnica de biologia molecular, na detecção e identificação de diversas espécies de hemoparasitos, incluindo o gênero *Theileria*, baseando-se no reconhecimento espécie específica, tendo como alvo principal o gene *18S rRNA* (CACCIO et al., 2000; CRIADO-FORNELIO et al., 2003; RAMPERSAD et al., 2003).

No presente trabalho optou-se pela utilização da técnica molecular para detecção de *T. equi*, tendo em vista os resultados encontrados por outros autores, onde demonstraram maior eficiência deste teste. Dória et al. (2016), realizou um estudo comparativo para detecção de hemoparasitas entre as técnicas de investigação molecular e esfregaço sanguíneo utilizando 30 equinos. Destes, 24 apresentaram-se positivos para *T. equi* através da técnica molecular, porém, apenas 10 animais demonstraram positividade através do esfregaço sanguíneo.

Outro estudo realizado por Rodrigues (2018), ao qual visava determinar a ocorrência de *T. equi* em amostras de sangue de 144 equinos, encontrou 36,80% (53/144) de positividade utilizando da técnica molecular, porém não foi visualizada a presença do hemoparasita no esfregaço sanguíneo.

Com relação a estudos comparativos entre as técnicas molecular e sorológica, como por exemplo o ELISA, este último pode apresentar aparente maior eficiência, devido a resultados falsamente positivos, desencadeados pela persistência de anticorpos em animais que já tiveram a doença, ou mesmo apresentar resultados soronegativos na detecção de infecções recentes, dependendo do nível de anticorpos (LEAL et al., 2011).

Em estudo realizado por Mahmoud et al. (2016), o objetivo era comparar os métodos diagnósticos de Piroplasmose, esfregaço sanguíneo, IFAT, nPCR e cELISA, utilizando amostras de sangue de 139 animais (88 cavalos e 51 burros). O exame microscópico direto detectou 19 (10 cavalos e 9 burros) amostras positivas para Piroplasmose equina; ao IFAT, 37 (21 cavalos e 16 burros) amostras deram positivas para *T. equi*; com a utilização do c-ELISA, obteve-se resultado positivo em 25 (13 cavalos e 12 burros) amostras; já com a técnica molecular foi possível detectar a presença deste hemoparasito em 54 (32 cavalos e 22 burros) amostras. Esses resultados demonstram maior eficiência dos testes moleculares na detecção

de infecções agudas antes dos testes sorológicos, uma vez que estes últimos necessitam de semanas para que haja produção/identificação de anticorpos.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados encontrados no presente trabalho, conclui-se que utilizando a técnica de qPCR foi possível detectar material genético de *T. equi* em jumentos naturalmente infectados no estado da Bahia, demonstrando a circulação desses hemoparasitos nos asininos. Diante disso, reforça-se a necessidade de maior atenção no cuidado sanitário e nutricional desses animais tão importantes à região Nordeste.

7. REFERÊNCIAS

- ALI, M. et al. The contribution of donkeys to human health. **Equine Veterinary Journal**, v.46, n. 6, p. 766–767, nov, 2014.
- ALMEIDA, L. D. Diversidade genética de raças asininas criadas no Brasil, baseada na análise de locos microssatélites e DNA mitocondrial. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília.
- ALSAAD, K. M.; ALSAAD, E. A.; AL-DERAWIE, H. A. Clinical and diagnostic study of equine babesiosis in drought horses in some areas of Basrah Province. **Research Journal of Animal Science**, v.4, n.1, p.16-22, 2010.
- ANTUNES, M. G. Hemoparasitoses em bovinos de carne. 2008.72f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2008.
- ARANGUREN-MENDEZ J.; GÓMEZ M.; JORDANA J. Hierarchical analysis of genetic structure in Spanish donkey breeds using microsatellite markers. **Heredity**, v.89, n. 3, p. 207-211,2002.
- BALDANI, C. D.; MACHADO, R. Z.; RASO, T. F.; PINTO, A. A. Serodiagnosis of *Babesia equi* in horses submitted to exercise stress. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n.4, p.179-183, 2007.
- BAPTISTA, C. M. Diagnóstico de infecções pelo protozoário *Theileria equi* em cavalos nos Açores por cELISA e nested-PCR. 2010. 78 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Zootécnica) – Departamento de Ciências Agrárias, Universidade dos Açores, Angra do Heroísmo, 2010.
- BARROS, M. N. D. L.; RIET-CORREA, F.; AZEVEDO, S. S.; LABRUNA, M. B. Off-host development and survival of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in the Brazilian semiarid. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 9, 2017. 17-24 p.
- BARZEV, G. Donkey utilisation in Bulgaria. In: Donkeys, People and Development, Eds: D. Fielding and P. Starkey, Animal Traction Network for Eastern and Southern Africa (ATNESA), Wageningen, the Netherlands. p.235. 2004.

BATTSETSEG, B.; LUCERO, S.; XUAN, X.; CLAVERIA, F.G.; INOUE N.; ALHASSAN, A.; KANNO, T.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; MIKAMI T.; FUJISAKI K. Detection of natural infection of *Boophilus microplus* with *Babesia equi* and *Babesia caballi* in Brazilian horses using nested polymerase chain reaction. **Veterinary Parasitology**, v.107, n.4, p.351- 357, 2002.

BESHBISHY, A. M.; BATIHA, G. E. S.; ALKAZMI, L.; NADWA, E.; RASHWAN, E.; ABDEEN, A.; YOKOYAMA, N.; IGARASHI, I. Therapeutic effects of atranorin towards the proliferation of *Babesia* and *Theileria* parasites. **Pathogens**, v. 9, n. 2, p. 1–14, 2020. <https://doi.org/10.3390/pathogens9020127>.

BRASIL, Câmara de Equideocultura do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Revisão do estudo do complexo do agronegócio do cavalo. Brasília, 2016. P. 4-47.

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

BURDEN, F.; THIEMANN, A. Donkeys Are Different. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 35, n. 5, p. 376–382, May, 2015.

CACCIO, S.; CAMMA, C.; ONUMA, M.; SEVERINI, C. The beta-tubulin gene of *Babesia* and *Theileria* parasites is an informative marker for species discrimination. **International Journal Parasitology**. v.30, p.1181–1185. 2000.

CAMPOS PEREIRA, M.; LABRUNA, M.B. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Chapter 3. In: CAMPOS PEREIRA, M.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P. J.; KLAFKE, G. M. (Eds.). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: biologia, controle e resistência. Medicina Veterinária, São Paulo, 2008.169 p.

CARRIJO JUNIOR, O. A.; MURAD, J. C. B. Animais de grande porte II. Copyright © 2016 por NT Editora. Brasília. Disponível em: <https://www.bibliotecaagptea.org.br/zootecnia/equinocultura/livros/ANIMAIS%20>. Acesso em: 10 de abril de 2021.

CHAUDHRY, M. et al. Comparative efficacy of various drugs used against naturally infected horses with babesiosis. **Science international (Lahore)**, v. 26, p. 267-271, 2014.

COSTA, S. C. L. Pesquisa de patógenos com importância em vigilância sanitária animal e humana em equídeos da microrregião de Ilhéus e Itabuna, Bahia – Brasil. 2017. 144f. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA.

COSTA, S. C. L.; FREITAS, J. S.; SILVA, A. N.; LACERDA, L. C.; CRUZ, R. D.; CARVALHO, F. S.; PEREIRA, M. J. S.; MUNHOZ, A. D. Frequency and factors associated with *Theileria equi*, *Babesia caballi* and *Trypanosoma evansi* in equids from Bahia (Northeast Brazil). **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v. 28, n. 1, p. 47-58, jan.-mar. 2019. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1984-296120180090>.

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

CRUZ, B. C. Aspectos ecológicos, biológicos e de resistência de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) na região de Jaboticabal, São Paulo, Brasil. (Tese doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Julho de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2017. 146 p.

CUNHA, C. W.; KAPPEMEYER, L. S.; MCGUIRE, T. C.; DELLAGOSTIN, O. A.; KNOWLES, D. P. Conformational dependence and conservation of an immunodominant epitope within the *Babesia equi* erythrocyte-stage surface protein *equi merozoite antigen 1*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, p. 1301-1306, 2002.

CUNHA, C.W.; MCGUIRE, T.C.; KAPPEMEYER, L.S.; HINES, S.A.; LOPEZ, A.M.; DELLAGOSTIN, O.A.; KNOWLES, D.P. Development of Specific Immunoglobulin G_a (IgG_a) and IgG_b Antibodies Correlates with Control of Parasitemia in *Babesia equi* Infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13 (2), p. 297-300, 2006.

DARWIN, C. A origem das espécies e a seleção natural origem. Tradução E. N. Fonseca. Curitiba: Ed. Hemus/Novo Século, 2000 1859, 786p.

DONNELLAN, C. M. B.; PAGE, P. C.; NURTON, J. P.; VAN DEN BERG, J. S.; GUTHRIE, A. J. (2013). Comparison of glycopyrrolate and atropine in ameliorating the adverse effects of imidocarb dipropionate in horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 45, n. 5, p. 625–629, 2013. <https://doi.org/10.1111/evj.12032>

DÓRIA, R. G. S.; PASSARELLI, D.; CHEQUER, T. N.; MORANDINI, G. R.; HAYASAKA, Y.; FANTINATO NETO, P.; GRIGOLETTO, R.; FREITAS, S. H. de. Investigação clínica e comparação do esfregaço sanguíneo e PCR para diagnóstico de hemoparasitas em equinos de esporte e tração (carroceiros). **Pesquisa Veterinária Brasileira (Online)**, v. 36, p. 724-730, 2016.

FARIAS, N. A. Babesiose equina. In: Riet-Correa F. et al. **Doenças de Ruminantes e Equinos**. 3ª Ed., Vol.2, Santa Maria/RS: Pallotti, 2007, p. 533-537.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2014) - The role, impact and welfare of working (traction and transport) animals. Animal Production and Health Report. No. 5. Report of the FAO Headquarters. 13th-17th June 2011. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization. 36 pp.

FITSUM, M.; AHMED, K. M. (2015). Population dynamic production statistics of horse and ass in Ethiopia: a review. **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, 5 (1), 57-62.

FONSECA, R. S. Carrapatos em Equinos - Definição, Diagnóstico e Tratamento. CPT Cursos Presenciais. Minas Gerais, abr. 2010. Disponível em: <<http://www.cptcursospresenciais.com.br/artigos/equinos/saude-equina/carrapatos-em-equinos--definicao-diagnostico-e-tratamento/>>. Acesso em: 11 jun. 2021.

GARCIA, M. V.; RODRIGUES, V. S.; KOLLER, W. W.; ANDREOTTI, R. BIOLOGIA E IMPORTÂNCIA DO CARRAPATO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos. 1ed. Brailia: Embrapa, 2019, v.1, p. 17-25.

GIMENEZ, F.; HINES, S. A.; EVANOFF, R. et al. *In vitro* growth inhibition of *Theileria equi* by bumped kinase inhibitors. **Veterinary Parasitology**, v. 251, p. 90-94, 2018.

GOODWIN, D. (2007) Horse Behavior: Evolution, Domestication and Feralisation. Em: Waran N. (eds) The Welfare of Horses. **Animal Welfare**, vol 1. Springer, Dordrecht.

GRAUSE, J. F.; UETI, M. W.; NELSON, J. T. et al. Efficacy of imidocarb dipropionate in eliminating *Theileria equi* from experimentally infected horses. **The Veterinary Journal**, v. 196, n. 3, p. 541-546, 2013.

GRINDER, M.I.; KRAUSMAN P.R.; HOFFMAN, R.S. *Equus asinus*. Mammalian species.794: p.1-9.2006.

HAWKINS, E.; KOCK, R.; McKEEVER, D.; GAKUYA, F.; MUSYOKI, C.; CHEGE, S. M.; MUTINDA, M.; KARIUKI, E.; DAVIDSON, Z.; LOW, B.; SKILTON, R. A.; NJAHIRA, M. N.; WAMALWA, M.; MAINA, E. Prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* as well as the identification of associated ticks in sympatric grevy's zebras (*Equus grevyi*) and donkeys (*Equus africanus asinus*) in northern Kenya. **Journal of Wildlife Diseases**. 1 January 2015; 51 (1): 137–147.

HENRY, M. et al. Asininos: animais com características sociais e reprodutivas próprias. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.33, n.4, p.223-230, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Censo Agropecuário 2017. Disponível em: <https://censos.ibge.gov.br/agro/2017>.

JARDIM, L. S. Babesiose em equinos. **Patologia Veterinária**. Rio Grande do Sul, out. 2014. Disponível em: <http://patologiaveterinaria12.blogspot.com.br/2014/10/babesiose-em-equinos.html>. Acesso em: 17 jun. 2021.

KERBER, C.E. Piroplasmose 2005. Paddock Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias. Disponível em: <http://www.bichoonline.com.br/artigos/Xck0001.html> Acesso em: 28 de dezembro de 2021.

KIM, C.; 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. **Veterinary Parasitology**, v.151, n.2-4, p.158–163, 2008.

LAUS, F.; SPATERNA, A.; FAILLACE, V.; VERONESI, F; RAVAGNAN, S; BERIBÉ, F.; CERQUETELLA, M; MELIGRANA, M; TESEI, B. Investigação clínica das infecções por *Theileria equi* e *Babesia caballi* em burros italianos. **BMC Veterinary Research** 11, 100 (2015).

LAVERAN, A. Contribution a l'etude du *Piroplasma equi*. **Comptes Rendus des Seances de La Societé de Biologie**, v.12, n.1, p.385-389, 1901.

LEAL, D. C. Avaliação da PCR, PCR multiplex e nested PCR no diagnóstico de *Theileria equi* em equinos. 2010.56 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) - Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

LEAL, D. C. et al. Evaluation of PCR and multiplex PCR in relation to nested PCR for diagnosing *Theileria equi*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.7, p.575-578, 2011.

LEUTENEGGER, C. M. The Real-Time TaqMan PCR and Applications in Veterinary Medicine. **Veterinary Sciences Tomorrow**, n.1, 2001.

LINHARES, G.F.C. Aspectos biológicos e epidemiológicos das babesioses de equídeos, com ênfase à microrregião de Goiânia, Goiás, Brasil. 1994. 105f. Tese (Doutorado em Ciência). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

LORENZO, J.: Conocimiento y conservacion de las razas autoctonas: El asno Zamorano-Leones, estudio actual de lar aza em la provincia de Zamora; valoracion general: Aspectos biopatologicos y funcionales. Tesis Doctoral, Universidad de Leon, Leon, Espanha, 1997.

LUPPI, M.M.C.P.; BORELLI, V. Aspectos morfológicos dos componentes do funículo espermático em jumentos nordestinos. **Revista Instantânea Ciência e Saúde**. p.379-384, 2007.

MACEDO, M. H. R.; MOTTA, L. C. A.; BALBUENO, M. C. S.; COELHO, C. P. Homeopathic treatment in clinical manifestations of *Theileria equi* in a stable horse: Case report. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 7, n. 5, p. 46916-46927. may. 2021.

MACHADO, R. Z.; TOLEDO, C. Z. P.; TEIXEIRA, M. C. A.; ANDRÉ, M. R.; FRESCHI, C. R.; SAMPAIO, P. H. Molecular and serological detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in donkeys (*Equus asinus*) in Brazil, **Veterinary Parasitology**, v. 186, Issues 3–4, 2012, 461-465.

MAHMOUD, M. S.; EL-EZZ, N. T. A.; ABDEL-SHAFY, S.; NASSAR, S. A.; NAMAKY, A. H.; KHALIL, W. K. B.; KNOWLES, D.; KAPPMAYER, L.; SILVA, M. G.; SUAREZ, C. E. Assessment of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in equine populations in Egypt by molecular, serological and hematological approaches. **Parasites Vectors** 9, 260 (2016). <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1539-9>

MARIANTE, A.; CAVALCANTE, N. Animais do descobrimento: raças domésticas da história do Brasil. **Circular Técnico Embrapa**, 2006. Disponível em <http://www.embrapa.com.br>. Acesso em 02/09/2021.

MARQUES, D. D.; NETO, P. I. N.; DOS SANTOS CARVALHO, K. Emprego da cola de cianoacrilato em feridas cutâneas de asininos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 1, p. 74-80, 2013.

MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. The piroplasms: life cycle and sexual stages. **Advances in Parasitology**, v. 23, n.1, p.37-103, 1984.

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.

MONTEIRO, S. G. Parasitologia na medicina veterinária / Silvia Gonzalez Monteiro. – 2. ed. – Rio de Janeiro: Roca, 2017.

NANTES, J. H. et al. Nutaliose: Revisão de Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, São Paulo, p. 1679-7353, 2008.

NICOLAIEWSKY, T.B. et al. Detection of *Babesia equi* (Laveran, 1901) by nested polymerase chain reaction. **Veterinary Parasitology**, v.101, n.1, p.9-21, 2001.

NIZOLI, L. Q. Alterações hematológicas e humorais de equinos expostos à infecção por *Babesia equi*, na região sul do Rio Grande do Sul. 2005. 39p. (Mestrado) – Universidade Federal de Pelotas.

NUTTALL, G.H.F.; STRICKLAND, C. On the occurrence of two species of parasites in equine piroplasmiasis or biliary fever. **Parasitology**, London, v.12, n.1, p.65-69, 1910.

OGUNREMI, O.; HALBERT, G.; MAINAR-JAIME, R.; BENJAMIN, J.; PFISTER, K.; LOPEZ-REBOLLAR, L.; GEORGIADIS, M. P. Accuracy of an indirect fluorescent-antibody test and of a complement-fixation test for the diagnosis of *Babesia caballi* in field samples from horses. **Preventive Veterinary Medicine**. Canadá, v.1, n. 83, p. 41-51, ago. 2008.

OHTA, M.; KAWASU, S.; TSUJI, N. Rapid and sensitive method for detection of newly isolated *Babesia* parasite (*Babesia* spp.) in the anticipated vector-tick using the polymerase reaction technique. **Journal of Protozoology Research**, v.5, n.1, p.108-117, 1995.

OIE, Organização Mundial da Saúde Animal. **Terrestrial Manual: Equine Piroplasmiasis**. Paris, 2014, p. 1-10.

OLIVEIRA, A. R.; PINHEIRO, G. R. G.; SOUZA, T. D.; FLECHER, M. C.; SANTOS, R. L., Abortion in association with transplacental *Theileria equi* infection in a mare from the State of Espírito Santo, southeast Brazil: case report. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.71, n.2, p.369-373, 2019.

OLIVEIRA, G. L. S.; SILVA, A. P. D. S. C. L. Evaluation of the non-clinical toxicity of an antiparasitic agent: diminazene aceturate. **Drug and Chemical Toxicology**, p. 1-11, 2021. <https://doi.org/10.1080/01480545.2021.1894741>.

PAULAUSKAS, A.; RADZIJEVSKAJA, J.; AMBRASIENE, D.; ROSEF, O. Detection of tick-borne pathogens by molecular methods. **Biologija**, v.54, n.3, p.192–197, 2008.

PECKLE, M. P. Aspectos epidemiológicos e hematológicos de equinos naturalmente infectados por *Theileria equi* (Piroplasmida: Theileriidae) e sua associação com carrapatos no Estado do Rio de Janeiro. 2013. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – RJ, 2013.

PECKLE, M.; PIRES, M.S.; DOS SANTOS, T.M.; ROIER, E.C.; DA SILVA, C.B.; VILELA, J.A.; SANTOS, H.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, n.5 p.2017-2025, 2013.

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.

PIEREZAN, F. Prevalência das doenças de equinos no rio grande do sul. 2009. 162 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Veterinária) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

PIMENTEL, M. M. L., et al. Parâmetros biométricos de asininos (*Equus asinus*) utilizados em provas de corrida no estado do Rio Grande do Norte. **Acta Veterinária Brasileira**, v.8. p.136-143. 2014.

PIOTTO, M. A. Determinação da infecção por *Theileria equi* e *Babesia caballi* em equinos alojados no Jockey Clube de São Paulo por meio da técnica de C-ELISA (Competitive Enzyme Lynked Immunosorbent Assay). 2009.63 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) -Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

POLIDORI, P.; VINCENZETTI, S. (2012). Protein Profile Characterization of Donkey Milk. Disponível em: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/38824.pdf> Acesso em 09 jun. 2021.

POLIDORI, P.; VINCENZETTI, S. (2013) - Use of donkey milk in children with cow's milk protein allergy. **Foods**, 2, 151-159.

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

POTGIETER, F.T.; DE WAAL, D.T.; POSNETT, E.S. Transmission and diagnosis of equine babesiosis in South Africa. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, v.87, n.3, p.139-142, 1992.

RAHMAN, S.A.; REED, K. (2014). The management and welfare of working animals: identifying problems, seeking solutions and anticipating the future. **Revue Scientifique et Technique International Office of Epizootics**, 33 (1), 197-202.

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

REGAN, F.H.; HOCKENHULL, J.; PRITCHARD, J.C.; WATERMAN-PEARSON, A.E.; WHAY, H.R. (2014). Behavioural repertoire of working donkeys and consistency of behaviour over time, as a preliminary step towards identifying pain-related behaviours. **PLOS ONE**, 9(7): e101877. Doi:10.1371/journal.pone.0101877.

REGO, B. M. D. Estudo da infecção natural por protozoários dos gêneros *Babesia* e *Theileria* numa exploração coudélica do Ribatejo. 2008. 78 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária. 2008.

RIVERA-CERVANTES, M.; VARGAS-SANDOVAL, M.; RAMOS-LIMA, M.; AYALA-ORTEGA, J. J.; LARA-CHÁVES, M. B. N.; ÁVILA-VAL, T. C.; GUTIERREZ-CONTRERAS, M.: Acción de *Metarhizium anisopliae* en *Rhipicephalus (B.) microplus* sobre ganado bovino. **Entomología mexicana**, 4: 213–219 (2017).

RODRIGUES, D. Detecção de *Theileria equi* por Reação em Cadeia da Polimerase em amostras de sangue de equinos no Rio Grande do Sul. 2018, 46f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS, 2018.

ROSSEL, S.; et al. Domestication of the donkey: Timing, processes and indicators. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 2008, v.10, p. 3715-3720.

SALLES, P. D. A.; SOUSA, L. D. O.; GOMES, L. P. B.; BARBOSA, V. V.; DE MEDEIROS, G. R.; DE SOUSA, C. M.; WELLER, M. Análise populacional dos equídeos no Semiárido Paraibano. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 3, 2013.

SANTOS, T. M. Agentes da Theileriose e da anaplasmosose granulocítica em equídeos de microrregiões do estado do Rio de Janeiro. 2011. 103 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, 2011.

SANTOS, T.M.; ROIER, E.C.R.; SANTOS, H. A.; PIRES, M.S.; VILELA, J.A.R.; MORAES, L.M.B.; ALMEIDA, F.Q; BALDANI, C.D.; MACHADO; R. Z.; MASSARD; C.L. Factors associated to *Theileria equi* in equids of two microregions from Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.20, n.2, p.235-241, 2011.

SANTOS, A. C. ; CUNHA, R. C. ; WEEGE, G. B. ; VIANNA, A. M. . *Theileria equi* e Piroplasmosose equina. 1. ed. Pelotas: Cópias Santa Cruz, 2020. v. 1. 43p.

SCHUEROFF, D. M. ; NAVOLAR, F. M. N. ; PAULA, G. R. ; PIRES, L. R. ; PEREIRA, T. P. S. ; MARCONDES, J. G. R. . Babesiose e Theileriose em Equinos - Revisão de Literatura. **Ciência Veterinária UniFil** , v. 1, p. 42-57, 2019.

SIGRIST, B. 1983. 58p. Ubertragung von *Babesia equi* durch *Hyalomma anatolicum anatolicum* und *Rhipicephalus turanicus*. Thesis, Hannover School of Veterinary Medicine. 1983.

SIMON, H.; XIAOLING, Z.; NIKKHAH, A. Equidae milk promises substitutes for cow and human breast milk. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 36, p. 470-475, 2012.

SILVA, J. R.; NARITA, C. T.; BERTÉLI, M.B.D. et al. Avaliação das alterações quantitativas ocasionadas nas plaquetas decorrentes da ação do tempo e variação da temperatura. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 9, n. 1, p. 57-57, 2011.

SOUTO, P. C.; CRUZ, J. A. L. O.; BOTELHO-ONO, M. S.; DANTAS, A. C.; GUIMARÃES, J. A.; VAZ, B. B. D. Babesiose equina por *Theileria equi* – Relato de Caso. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife, v. 17, n. 3, p. 29-29, 2014.

STRINGER, A. P. (2014). Infectious diseases of working equids. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, 30 (3), 695-718.

SÜSSEKIND, F.; AZEVEDO, E. M. A controvérsia dos jegues: tabus alimentares e espécies companheiras no Nordeste. **Caderno Eletrônico de Ciências Sociais**, Vitória, v. 7, n. 2, pp. 10-26, 2019.

TAYLOR, M. A. Parasitologia veterinária/M. A. Taylor, R. L. Coop, R. L. Wall; tradução José Jurandir Fagliari, Thaís Gomes Rocha. – 4. ed. – Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2017.

THOMASSIAN, A. Enfermidades dos cavalos, 4ª Ed., São Paulo: Livraria Varela, 574p., 2005.

TORRES, A. J. ; FINGER, I. ; FARIAS, N. ; NIZOLI, L. Q. ; Nogueira, C.E.W. ; SILVA, S. S. . Aspectos epidemiológicos da Theileriose equina e sua relação com o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em duas propriedades na região da campanha do Rio Grande do Sul - Brasil. **Revista Iberolatinoamericana de Parasitologia** , v. 71, p. 70-77, 2012.

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.

VALETTE, D. (2014). Invisible Helpers: Women's views on the contributions of working donkeys, horses, and mules to their lives. Key findings from research in Ethiopia, Kenya, India and Pakistan. *In: Voices from Women. International Report.* The Brooke, London, UK. 46 pp.

VIEIRA, M. C., PERCEPÇÕES DE PRÁTICAS DE MANEJO EM ESTABELECIMENTOS EQUESTRES QUANTO À INFLUÊNCIA DESSAS PRÁTICAS PARA O BEM-ESTAR DE EQUINOS. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Brasil. Florianópolis, p. 100. 2015.

WISE, L. N. et al. Review of Equine Piroplasmiasis. **Review Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, p. 1334-1346, 2013.

WISE, L. N. et al. Equine Piroplasmiasis. The veterinary clinics of North America. **Equine practice**, v. 30, n.3, p. 677-693, 2014.

ZEIBIG, E. A. Parasitologia clínica: uma nova abordagem clínico-laboratorial. São Paulo: Elsevier Medicina Brasil, 2014. 392p.

ZEWDIE, B.; WELDAY, K.; PAL, S. (2015). Conservation of indigenous donkey breeds of ethiopia: a review. **International Journal of Interdisciplinary and Multidisciplinary Studies**, 2 (6), 13-22

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

ANEXO I



ANEXO II



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "*Sauidade de asininos vulneráveis em Camudos/Bahia*", registrada com o nº 21/2019, sob a responsabilidade do pesquisador Prof. Dr. Pierre Barnabé Escodro, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (CEUA/UFAL), em reunião de 14 de novembro de 2019.

Vigência da autorização	26.11.2019 a 26.11.2020
Especie/linhagem/raça	Equídeo / Equus asinus
Nº de animais	180
Peso/idade	-
Sexo	65 machos e 115 fêmeas
Origem/Local de manutenção	Fazenda Santa Isabel – Camudos-Bahia / No mesmo local de origem
Colaboradores	Adroaldo Zanella, Frederico Rodrigues, Aline Silva Patrícia Tatenoto, Sidney Sakamoto, Chiara Oliveira, Manuela Testa, Lucas Fonseca, Rayane Nascimento, Jarbiane Oliveira, Amanda Graboschi, Yane Moreira, Yana Vargas, Juan Brito e Ivana Carmo

Maceió, 14 de novembro de 2019.

Elvan Nascimento dos Santos Filho
Coordenador da CEUA
SIAPE 1756479

ANEXO III

