

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**VETERINÁRIAS**  
**PARASITOLOGIA VETERINÁRIA**

**TESE**

**Biologia, Diagnóstico Morfológico e Molecular da  
Infecção Experimental e Natural de *Babesia equi*  
(Laveran, 1901) em *Boophilus microplus*  
(Canestrini, 1887).**

**KÁTIA ROBERTA FERNANDES**

**2007**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS  
PARASITOLOGIA VETERINÁRIA**

**BIOLOGIA, DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO E MOLECULAR  
DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL E NATURAL DE *Babesia equi*  
(LAVERAN, 1901) EM *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887).**

**KÁTIA ROBERTA FERNANDES**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Carlos Luiz Massard**

*e Co-orientação dos Professores*  
**Jairo Dias Barreira**  
**Fernando Queirós de Almeida**

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

Seropédica, RJ  
Março de 2007

6346.10896

936

F363b

T

Fernandes, Kátia Roberta, 1973-  
Biologia e diagnóstico  
morfológico, molecular da infecção  
experimental e natural de Babesia  
equi (Laveran, 1901) em Boophilus  
microplus (Canestrini, 1887)/ Kátia  
Roberta Fernandes. - 2007.  
48f. : il.

Orientador: Carlos Luiz Massard.  
Tese (doutorado) - Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro,  
Instituto de Veterinária.

Bibliografia: f. 41-48.

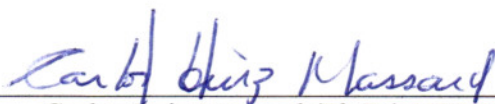
1. Babesiose em cavalo - Teses.  
2. Babesiose em cavalo -  
Diagnóstico - Teses. 3. Babesia -  
Biologia - Teses. I. Massard.  
Carlos Luiz, 1948-. II.  
Universidade Federal Rural do Rio  
de Janeiro. Instituto de  
Veterinária. III. Título.

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

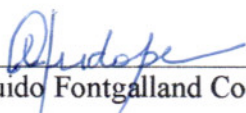
**KÁTIA ROBERTA FERNANDES**

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

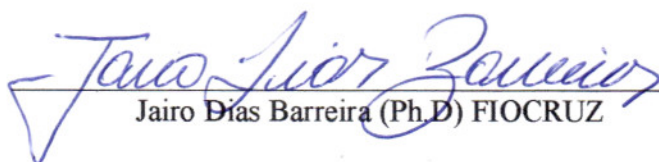
TESE APROVADA EM 26/02/2007



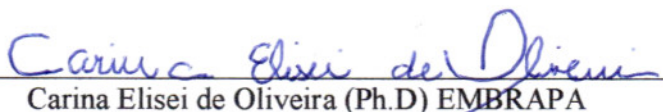
Carlos Luiz Massard (Ph.D.) UFRRJ  
(Orientador)



Guido Fontgalland Coelho Linhares (Ph.D) UFG



Jairo Dias Barreira (Ph.D) FIOCRUZ



Carina Elisei de Oliveira (Ph.D) EMBRAPA



Paulo de Tarso Landgraf Botteon (Ph.D) UFRRJ

*Dedico a minha filha Amanda a razão da  
minha vida. Pela compreensão durante todos  
os momentos difíceis e por ser uma pessoa  
linda que me encanta a cada dia, com sua  
meiguice e alegria.*

*Te amo!!!*

*(IN MEMORIAN)*

*A meus pais Cláudio e Marina por abrir as  
portas para o meu futuro, iluminando o meu  
caminho com a luz mais brilhante que  
puderam encontrar: O ESTUDO*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelos momentos de reflexão

Ao professor e orientador Dr<sup>o</sup>. Carlos Luiz Massard, pela orientação, ensinamentos e confiança durante a realização deste trabalho; meu agradecimento por todo apoio, estímulo e amizade;

A Anselmo Afonso Golynski pela colaboração, amizade, compreensão e pelo incentivo que foi dedicado no decorrer deste trabalho;

Aos professores Dr<sup>o</sup>. Fernando Queiros de Almeida e Dr<sup>o</sup>. Jairo Dias Barreira pela valiosa e oportuna orientação para a realização deste trabalho;

Aos professores Dr<sup>o</sup>. Gonzalo Efrain Moya Borja e Dr. Adivaldo Henrique da Fonseca, pelos conselhos elucidativos concedidos ao longo do curso;

A professora Dr<sup>a</sup>. Tereza Cristina Bergamo Bomfim, pelo auxílio na realização das fotos que ilustram este trabalho;

Ao professor Dr<sup>o</sup>. Guido Fontgaland Coelho Linhares e a sua orientada Sabrina Castilho pela imensa contribuição a este trabalho, permitindo a realização das reações moleculares e principalmente pela amizade com que tiveram comigo, obrigada;

A pesquisadora Dr<sup>a</sup>. Kátia Regina dos Santos Texeira, pela orientação e colaboração no processamento das amostras para a análise molecular,

A amiga Dr<sup>a</sup>. Carina Elisei de Oliveira, pelo prestimoso auxílio e contribuição durante toda a realização deste trabalho e pela amizade, estímulo e palavras amigas nos momentos mais difíceis, obrigada também pelo carinho com a minha filha Amanda, durante todos estes anos, você estará sempre em nossos corações;

As amigas: Maria Forlano, Alessandra Scofield, Renata Madureira, Franziska Huber e Sandra Borges que participaram desta fase de minha vida, dando-me apoio e estímulo e acima de tudo pela amizade e carinho;

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação, em especial, ao Luiz Eduardo, Thiago Bahiense, Eliane e Paulo pela amizade;

Aos colegas do Laboratório de Protozoologia em especial, Afrânio Silva Madeiro, Gil Vicente, Huarrisson e Marcos Franque, pela amizade e apoio;

Ao meu irmão Alan Clayton Fernandes, pela amizade, carinho e incentivo incondicional;

A família Golynski, em especial Janete, Audérico e Alex pela agradável convivência, amizade e apoio.

E a todos os demais docentes do curso de Pós-Graduação em Parasitologia Veterinária, que contribuíram para a minha formação profissional e pessoal;

Aos funcionários do Departamento de Parasitologia Veterinária pelo auxílio prestado, em especial, ao Sr. Severino (Raminho), Ivana, Ley e Leonardo.

Aos funcionários da Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz; em especial aos senhores Archanjo, Oswaldo, Gilmar e Mauro pela inestimável colaboração com o manejo dos equinos;

A CAPES, pelo apoio financeiro;

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!!!!

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	2
2.1 Histórico.....	2
2.2 Taxonomia.....	2
2.3 Distribuição geográfica.....	3
2.4 Transmissão.....	4
2.5 Ciclo Biológico.....	5
2.5.1 Biologia de <i>B. equi</i> no hospedeiro vertebrado.....	5
2.5.2 Biologia de <i>B. equi</i> no vetor.....	5
2.5.2.1 Gametogonia.....	5
2.5.2.1 Esporogonia.....	6
2.6 Diagnóstico por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).....	7
<b>CAPÍTULO I - DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO E MOLECULAR DA INFEÇÃO EXPERIMENTAL DE <i>Babesia equi</i> (LAVERAN, 1901) EM <i>Boophilus microplus</i> (CANESTRINI, 1887)</b> .....	9
<b>RESUMO</b> .....	10
<b>ABSTRACT</b> .....	11
<b>I INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	14
2.1 Local do Experimento.....	14
2.2 Obtenção e Manutenção dos animais.....	14
2.3 Obtenção e Manutenção de <i>B. microplus</i> não Infectados.....	14
2.4 Obtenção de <i>B. microplus</i> Infectados Experimentalmente por <i>B. equi</i> .....	14
2.5 Avaliação da Infecção por <i>B. equi</i> em Ninfas, Fêmeas e Machos de <i>B. microplus</i> .....	14
2.5.1 Obtenção e exame das amostras de hemolinfa de ninfas, fêmeas e machos... 15	15
2.5.2 Dissecção de ninfas, fêmeas, e machos.....	15
2.6 Obtenção de Ovos e Larvas de <i>B. microplus</i> .....	15
2.7 Análises Morfológicas e Morfométricas.....	16
2.8 Detecção molecular de <i>B. equi</i> em <i>B. microplus</i> .....	16
2.8.1 Obtenção de DNA a partir de amostras de glândulas salivares de ninfas, fêmeas e machos de <i>B. microplus</i> .....	16
2.8.2 Obtenção de DNA a partir de amostras de ovos e larvas de <i>B. microplus</i> .....	16
2.8.3 Reação de Amplificação.....	17
2.8.4 Eletroforese e DNA em gel de agarose.....	17
<b>3 RESULTADOS</b> .....	19
3.1 Avaliação Clínica dos Equinos Infectados Naturalmente por <i>B. equi</i> .....	19
3.2 Desenvolvimento de <i>B. equi</i> no Intestino de Ninfas, Fêmeas e Machos de <i>B. microplus</i> .....	19



3.3 Análise das Amostras de Hemolinhas de Ninfas, Fêmeas e Machos de <i>B. microplus</i> .....	19
3.4 Desenvolvimento de <i>B. equi</i> em Glândulas Salivares de <i>B. microplus</i> .....	21
3.4.1 Microscopia óptica .....	21
3.4.2 Amplificação de DNA de <i>B. equi</i> em glândulas salivares de ninfas, fêmeas e machos de <i>B. microplus</i> .....	25
3.5 Amplificação de DNA de <i>B. equi</i> em Ovos e Larvas de <i>B. microplus</i> .....	25
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	27
<b>CAPÍTULO II - DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO E MOLECULAR DE <i>Babesia equi</i> EM GLÂNDULAS SALIVARES DE NINFAS E ADULTOS DE <i>Boophilus microplus</i> (ACARI: IXODIDAE) INFECTADOS NATURALMENTE NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - BRASIL</b> .....	
	30
<b>RESUMO</b> .....	31
<b>ABSTRACT</b> .....	32
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	33
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	34
2.1 Obtenção das Amostras de <i>B. microplus</i> .....	34
2.2 Dissecção de Ninfas e Adultos de <i>B. microplus</i> .....	34
2.3 Detecção Molecular de <i>B. equi</i> em Glândulas Salivares de Ninfas e Adultos de <i>B. microplus</i> .....	34
2.3.1 Obtenção de DNA a partir de glândulas salivares de ninfas e adultos de <i>B. microplus</i> .....	34
2.3.2 Reação de Amplicação.....	35
2.3.3 Eletroforese de DNA em gel de agarose.....	35
<b>3 RESULTADOS</b> .....	36
3.1 Desenvolvimento de <i>B. equi</i> em Glândulas Salivares de Ninfas e Adultos de <i>B. microplus</i> Infectados Naturalmente.....	36
3.2 Detecção de DNA de <i>B. equi</i> em Glândulas Salivares de Ninfas e Adultos de <i>B. microplus</i> por PCR.....	36
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	38
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	40
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	41

## RESUMO

FERNANDES, Kátia Roberta. **Biologia, Diagnóstico morfológico e molecular da infecção experimental e natural de *Babesia equi* (Laveran, 1901) em *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887)**. 2007, 48p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a infecção natural e experimental de *Babesia equi* em ninfas e adultos de *Boophilus microplus* por meio de microscopia óptica e análise molecular. A infecção experimental foi observada a partir de ninfas, machos, fêmeas, ovos e larvas não alimentadas de *B. microplus* alimentados em equinos com infecção crônica por *B. equi*. Para a realização do experimento foram utilizados dois equinos, mestiços, com infecção por *B. equi*. Os animais foram infestados com larvas de *B. microplus* de geração F4 obtidas de colônia mantida em laboratório e livres de infecção por *Babesia* spp. A partir da ecdise para ninfa foram realizadas coletas diárias. Após a coleta foram realizados os exames de hemolinfa e extração do intestino e das glândulas salivares os quais foram macerados em lâminas de vidro para microscopia, fixados em metanol e corados com Giemsa. As glândulas salivares dissecadas foram divididas em duas partes. A primeira parte foi macerada em lâminas de vidro para microscopia, corada com corante Giemsa e observada em microscópio ótico para análise morfológica. A segunda parte foi realizada a extração de DNA, sendo submetida a PCR com *primers* específicos para o gene 18S rRNA para *B. equi*. Foram dissecados 860 espécimes (ninfas= 432; fêmeas= 280 e machos= 148). Na microscopia óptica foi possível observar nas hemolinfas das ninfas a presença de cinetos com aspecto claviforme típicos do gênero *Babesia*. Nas glândulas salivares, a morfologia e a seqüência dos estágios de desenvolvimento de *B. equi* das ninfas de *B. microplus*, foram observadas a partir do 4º dia após ecdise, sendo possível observar nos ácinos celulares a formação de esporoblastos e de esporozoítas ovóides medindo 1,5 µm de diâmetro e alongados medindo 3,8 a 5,2µm de comprimento e 0,8 a 1,5µm de largura. A reação em cadeia de polimerase (PCR) confirmou a presença de *B. equi* em DNA de glândulas salivares extraídas de ninfas, machos, fêmeas, assim como dos ovos e larva. A infecção natural foi observada a partir de ninfas e adultos de *B. microplus* coletados de dois equinos naturalmente infestados e comprovadamente infectados por *B. equi*, procedentes do município de Seropédica, Rio de Janeiro. Foram dissecados 324 espécimes (ninfas= 145, fêmeas= 138 e machos= 41). O processamento das glândulas salivares dissecadas foi semelhante ao descrito para infecção experimental. Das glândulas salivares submetidas a PCR, 70% apresentaram resultados positivos para *B. equi*. As análises por microscopia óptica das glândulas salivares das ninfas e dos adultos revelaram a presença nos ácinos celulares os estágios de esporoblastos e o desenvolvimento de esporozoítas alongados. As análises morfológicas, morfométricas e moleculares confirmaram a infecção experimental e natural das glândulas salivares de ninfas e adultos de *B. microplus* por *B. equi*. Os resultados deste estudo demonstram a capacidade de multiplicação de *B. equi* em glândulas salivares de ninfas e adultos de *B. microplus*. A detecção de DNA de *B. equi* em ovos e larvas de *B. microplus* também sugere a possibilidade da transmissão transovariana nesta espécie de carrapato. Estes resultados sugerem que o carrapato *B. microplus* é vetor biológico de *B. equi* na região estudada.

**Palavras chaves:** *Theileria equi*, equino, babesiose equina, reação em cadeia de polimerase, esporogonia, glândula salivar, vetor

## ABSTRACT

FERNANDES, Kátia Roberta. **Biology, Morphologic and molecular diagnosis of the experimental and natural infection of *Babesia equi* (Laveran, 1901) in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887)**. 2007. 48p. (Doctor in Sciences Veterinary, Parasitology Animal). Veterinary Institute, Animal Parasitology Department, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

The aim of the present study was to evaluate the natural and experimental infection of *B. equi* in nymphs and adult *Boophilus microplus* using optical microscopy and molecular analysis. The experimental infection was observed in nymphs, males and females of *B. microplus* fed on equines chronically infected with *B. equi* and in non fed larvae and eggs. For the experiments two equines, of not defined breed, proven to be infected with *B. equi* were used. The animals were infested with *B. microplus* larvae of generation F4 obtained from a laboratory maintained population, known to be free of *Babesia* spp. infection. Daily collections of ticks were realized using as starting point the ecdysis to nymph state. After the collection the hemolymph was examined and the intestine and salivary glands were dissected, smashed on glass slides for microscopy, methanol treated and stained with Giemsa. There were dissected 860 specimens (432 nymphs, 280 females and 148 males). The dissected salivary glands were divided into two parts. The first one was smashed on microscopy glass slides, stained and examined by optical microscopy for morphologic analyses. From the second part was realized DNA extraction and PCR with specific primers for the 18S rRNA. On optical microscopy of nymph hemolymph was possible to be observed the presence of kinetes with claviform aspect characteristic for the genus *Babesia*. In the salivary glands of *B. microplus* nymphs the morphology and the sequence of developmental stages of *B. equi* were observed initiating on day 4 after ecdysis, being possible to see in acinary cells the formation of sporoblasts and ovoid sporozoites measuring 1.5  $\mu\text{m}$  of diameter and elongated sporozoites with 3.8 to 5.2  $\mu\text{m}$  of length and 0.8 to 1.5  $\mu\text{m}$  of width. The PCR confirmed the presence of *B. equi* in DNA samples extracted from salivary glands of nymphs, male and female ticks as well as in larvae and eggs. To evaluate the natural infection were collected nymphs and adult *B. microplus* from two equines naturally infested by these ticks and naturally infected with *B. equi*. These horses were originated from Seropédica city in the state of Rio de Janeiro. There were dissected 324 specimens (145 nymphs, 138 females and 41 males). The proceedings with the salivary glands were identical to the previously described for the experimental infection. Of the salivary glands submitted to PCR, 70% showed to be infected with *B. equi*. Microscopical analysis of the salivary glands revealed the presence of sporoblast stages and the development of elongated sporozoites in acinary glands. The morphologic, morphometric and molecular analysis confirmed the experimental and natural infection of the salivary glands of nymphs and adult *B. microplus* with *B. equi*. The results of the present study show the ability of *B. equi* to develop in this tick species. The detection of *B. equi* DNA in eggs and larvae also suggests the possibility of transovarian transmission in *B. microplus*. The results allow to consider the tick *B. microplus* as a potential biologic vector of *B. equi* in horses from the studied region.

**Key words:** *Theileria equi*, equine babesiosis, horse, polymerase chain reaction, sporogony, salivary glands, vector.

## 1 INTRODUÇÃO

A babesiose eqüina, comumente conhecida como piroplasmose eqüina é uma doença, causada por protozoários intraeritrocíticos, *Babesia caballi* e *Babesia equi*, que acomete eqüinos, asinimos, pôneis, muares e zebras. É uma enfermidade caracterizada por piroxia, anemia hemolítica, icterícia, hepato e esplenomegalia, hemoglobinúria e bilirrubinúria em função da eritrólise que determina em alguns casos, até a morte. No entanto, a grande maioria dos animais afetados torna-se portadores, permanecendo nesse estado por longos períodos e atuando como fonte de infecção para os carrapatos vetores (DE WALL, 1992).

É uma doença cosmopolita, considerada emergente nos países subtropicais, e presente em áreas que abrigam 90% da população eqüina mundial. Considerada atualmente, como o principal impedimento para o trânsito internacional de equinos, em virtude, dos animais portadores serem um risco de transmissão para uma população livre da piroplasmose. Estas restrições que atinge também o Brasil, por apresentar áreas consideradas endêmicas para esta hemoparasitose, geram limitações aos programas de melhoramento genético e difusão de novas raças. Somente equinos sorologicamente negativos para *B. equi* e *B. caballi* podem entrar em áreas livres (WEILAND, 1986).

A ampla distribuição geográfica e diversidade das espécies de carrapatos, potencialmente transmissoras, pertencentes aos gêneros *Dermacentor*, *Hyalomma* e *Rhipicephalus*, justificam a ocorrência mundial desta enfermidade (THOMPSON, 1969).

Para *B. equi* foram descritas oito espécies de carrapatos como vetores no Velho Mundo pertencentes aos gêneros *Dermacentor*, *Hyalomma* e *Rhipicephalus*. Na América, os vetores de *B. equi* citados até o momento são *D. variabilis* e *B. microplus*, ambos identificados com transmissores experimentais (KNOWLES et al., 1992; GUIMARÃES, 1998ab; STILLER et al., 2002).

No Brasil, as principais espécies de carrapatos que parasitam os eqüídeos são *Anocentor nitens* e *Amblyomma cajennense*. No entanto, experimentalmente, até o presente momento, não foi demonstrado a infecção destes carrapatos por *B. equi*, assim como a participação na transmissão deste hemoprotozoário (DENNING, 1988; STILLER; COAN, 1995). Estudos mais recentes demonstram a importância de *B. microplus* como parasito de eqüinos (FALCE et al., 1983; MORENO, 1984, BORGES; SILVA, 1994) e indicam a sua importância como possível transmissor natural de *B. equi*, principalmente em locais onde o *B. microplus* é a espécie predominantemente encontrada parasitando eqüinos (CUNHA et al., 1996).

A carência de informações sobre o carrapato envolvido na transmissão e distribuição de *B. equi* na América do Sul, principalmente no Brasil, demonstra a necessidade de estudos para elucidar este ponto, considerado de fundamental importância para o estabelecimento de um programa de controle mais eficaz.

O trabalho teve como objetivos de caracterizar em condições experimentais e naturais o desenvolvimento de formas evolutivas de *B. equi* na espécie de carrapato *B. microplus* por meio da análise morfológica e molecular.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Histórico

A piroplasmose equina foi descrita por Theiler (1901), trabalhando com *B. equi*. De acordo com Schein (1988), Laveran (1901) foi o primeiro pesquisador a descrever a natureza intraeritrocítica do agente causal da babesiose equina ao examinar esfregaços de sangue periférico de equinos da África do Sul, designando-o de *Piroplasma equi*. Posteriormente, Nuttal; Strickland (1910) demonstraram a existência de uma outra espécie de parasito, morfologicamente distinto daquele anteriormente decrito e também causador da piroplasmose equina, denominando-o de *Piroplasma caballi*.

Nuttal; Strickland (1910), citados por Pierce (1975), propuseram a designação de *Nuttalia equi* para o protozoário descrito com *P. equi* em função das características morfológicas do parasito serem diferentes das demais espécies do gênero *Piroplasma*, até então conhecidas. Entretanto, trabalhos posteriores de nomenclatura e sistemática classificaram as espécies deste parasito dentro do gênero *Babesia*.

Embora com algumas características em comum, *B. equi* e *B. caballi* dever ser consideradas como causadoras de doenças distintas, já que existem diferenças significativas entre as duas espécies, envolvendo o ciclo biológico, a patogenicidade e a quimioterapia.

### 2.2 Taxonomia

A classificação taxonômica de *B. equi* dentro da família *Babesiidae* é uma área de controvérsia há muitos anos, dado a similaridade desse parasito com o gênero *Theileria*; destacando-se a transmissão transtadial pelo carrapato (FRIEDHOFF, 1988); o desenvolvimento em linfócitos antes do ciclo eritrocítico (SCHEIN et al., 1981; MOLTSMANN et al., 1983) e o aparecimento de formas intraeritrocíticas em “Cruz de Malta”, como resultado da divisão múltipla do parasito (SCHEIN, 1988).

Estudos ultraestruturais evidenciaram a presença de citóstoma e de uma estrutura alimentar tubular em trofozoítos de *B. equi* (SIMPSON et al., 1967; FRERICHS, HOLBROOK, 1974; SIMPSON; NEAL, 1980), estruturas estas envolvidas no mecanismo de alimentação, muitos similares àquelas observadas em parasitos do gênero *Theileria* (CONRAD et al., 1985; FAWCETT et al., 1987).

Estudos bioquímicos demonstraram que proteínas de superfície de estágios eritrocíticos de *B. equi* e *Theileria* spp apresentam pesos moleculares similares com 33% a 58% de aminoácidos idênticos (KAPPEMEYER et al., 1993).

Além destes dados morfológicos e biológicos suplementados pela bioquímica, estudos de sensibilidade a drogas têm demonstrado que esquizontes exoeritrocíticos de *B. equi* são altamente susceptíveis a drogas esquizonticidas usadas no tratamento de theileriose bovina, tais como buparvacina que em associação ao imidocarb podem eliminar o parasito (ZWEYGARTH et al., 1984; KUTTLER et al., 1987; ZAUGG; LANE, 1989; KUMAR, 2003).

Entretanto, análises comparativas realizadas por meio de técnicas de biologia molecular, indicam que *B. equi* deve ser caracterizada como um grupo distinto (ALLSOPP et al., 1994), principalmente porque estudos filogenéticos, realizados a partir da avaliação da sequência de RNA ribossomal, demonstraram que este parasito encontra-se num grupo filogenético distante de qualquer espécie do gênero *Theileria* (KATZER et al., 1998). Criado-Fornelio et al. (2003) sugerem com base na análise de diversos modelos de árvores

filogenéticas, que *B. equi* e *Cytauxozoon felis* seriam ancestrais de *Theileria* spp. e que esses parasitos estariam situados relativamente distantes de *B. rodhaini*. Assim a criação de uma nova família, como proposto por Allsopp et al. (1994) só faria sentido se essa compreendesse apenas esses dois parasitos.

Estes estudos apontam fortes evidências de que ainda existe certa discussão com relação á taxonomia de *B. equi*. Alguns autores propõem a transferência desse parasito para o gênero *Theileria* (SCHEIN et al., 1981; MOLTSMANN et al., 1983; ZAPF; SCHEIN, 1994b, MELHORN; SCHEIN, 1998), enquanto outros propõem a criação de uma nova família (ALLSOPP et al., 1994). Entretanto até que uma nova classificação seja adotada internacionalmente a denominação *B. equi* (LAVERAN, 1901) será utilizada neste estudo, segundo a classificação proposta por Levine (1988):

Filo: Apicomplexa  
Classe: Aconoidasida  
Ordem: Piroplasmorida  
Família: Babesiidae  
Gênero: *Babesia*  
Espécie: *B. equi*

### 2.3 Distribuição Geográfica

A babesiose equina é uma doença cosmopolita, considerada emergente nos países subtropicais, e presente em áreas que abrigam 90% da população eqüina mundial (FRIEDHOFF et al., 1990).

A ampla distribuição geográfica e diversidade das espécies de carrapatos, potencialmente transmissoras, pertencentes aos gêneros *Dermacentor*, *Hyalomma* e *Rhipicephalus*, justificam a ocorrência mundial desta enfermidade (THOMPSON, 1969).

De acordo com estudos soroepidemiológicos, tem sido observado alta prevalência de *B. equi* e *B. caballi* na população de equídeos e zebras na África (YOUNG; PURNELL, 1973; DE WALL et al., 1988; FRIEDHOFF et al., 1990).

Na Europa ambas as espécies foram descritas na França, Bélgica, Espanha e Itália (CORDEIRO del CAMPILLO et al., 1974). No entanto, Alemanha, Áustria, Suíça e Grã-Bretanha, são consideradas regiões livres (FRIEDHOFF et al., 1990).

Nos países asiáticos, *B. equi* e *B. caballi* são registradas de forma enzoótica, principalmente na China e Coréia, com exceção da Sibéria, onde estes protozoários não foram observados até o presente momento.

Nas Américas, a babesiose se manifesta de forma enzoótica nos países da América Latina, exceto as regiões do Sul do Chile e Argentina (FRIEDHOFF et al., 1990; RUDOLPH et al., 1993). Os Estados Unidos e Canadá são considerados livres de *B. equi* e *B. caballi*, focos epidêmicos de *B. caballi* (1961) e de *B. equi* (1965) ocorreram no Estado da Flórida, através de equínos importados de Cuba, mas permaneceram localizados devido às rígidas medidas de controle adotadas (TAYLOR et al., 1969, HOLBROOK, 1969).

No Brasil, a babesiose eqüina por *B. equi* foi relatada pela primeira vez por CARINI (1910) através do diagnóstico clínico e laboratorial de animais originados do Estado de São Paulo. Esta mesma espécie de protozoário foi diagnosticada em animais de corrida com quadro agudo de babesiose (GUIMARÃES et al., 1950).

O primeiro relato de *B. caballi*, a partir de dados clínicos e laboratoriais foi realizado por Costa; Melo (1963) em equínos no Rio de Janeiro. Posteriormente, relatos clínicos de *B. caballi* foram realizados por Lima et al. (1976) em Minas Gerais e Rocha et al. (1988) em Pernambuco.

Os estudos sorológicos para *B. equi* e *B. caballi* foram inicialmente realizados por Tenter; Friedhoff (1986) ao examinarem soros de animais do Estado do Espírito Santo e do Rio de Janeiro. Ribeiro; Lima (1989) observaram uma prevalência de 80,1% para *B. equi* em eqüinos no estado de Minas Gerais. Pfeiffer et al. (1992) relataram a ocorrência de 75% de eqüinos reagentes a RIFI para *B. caballi* no Estado do Rio de Janeiro. Posteriormente Pfeiffer (1993, 1995) detectou prevalência de 100% para *B. equi* pela RIFI e 61,7% par *B. caballi* pelo TFC e 70% pela RIFI em 60 equinos procedentes da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), município de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro. No estado do Rio Grande do Sul, Cunha et al. (1996) observaram prevalência de 57,9% para *B. equi*. Linhares (1994) registrou prevalências de 94,7% para *B. equi* e 90,8% para *B. caballi* pela RIFI em animais originados da microrregião de Goiânia.

Heuchert et al. (1999) realizaram um estudo soroepidemiológico para *B. equi* e *B. caballi* em diferentes propriedades no Estado de São Paulo, e observaram uma prevalência para *B. equi* de 49,21% para eqüinos machos e de 36% para potros de seis meses de idade. O estudo evidenciou que em propriedades cujos animais não apresentavam contato direto ou indireto com bovinos, somente 17,5% dos animais eram infectados com *B. equi* e 89,5% com *B. caballi*, e que apenas a espécie *A. nitens* foi observada nestes eqüinos. Entretanto, em propriedades que havia o contato direto e indireto com bovinos, 89,5% dos eqüinos eram infectados por *B. equi* e foi observada a infestação por *B. microplus* nestes animais.

Souza et al. (2000) ao observarem uma prevalência de 50,38% para *B. equi* em eqüinos de diferentes idades, sexo e raças, nascidos e criados no Planalto Catarinense, Santa Catarina.

Botteon (2002) observou a soroprevalência de 89,58%, 87,89% e 45,24%, nos sistemas de produção de eqüinos extensivo, semi-extensivo e confinado.

Pereira et al. (2004) determinaram à prevalência de *B. equi* e *B. caballi* através do teste Fixação de Complemento em eqüinos da raça Puro Sangue Inglês de pequenos estabelecimentos eqüestres localizados na região e Sul e Sudeste, encontrando 18,1% para a *B. equi*, 1,5% para *B. caballi* e de 6,0% para infecção mista.

## 2.4 Transmissão

A transmissão e distribuição de *B. caballi* na Europa e Ásia estão relacionadas a cinco espécies do gênero *Dermacentor*: *D. marginatus*, *D. silvarum*, *D. nivens*, *D. nutalli* e *D. reticulatus* e duas espécies de *Hyalomma*: *H. marginatum*, *H. dromedari* (FRIEDHOFF, 1990). Na África, De Wall (1990) registrou a transmissão de *B. caballi* por *R. evertsi* e *H. truncatum*.

O envolvimento de *A. nitens* na transmissão e distribuição de *B. caballi* nas Américas, foi registrado pela primeira vez a partir de estudos experimentais em equídeos no Estado da Flórida, (ROBY; ANTHONY, 1963, ROBY et al., 1964). Posteriormente, Holbrook et al. (1968) observaram pela primeira vez, as formas de multiplicação do protozoário em amostras de hemolinfa e tecidos de *A. nitens* e sua transmissão transovariana em carrapatos coletados de eqüinos mantidos em uma área de surto. Há suspeitas de que *D. albipictus* possa também atuar como vetor na América do Norte (STILLER et al., 1980).

No Brasil, formas em multiplicação de *B. caballi* foram observadas em amostras de hemolinfa, ovário e ovos de *A. nitens*, indicando ser esse ixodídeo um importante vetor do protozoário (PFEIFER BARBOSA et al., 1992; PFEIFER BARBOSA, 1993; MUJICA, 2003).

Para *B. equi* foram descritas oito espécies de carrapatos dos gêneros *Dermacentor*, *Hyalomma* e *Rhipicephalus*, como vetores naturais no Velho Mundo. No entanto, os vetores deste protozoário nas Américas são desconhecidos, embora seja

transmitida experimentalmente pelo *B. microplus* (KNOWLES et al., 1992; GUIMARÃES, 1998ab, STILLER et al., 2002).

Diferindo da maioria das espécies de *Babesia*, a *B. equi* é transmitida transestadialmente, um processo similar ao que ocorre em *Theileria*. Geralmente a infecção é adquirida por ninfas e transmitida por fêmeas e machos adultos; sendo que esses estágios perdem a sua infecção após a transmissão ter ocorrido (YOUNG; MORZARIA, 1986). Machos adultos de *Hyalomma* podem transmitir a infecção pela transferência inter-hospedeiro (transmissão intraestadial), devido a sua longevidade e motilidade, já que são capazes de infestarem equinos ou outros hospedeiros por semanas ou até meses (FRIEDHOFF et al., 1990).

## 2.5 Ciclo Biológico

### 2.5.1 Biologia de *Babesia equi* no hospedeiro vertebrado

Diferindo das demais espécies do gênero *B. equi* apresenta uma esquizogonia exoeritrocítica em linfócitos do hospedeiro e posteriormente, nos eritrócitos (SCHEIN et al., 1981). Os esporozoítos, inoculados pela saliva do carrapato vetor, sofrem um complexo ciclo de multiplicação, antes de se tornarem infectantes para os equinos (FRIEDHOFF, 1988). Penetram nos linfócitos do hospedeiro vertebrado, onde ocorre a formação de macroesquizontes que se diferenciam em microesquizontes. Os esquizontes de *B. equi* são morfológicamente semelhantes aos do gênero *Theileria* e podem ser observados em linfócitos circulantes, duas semanas após a infecção natural (SCHEIN et al., 1981; MOLTSMANN et al., 1983; FRIEDHOFF, 1990). Os microesquizontes contém um grande número de merozoítos (dimensões de 1,5 a 2µm) que após completa maturação, rompem os linfócitos e penetram nos eritrócitos (SCHEIN et al., 1981). Nestes, sofrem divisão binária, originando, comumente, quatro merozoítos, formando uma tétrade, conhecida como "Cruz de Malta". Essa forma é característica da espécie (MEHLHORN; SCHEIN, 1984), principalmente nas infecções de curso agudo e com alta parasitemia.

Após a ruptura dos eritrócitos, os merozoítos penetram em outros eritrócitos e iniciam outra fase de reprodução assexuada. No entanto, alguns desses estágios intra-eritrocíticos adquirem formas ovais ou esféricas, com dimensões entre 1 a 2 µm e são reconhecidos como gametócitos (HOLBROOK et al., 1968; MAHONEY et al., 1977). Ao serem ingeridos pelos carrapatos, na luz intestinal, os gametócitos dão origem a fase de gametogonia.

A reprodução sexuada ocorre no carrapato de forma semelhante à descrita para *B. caballi*, porém a infecção se dá no estágio seguinte. A transmissão transovariana não ocorre para esta espécie (SCHEIN et al., 1981; FRIEDHOFF, 1988), sendo transmitida transestadialmente, processo similar ao que ocorre em *Theileria*.

A transmissão intrauterina de *B. equi* é possível e os fetos podem ser infectados em qualquer fase da gestação, sem que necessariamente a égua apresente sinais clínicos da infecção (ERBSLOH, 1975), entretanto este tipo de transmissão parece pouco freqüente (NEITZ, 1956).

### 2.5.2 Desenvolvimento de *B. equi* no vetor

#### 2.5.2.1 Gametogonia

Os gametócitos ao serem ingeridos pelos carrapatos na luz intestinal abandonam os eritrócitos e se diferenciam em estágios chamados de "strahlenkoper" ou corpos raiados, que são considerados como gametas. Posteriormente, os gametas se unem de dois a dois e se



fundem, dando origem ao zigoto. No interior do zigoto, ocorre o desenvolvimento de um cineto móvel chamado de oocineto ou esporocineto primário (MEHLHORN; SCHEIN, 1984).

Esse oocineto passa pela parede intestinal e através da hemolinfa atinge diretamente as glândulas salivares do carrapato.

No ciclo de *B. equi* os estágios iniciais de desenvolvimento no intestino de carrapatos tem sido pouco estudado. Cinetos em forma de clava, medindo 10 a 12  $\mu\text{m}$  de comprimento e com aproximadamente 3 a 4  $\mu\text{m}$  de largura, foram observados no momento da repleção ou um dia após no intestino de *H. marginatum* (SCHEIN, 1988).

Estudo detalhado sobre o desenvolvimento de *B. equi* no intestino e na hemolinfa de três diferentes espécies de *Hyalomma*, utilizando a microscopia óptica, foi realizado por Zapf; Schein (1994a), durante o repasto sanguíneo e após ninfas ingurgitarem em equinos com parasitemia latente. O desenvolvimento de *B. equi* no intestino e na hemolinfa foi idêntico nas três espécies de *Hyalomma* estudadas. Durante os três primeiros dias após a infestação das ninfas, algumas formas de *B. equi* em anel (variando de 1,5 a 2,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro), intra e exoeritrocítica, foram observadas no conteúdo do intestino. Entre o segundo e o terceiro dia após a infestação das ninfas, as formas de anel transformaram-se em corpos multinucleados, com 3 a 4  $\mu\text{m}$  de diâmetro, identificados como microgamontes. Microgametas com 2 a 3  $\mu\text{m}$  de comprimento, formaram-se a partir dos corpos multinucleados, entre o terceiro e quarto dia de infestação das ninfas. Concomitantemente, algumas formas em anel com diâmetro ente 1,5 a 2,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro foram observados no conteúdo intestinal denominadas de macrogametas. Zigotos e cinetos foram observados nas células intestinais, a partir do quarto dia até o sétimo dia após a infestação, ou seja, dois dias antes das ninfas completarem o ingurgitamento; cinetos (14 x 7  $\mu\text{m}$ ), similares aos descritos no intestino, também foram observados na hemolinfa de ninfas ingurgitadas. Segundo os autores acima citados, a morfologia e a sequência dos estágios de desenvolvimento da *B. equi* identificados no intestino e na hemolinfa das espécies de *Hyalomma*, foram similares aos estágios de desenvolvimento de espécies de *Theileria* que ocorrem em bovinos.

### 2.5.2.2 Esporogonia

A penetração dos oocinetos nos ácinos das glândulas salivares (tipo III) inicia-se entre o 7º a 8º dia após infestação. No início, grandes massas esporogônicas multinucleadas (esporonte) são formadas. Levando a hipertrofia das células parasitadas. Estes esporontes dividem-se em vários esporoblastos multinucleados e esféricos mensurando 6 a 15  $\mu\text{m}$  de diâmetro, onde na periferia são formados esporozoítos ovóides ou alongados. Este desenvolvimento se completa entre o 6º e o 24º dias após repleção dos carrapatos (MEHLHORN; SCHEIN, 1984).

A primeira citação sobre prováveis formas de desenvolvimento de *B. equi* em glândulas salivares, foi descrita por Brocklesby (1965), citada por Young; Purnell (1973), a partir de carrapatos adultos *R. pulchellus*, colhidos de uma zebra que apresentava infecção patente.

Posteriormente, Young; Purnell (1973), estudaram o desenvolvimento de *B. equi*, em carrapatos adultos *R. evertsi*. Ninfas ingurgitadas foram colhidas de 40 zebras da Tanzânia, que apresentavam parasitemias patentes e que raramente excederam a 1%, e após a ecdise, 40 adultos foram alimentados em coelhos e após quatro dias de alimentação foram removidos e as glândulas salivares foram extraídas e examinadas em microscópio ótico, após coloração com Giemsa. Somente três machos apresentaram glândulas salivares infectadas com formas maduras (0,2 a 0,4  $\mu\text{m}$  diâmetro). Os ácinos tipo III parasitados apresentaram dimensões médias maiores (39,2 x 11  $\mu\text{m}$ ) do que as dos ácinos normais (29,7 x 5,8  $\mu\text{m}$ ).

Moltmann et al. (1983) estudaram o desenvolvimento ultraestrutural de *B. equi* em glândulas salivares de três espécies de carrapatos (*H. anaticum anaticum*, *H. a. excavatum* e *R. turanicus*). O desenvolvimento foi idêntico entre as três espécies sendo observados em glândulas salivares de ninfas, esporontes que persistiram durante o período de ecdise de ninfas para adultos e foram descritos corpos polimórficos, cada qual com um núcleo. A formação de esporozoítas iniciou-se no quarto dia de alimentação dos carrapatos adultos em coelhos, a partir de protrusões na superfície dos esporoblastos contendo roptrias, micronemas. Os esporozoítas apresentavam aspectos tipicamente piriformes (3,0 x 1,2 µm).

Zapf; Schein (1994b) estudaram o desenvolvimento de esporozoítos de *B. equi* em glândulas salivares de três espécies de carrapatos do gênero *Hyalomma*, durante e após as ninfas ingurgitarem sobre equinos infectados experimentalmente e após a ecdise, em adultos alimentados sobre coelhos. *Babesia equi* apresentou uma fase de esporogonia em ninfas ingurgitadas, antes da ecdise para adultos. Esporozoítos formaram-se seis dias após a infestação das ninfas, provavelmente, em célula do ácino tipo III, através de fissão sequencial rápida de um complexo multinucleado e de um processo de brotamento radial, a partir de corpos de fissão múltipla. Uma segunda fase de esporogonia, similar a primeira, foi observada em carrapatos adultos (machos e fêmeas) onde esporozoítos de forma alongada desenvolveram-se dentro de dois a cinco dias de alimentação em coelhos, sendo igualmente infectantes para os equinos. O diâmetro dos ácinos infectados variou de 350 a 550 µm, enquanto nos ácinos normais, o diâmetro médio foi de 120 µm (variando de 80 a 150 µm). Os esporozoítos eram ovóides ou alongados, medindo 3 a 4 µm de comprimento e 1 a 2 µm de diâmetro, com um núcleo pequeno e posição excêntrica.

Guimarães et al. (1998 a, b) por meio de microscopia eletrônica estudaram o desenvolvimento de *B. equi* em glândulas salivares de fêmeas adultas de *Boophilus microplus* e observaram a formação de esporozoítos maduros (2 x 1,1 µm) piriformes mostrando roptrias, micronemas, núcleo, mitocôndrias e alta concentração de ribossomas livres a partir do segundo dia de fixação dos carrapatos em coelhos.

## 2.6 Diagnóstico por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Atualmente, com a introdução da biologia molecular na detecção e caracterização de agentes patogênicos e, principalmente, a introdução das técnicas da reação em cadeia de polimerase (PCR) e de hibridização de ácidos nucleicos (sondas moleculares), alguns trabalhos vem sendo desenvolvidos no sentido de adaptá-las ao diagnóstico da *B. equi* e *B. caballi*.

As provas de hibridização de DNA acabaram por contribuir nos estudos epidemiológicos, assim como nos programas de controle e erradicação da enfermidade (REITER; WEILAND, 1989). Segundo Posnett et al. (1991), a utilização de sondas de DNA permite detectar um maior número de animais portadores de babesiose equina, já que animais negativos ao exame microscópico direto apresentaram-se positivos para *B. equi* através de sondas específicas. Entretanto, Bose et al. (1995) argumentaram que as sondas geralmente são equivalentes em sensibilidade aos esfregaços sanguíneos.

As técnicas baseadas em PCR propiciaram a manutenção da alta especificidade das sondas de DNA, permitindo, contudo, um incremento significativo na sensibilidade (FIGUEROA; BUENING, 1995), já que uma sequência específica do DNA presente no genoma do organismo que se quer detectar é repetidamente amplificada para produzir um produto facilmente visualizável (BOSE et al., 1995). O teste de PCR tem demonstrado uma sensibilidade superior a 100 vezes que a técnica de microscopia direta, detectando níveis de parasitemia entre  $10^{-8}$  e  $10^{-9}$ , com alta especificidade, menor custo e maior rapidez em relação a sonda (FIGUEROA et al., 1992; PERSING et al., 1992; FIGUEROA et al., 1993).

Bashiruddin et al. (1999) demonstraram ser possível, por meio da amplificação da região 18S do gene rRNA, detectar DNA de *B. equi* em sangue de equinos com parasitemias equivalentes a 0,000083%. Essa sensibilidade é muito superior ao relatado para esfregaços sanguíneos e sondas de DNA, que apresentam limites de detecção de 0,001% e 0,00025%, respectivamente (POSNETT et al., 1991).

Uma das grandes vantagens das técnicas baseadas em PCR é a possibilidade de se empregar a mesma metodologia para a pesquisa dos agentes tanto nos hospedeiros vertebrados como nos invertebrados. Com isso, as técnicas de PCR têm sido utilizadas nos estudos de infecções por *Anaplasma marginale* (ECHAIDE et al., 1998), *Ehrlichia canis* (STICH et al., 2002), *Theileria* (TANAKA et al., 1993; KAWAZU et al., 1995; WATT et al., 1998), *Cowdria ruminantium* (TREVOR et al., 2000) tanto nos hospedeiros vertebrados como nos diferentes estágios evolutivos dos hospedeiros invertebrados.

Battsetseg et al. (2001) demonstraram por meio de técnicas de PCR e nested PCR, que o carrapato da espécie *D. nuttalli* é o vetor de maior importância na transmissão e na manutenção da endemicidade de *B. equi* e *B. caballi* na Mongólia. Posteriormente, esses autores detectaram DNA de ambos protozoários em ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas de *D. nuttalli*, sugerindo a possibilidade de transmissão transovariana de *B. equi* nessa espécie de carrapato (BATTSETSEG et al., 2002).

Ueti et al. (2005) demonstraram a habilidade do carrapato *B. microplus* de se infectar e transmitir a *B. equi* para animais sensíveis, após alimentação em equinos infectados cronicamente e com baixa parasitemia. A detecção de *B. equi* observada pela técnica de PCR em tempo real foi de 7 a 50% em glândulas salivares dos carrapatos estudados, demonstrando que animais portadores são competentes reservatórios para a transmissão de *B. equi* por este vetor.

## CAPÍTULO I

**DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO E MOLECULAR DA INFECÇÃO  
EXPERIMENTAL DE *Babesia equi* (LAVERAN, 1901) EM *Boophilus  
microplus* (CANESTRINI, 1887).**

## RESUMO

FERNANDES, Kátia Roberta. **Diagnóstico morfológico e molecular da infecção experimental de *Babesia equi* (Laveran, 1901) em *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887)** 2007. 58p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 20007.

Este trabalho tem como objetivo identificar o desenvolvimento de *Babesia equi* em intestino e glândulas salivares de ninfas e adultos de *Boophilus microplus* por meio de microscopia óptica e análise molecular. Foram coletados ninfas, fêmeas e machos de *B. microplus* de equinos infestados experimentalmente. Após a coleta foram realizadas coletas de hemolinfa e o intestino e glândulas salivares foram extraídas, maceradas em lâminas de vidro para microscopia e coradas com Giemsa e observadas em microscópio óptico. Foram dissecados 860 espécimes (ninfas= 432; fêmeas= 280 e machos= 148). Na microscopia óptica foi possível observar após o segundo dia após ecdise a presença de cinetos com aspecto claviforme no intestino e nas hemolinfas a partir do quarto dia após ecdise das ninfas. A partir do quinto dia, esporoblastos e esporozoítas foram observados nos ácinos das glândulas salivares das ninfas, sendo que em fêmeas e machos foi possível após o segundo dia após ecdise. A análise do gene específico 18S rRNA demonstrou a amplificação de DNA de *B. equi* em amostras de glândulas salivares de ninfas, fêmeas, ovos e larvas de *B. microplus*. Estes resultados sugerem o possível envolvimento de *B. microplus* na transmissão de *B. equi*.

**Palavras chaves:** *Theileria equi*, eqüinos, carrapato, glândula salivar, transmissão

## ABSTRACT

FERNANDES, Kátia Roberta. **Diagnostic morphologic and molecular of *Babesia equi* of the experimental infection (Laveran, 1901) in *Boophilus microplus* experimental (Canestrini, 1887).** 2007. 58p. (Doctor in Sciences Veterinary, Parasitology Animal). Veterinary Institute, Animal Parasitology Department, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

This work has as objective to identify the development of *Babesia equi* in gut and salivary glands of the nymphs and adults of *Boophilus microplus* using optical microscopy and molecular analysis. Were collected nymphs, females and males of *B. microplus* from equines experimental infested and infected with *B. equi*. After the collection was examined the hemolymph and the intestine and salivary glands were dissected, smashed on glass slides for microscopy and stained with Giemsa. There were dissected 860 specimens (432 nymphs, 280 females and 148 males). On optical microscopy of nymph hemolymph was possible to be observed on day 2 after ecdysis the presence of kinetes with claviform aspect in gut and in hemolymph on day 4. On day 5, were observed the formation of sporoblasts and sporozoites in acinary cells in the salivary glands of nymphs. In female and male were observed on day 2 after ecdysis. The analysis utilizing optical microscopy of salivary glands revealed sporoblast stages in acinary cells and the development of elongated sporozoites. Products of the PCR with specific primers for the 18S rRNA confirmed the amplification of *B. equi* in DNA samples extracted from salivary glands of nymphs, male and female ticks as well as in larvae and eggs the *B. microplus*. These results suggest the possible participation of *B. microplus* within the transmission cycle of *B. equi*

**Key words:** *Theileria equi*, equine, tick, salivary glands, transmission

## 1 INTRODUÇÃO

A babesiose equina é uma doença causada pelos protozoários intraeritrocíticos *Babesia equi* (Laveran, 1901) e *Babesia caballi* (Nuttal & Strickland, 1910), que acomete equinos, asininos, pôneis, muares e zebras. Esta enfermidade pode se manifestar de forma aguda com sinais clínicos caracterizados por pirexia, anemia e icterícia e hemoglobinúria (SCHEIN, 1988). No entanto, a maioria dos animais desenvolve a infecção crônica, permanecendo nesse estado por longos períodos e atuando como uma fonte de infecção para os carrapatos vetores (DE WALL et al., 1992).

Ambas as espécies de hemoparasitos apresentam ampla distribuição geográfica, ocorrendo na maior parte das áreas tropicais e subtropicais do mundo, assim como algumas áreas de clima temperado, seguindo a distribuição dos carrapatos potencialmente transmissores (HOLBROOK, 1969; FRIEDHOFF et al, 1990; PFEIFER BARBOSA et al, 1992). Estima-se que apenas 10% da população mundial de cavalos habitem áreas livres de carrapatos e babesias.

A ampla distribuição geográfica e diversidade das espécies de carrapatos, potencialmente transmissoras, pertencentes aos gêneros *Dermacentor*, *Hyalomma* e *Rhipicephalus*, justificam a ocorrência mundial desta enfermidade (THOMPSON, 1969).

A importância das babesioses equinas tem crescido pela restrição por parte de países livres destas parasitoses, para trânsito de equinos, seja para competições hípcas ou comércio internacional, gerando limitações aos programas de melhoramento genético e difusão de novas raças (WEILAND, 1986) e também pelo risco constante de dispersão dos agentes etiológicos de áreas enzoóticas para áreas livres (FRIEDHOOF et al, 1990).

Para *B. equi* foram descritas oito espécies de carrapatos dos gêneros *Dermacentor*, *Hyalomma* e *Rhipicephalus*, como vetores no Velho Mundo. Na América, os vetores de *B. equi* citados até o momento são *D. variabilis* e *B. microplus*, ambos identificados com transmissores experimentais (STILLER; COAN, 1995; GUIMARÃES, 1998b, STILLER et al., 2002).

O ciclo biológico de *B. equi* inicia-se quando as fêmeas do carrapato vetor ingerem eritrócitos infectados com estruturas semelhantes à trofozoítos, sendo considerados como gametócitos (MEHLHORN; SCHEIN, 1984). Ao serem ingeridos pelo carrapato, na luz intestinal, os gametócitos iniciam um processo de gametogonia, diferenciando-se em gametas masculino e feminino. Após diferenciação, se fundem dando origem ao zigoto. Após o desenvolvimento em oocineto, passa pela parede intestinal e através da hemolinfa atinge a glândula salivar, onde ocorre o processo esporogônico, após penetração dos esporocinetos nos ácinos, principalmente nos ácinos tipo 3 (GUIMARÃES, et al., 1998) onde ocorre a formação de esporonte e produção de esporozoítos, forma infectante para os hospedeiros vertebrados (HOLBROOK et al., 1968; MEHLHORN & SCHEIN, 1984).

Após a inoculação dos esporozoítos, o período de incubação nas infecções por *B. equi* pode variar entre 12 e 19 dias (DE WALL, 1992).

O desenvolvimento de esporozoítos de *B. equi* na glândula salivar das espécies de *Hyalomma* foi descrito utilizando-se microscopia eletrônica e óptica (MOLTMANN et al., 1983; ZAPF; SCHEIN, 1994). Guimarães et al. (1998) descreveram a presença de esporogonia de *B. equi* em glândulas salivares de fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* coletadas de equinos infectados experimentalmente. Verificaram ainda, que animais livres infestados com carrapatos *B. microplus* infectados, desenvolveram a doença. Este resultado sugere a participação de *B. microplus* na transmissão e distribuição de *B. equi* no Brasil, principalmente em locais onde *B. microplus* é a espécie de carrapato predominantemente encontrada parasitando equinos (FREIRE, 1972; CUNHA, 1993).

Battsetseg *et al.* (2001) demonstraram por meio de técnicas de PCR e nested PCR, que o carrapato da espécie *D. nuttalli* é o vetor de maior importância na transmissão e na manutenção da endemidade de *B. equi* e *B. caballi* na Mongólia. Posteriormente, esses autores detectaram DNA de ambos protozoários em ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas de *D. nuttalli*, sugerindo a possibilidade de transmissão transovariana nessa espécie de carrapato (BATTSETSEG *et al.*, 2002a).

Battsetseg *et al.* (2002b) demonstraram ser possível detectar DNA de *B. equi* em aproximadamente 96% das amostras de sangue de equinos e 45,3% a 62,5% das fêmeas ingurgitadas, ovos, larvas e ninfas de *B. microplus* colhidos de equinos naturalmente parasitados no Mato Grosso do Sul, Brasil.

Um dos pontos que ainda necessita ser esclarecido na América Latina é carrapato vetor de *B. equi*, informação esta, de fundamental importância para o estabelecimento de um programa de controle desse parasito.

O objetivo do presente trabalho foi identificar por meio da análise morfológica e molecular, as formas de desenvolvimento de *B. equi* no intestino e glândula salivar de ninfas e adultos de *B. microplus* infectados experimentalmente.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS



## 2.1 Local do Experimento

O experimento foi realizado no laboratório de Hemoparasitos da Estação para Pesquisa Parasitológica W.O. Neitz (EEPWON), do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), município de Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil.

## 2.2 Obtenção e Manutenção dos Animais

Para a realização do experimento foram utilizados dois equinos (Eq<sub>1</sub>, Eq<sub>2</sub>), mestiços, uma fêmea e um macho esplenectomizado com idades entre 2 a 4 anos, respectivamente, sendo estes infectados por *B. equi* e diagnosticado por meio de esfregaços sanguíneos, obtidos por punção de vasos periféricos do pavilhão auricular e corados pelo método de Giemsa por uma hora. Os animais apresentavam resultados sorológicos negativos para *B. caballi*

Antes de iniciar o experimento os equinos foram vermifugados e tratados com carrapaticidas comerciais em concentrações recomendadas pelo fabricante.

Os animais foram mantidos em baias individuais onde receberam ração balanceada, sal mineral, capim picado e água *ad libidum*.

## 2.3 Obtenção de *B. microplus* não Infectados

Foram utilizadas larvas não ingurgitadas, identificadas como *B. microplus*, segundo Aragão; Fonseca (1961), provenientes de uma colônia pertencente ao laboratório de Protozoologia e mantida em equino após quatro gerações sucessivas. Em cada geração foi realizada exames de hemolinhas no 7º, 9º e 12º dia após desprendimento das fêmeas ingurgitadas do equino infestado. Somente após a comprovação da negatividade de *B. bovis* e *B. bigemina* a progênie foi usada no experimento.

Após 15 dias de eclosão, as larvas de *B. microplus* foram utilizadas para a infestação dos equinos mantidos na Estação Experimental W.O.Neitz.

## 2.4 Obtenção de *B. microplus* Infectados Experimentalmente por *B. equi*.

A metodologia para obtenção dos carrapatos infectados com *B. equi* foi aplicada com base nos trabalhos de Mahoney; Mirre (1977) e De Vós et al. (1984).

Os equinos Eq<sub>1</sub> e Eq<sub>2</sub> foram infestados na região dorso lombar com aproximadamente dois gramas de larvas da geração F5 de *B. microplus* mantida em condições laboratoriais. Após as infestações com *B. microplus* foram feitas observações diárias dos animais e realização de esfregaços sanguíneos corados pelo método de Giemsa.

O equino Eq<sub>1</sub> (esplenectomizado) recebeu três infestações por *B. microplus*, enquanto o animal Eq<sub>2</sub> recebeu uma única infestação.

## 2.5 Avaliação da Infecção por *B. equi* em Ninfas, Fêmeas e Machos de *B. microplus*

A partir do 9º dia após a infestação, foram realizadas coletas diárias de ninfas, e após a ecdise, fêmeas e machos foram coletados até o término do período de infestação que foi de aproximadamente 28 dias.

### 2.5.1 Obtenção e exame das amostras de hemolinha de ninfas, fêmeas e machos

A metodologia aplicada ao diagnóstico das formas de desenvolvimento de *B. equi* foi baseada na técnica descrita por Burgdorfer (1970) e Barreira (1988 e 2001).

A avaliação da infecção de *B. equi* nos carrapatos *B. microplus* foi realizada por meio dos exames de hemolinfa de todos os espécimes coletados (ninfas, fêmeas e machos) antes da dissecação.

Os esfregaços de hemolinfas foram realizados a partir da secção da região distal (tarso) de uma ou mais patas de cada espécime estudado, com auxílio de uma tesoura e pinça de dissecação. Todas as amostras de hemolinfa foram depositadas em lâmina de vidro para microscopia e secas a temperatura ambiente, fixadas em metanol e coradas pelo método de Giemsa por 20 minutos. O exame do material foi realizado em microscópio ótico, utilizando-se objetivas de 10X, 40X e 100X e ocular micrométrica de 10X.

### **2.5.2 Dissecação de ninfas, machos e fêmeas de *B. microplus*.**

No laboratório, os carrapatos coletados foram lavados, secados em papel de filtro, deixados em repouso por 10 minutos. As fêmeas foram fixadas em decúbito dorsal em placas de petri contendo parafina sólida, com o auxílio de alfinetes entomológicos transfixando a região entre o escudo e a base do gnatosoma. Foi realizada a dissecação através da incisão do sulco marginal, contornando totalmente o idiossoma com auxílio de tesoura oftálmica curva de ponta fina e pinças entomológicas, em microscópio estereoscópico. O tegumento dorsal foi rebatido expondo a cavidade geral, sendo banhada com solução fisiológica fria (4°C) para aumentar a consistência dos órgãos e possibilitar a extração dos intestinos e glândulas salivares de cada exemplar.

As ninfas e os machos foram colocados em lâminas para microscopia contendo solução fisiológica a 4°C e dissecados conforme a metodologia descrita anteriormente.

Os intestinos coletados foram macerados com auxílio de estiletes descartáveis em lâminas de microscopia, fixados em metanol e corados pelo método de Giemsa. O exame do material foi realizado em microscópio ótico, utilizando-se objetivas de 100X e ocular micrométrica de 10X.

As glândulas salivares foram coletadas e lavadas em solução salina e divididas em duas partes, sendo que uma parte foi macerada em lâmina, fixada em metanol, corada com Giemsa e observada em microscópio ótico. A outra parte foi colocada em tubos criogênicos de 2ml com tampa de rosca (Simport- CAN) contendo EDTA 10 mM e mantida criopreservada a -196°C para extração de DNA.

## **2.6 Obtenção de Ovos e Larvas de *B. microplus***

Fêmeas ingurgitadas (n=30) de *B. microplus*, ao desprenderem-se naturalmente do hospedeiro infestado (Eq<sub>1</sub>) foram coletadas, levadas ao laboratório, separadas individualmente em placas de petri descartáveis e incubadas à temperatura de 27 ± 2°C e umidade relativa superior a 80% (BARREIRA, 2001).

A partir do quinto dia de incubação, os ovos de cada teleógina foram coletados diariamente e separados em duas alíquotas sendo uma destinada à extração de DNA, a qual foi acondicionada em tubo tipo *ependorf* (1,5 mL), devidamente identificada e conservadas a -20°C até o momento de uso. A outra alíquota foi mantida em seringas descartáveis para obtenção de larvas, as quais foram posteriormente acondicionadas em *ependorfs* (1,5 mL) devidamente identificados e conservadas -20°C para a extração de DNA.

## **2.7 Análise Morfológica e Morfométrica**

A caracterização morfológica e morfométrica das formas de desenvolvimento observadas nos carrapatos estudados foram analisadas observando formas e tamanhos (diâmetro maior e diâmetro menor), sendo que a análise morfológica foi realizada com auxílio de microscópio óptico (Leitz Dialux 20 ES, Leitz) e a análise morfométrica com o auxílio de ocular micrométrica (pZo, Wild) acoplada ao microscópio óptico. Os parâmetros avaliados foram diâmetro maior (DM), diâmetro menor (dm) e índices morfométricos ( $IM = dm/DM$ ) de cada forma observada ( $n=30$ ) de *B. equi* em glândula salivar e intestino dos carrapatos estudados.

A identificação dos ácinos seguiu o critério descrito por Binnington (1978), baseado na presença de células granulares e no tamanho e posição dos ácinos dentro da glândula salivar. As glândulas salivares de fêmeas adultas de *B. microplus* apresentam três tipos de ácinos (I, II e III), sendo o ácino tipo I composto de células não-granulares, enquanto os ácinos II e III contêm células granulares. Os ácinos estão diferentemente arranjados ao longo do comprimento de cada glândula salivar, em relação ao ducto glândular principal (BINNINGTON, 1978).

## **2.8 Detecção Molecular de *B. equi* em *B. microplus*.**

### **2.8.1 Obtenção de DNA a partir de amostras de glândulas salivares de ninfas, fêmeas e machos.**

A extração de DNA das amostras de glândulas salivares foi realizada empregando-se o Kit comercial GFX<sup>TM</sup> Genomic Blood DNA Purification Kit, Amersham Biosciences, seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram acondicionadas em tubos do tipo *ependorff* (1,5 mL) identificados, onde foram adicionados 300 µL de solução de lise. Após homogeneização por inversão e incubação à temperatura ambiente, por cinco minutos, a mistura foi centrifugada a 16.110 xg e o sobrenadante foi descartado. Após o descarte, 300 µL de solução de lise, os tubos foram homogeneizados como descrito anteriormente e incubados por cinco minutos a temperatura ambiente, a mistura foi transferida para a coluna GFX e centrifugada a 5.900 xg durante um minuto. O filtrado foi descartado, e 500 µL da solução de extração foi adicionada e centrifugada a 5.900 xg por um minuto. O filtrado foi novamente descartado, e 500 µL da solução de lavagem foi adicionado a cada coluna e centrifugado a 16.110 xg durante três minutos. Em seguida, as colunas GFX foram transferidas para tubos do tipo *ependorff* (1,5 mL) identificados e foi adicionado água estéril a 70°C e incubado a temperatura ambiente por um minuto. Após centrifugação a 5.900 xg, por um minuto a coluna GFX foi descartada e o eluato obtido no final da extração foi armazenado a -20°C, em tubos do tipo *ependorff* de 0,2 mL, em alíquotas de 25 µL *ependorff* para posterior PCR.

### **2.8.2 Obtenção de DNA a partir de amostras de ovos e larvas de *B. microplus*.**

A metodologia aplicada para a extração de DNA de ovos e larvas de *B. microplus* foi baseada na técnica descrita por Oliveira-Sequeira et al. (2005).

Para a extração de DNA dos ovos e larvas foi feitos *pools* cada um contendo duas amostras (ovos e larvas). No total foram obtidos 15 *pools* de ovos e 15 *pools* de larvas os quais foram colocados cada um em tubo de 1,5 mL ao qual foi adicionado 10 µL de tampão TE pH 8,0 (TRISHCL 10 mM; EDTA 1mM). Os *pools* foram macerados com auxílio de bastões descartáveis adaptados. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 5.900 xg por 2 minutos. Ao macerado foi adicionado 20 µL de proteinase K (20 µg/mL em Tris-HCL 10mM, pH 8,0) e incubado a 56°C “overnight”.

As amostras foram submetidas à extração pelo kit GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit, Amersham Biosciences, de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, 500 µL de solução de lise foram adicionadas aos tubos do tipo *ependorf* identificados, os quais foram homogeneizados por inversão e incubados por cinco minutos a temperatura ambiente. A mistura foi transferida para a coluna GFX e centrifugada a 5.900 xg durante um minuto. O filtrado foi descartado, e 500 µL da solução de extração foi adicionada e centrifugada a 5.900 xg por um minuto. O filtrado foi descartado, e 500 µL da solução de lavagem foram adicionadas a cada coluna e centrifugadas a 16.110 xg durante três minutos. Em seguida, as colunas GFX foram transferidas para tubos do tipo *ependorf* (1,5 mL) identificados e foi adicionada água estéril a 70°C e incubado a temperatura ambiente por um minuto. Após centrifugação a 5.900 xg, por um minuto a coluna GFX foi descartada e o eluato obtido no final da extração foi armazenado a -20°C, em tubos do tipo *ependorf* de 0,2 mL, em alíquotas de 25 µL para posterior PCR.

### 2.8.3 Reação de amplificação

Os testes de PCR para *B. equi* foram realizados segundo Bashiruddin et al. (1999).

Foram empregados os pares iniciadores BEQF (5'-CATCGTTGCGGCTTGGTTGG-3') e BEQR (5'-CCAAGTCTCACACCCTATTT-3') os quais flanqueiam um fragmento espécie-específico de 664 pares de base da sequência de DNA da região 18S rRNA (BASHIRUDDIN et al. 1999).

Para a preparação do mix das reações foi utilizado um volume total de 50µL, composto por 35,75 µL de água ultra pura (DNase/RNase-Free Distilled Water – Invitrogen®), 5 µL de Tampão para PCR 10X (PCR buffer 10X Invitrogen®), 2,0 µL de Cloreto de Magnésio (MgCl<sub>2</sub> 50 mM - Invitrogen®); 1µL de dNTP 10 mM (Amersham Biosciences®); 0,5 µL (10 pM) do iniciador *forward*, 0,5 µL (10 pM) do iniciador *reverse*, 0,25 µL de Taq 5 U/µL (Invitrogen) e 5 µL do DNA genômico da amostra. Foram empregadas alíquotas de DNA extraídas de amostras de *B. equi* procedente de um equino (gentilmente cedido pela Dra. Rosângela Zacaria Machado da UNESP/Jaboticabal) e DNA extraído de *B. microplus* procedente de bovino.

O processo de amplificação foi realizado em termociclador (Mastercycler Personal, Eppendorf) programado para um ciclo inicial de 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos repetidos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e uma extensão final de 72°C a 2 minutos.

### 2.8.4 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os produtos de DNA amplificado (*amplicons*) foram posteriormente aplicados em gel de agarose 1,5% (Agarose NA – Amersham Biosciences) em tampão TBE1x. Um volume de 10 µL dos produtos de PCR homogeneizados em 2,5 µL de corante de corrida (25% Ficoll 400, 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol em 9 partes de glicerol) e aplicado em cada poço do gel. Como marcador de massa molecular foi empregado o *DNA Ladder 100pb* (Invitrogen).

As eletroforeses foram conduzidas em cuba (Horizon 11.14, Life Technologies®) ligada à fonte (250 EX, Gibco EBRL) programada para corrida a 90 V, durante 60 minutos. Após a corrida os géis foram corados por imersão em solução de brometo de etídio (0,4 µg/mL) e os produtos visualizados em transiluminador de UV (Electronic UV Transilluminator, Ultra-Lum), em ambiente escuro.

As documentações fotográficas dos resultados das eletroforeses foram efetivadas e armazenadas em arquivos digitais no formato JPG por meio de *software* processador de imagens (PhotoCapt, Vilber Lourmat).

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Avaliação Clínica dos Equinos Infectados Naturalmente por *B. equi*.

Durante as infestações os equinos apresentaram reações cutâneas em forma de pápulas, estendendo-se pela região da tábua do pescoço e escápula. Estas lesões eram observadas na região de fixação das larvas.

Em relação à avaliação clínica nenhuma alteração foi observada durante a fase experimental. Os exames de esfregaços sanguíneos corados pelo método de Giemsa revelaram uma parasitemia baixa (0,01%) durante todo o período de avaliação para ambos animais, sendo às vezes superior (0,025%) para o animal Eq<sub>1</sub> (esplenectomizado), principalmente a partir do 8º dia após infestação com larvas de *B. microplus*.

### 3.2 Desenvolvimento de *B. equi* no Intestino de Ninfas, Fêmeas e Machos

Foram dissecados no total 860 espécimes (ninfas= 432; fêmeas= 280 e machos= 148). No conteúdo intestinal das ninfas foi observada a partir do 2º dia pós-ecdise, a presença de pequenas formas em anel com citoplasma avermelhado e núcleo marginal. Estas formas aumentaram de tamanho mensurando 2,8 a 3,7 µm, ao mesmo tempo em que iniciaram divisão nuclear, sendo observadas formas com três núcleos dispersos e mal definidos (**Figura 1a**). Estes estágios foram definidos como microgamontes.

No 3º dia pós-ecdise das ninfas foi observada formas em anel com citoplasma azulado e binucleado situado na posição marginal (**Figura 1b**). Estas formas são consideradas macrogametas binucleados

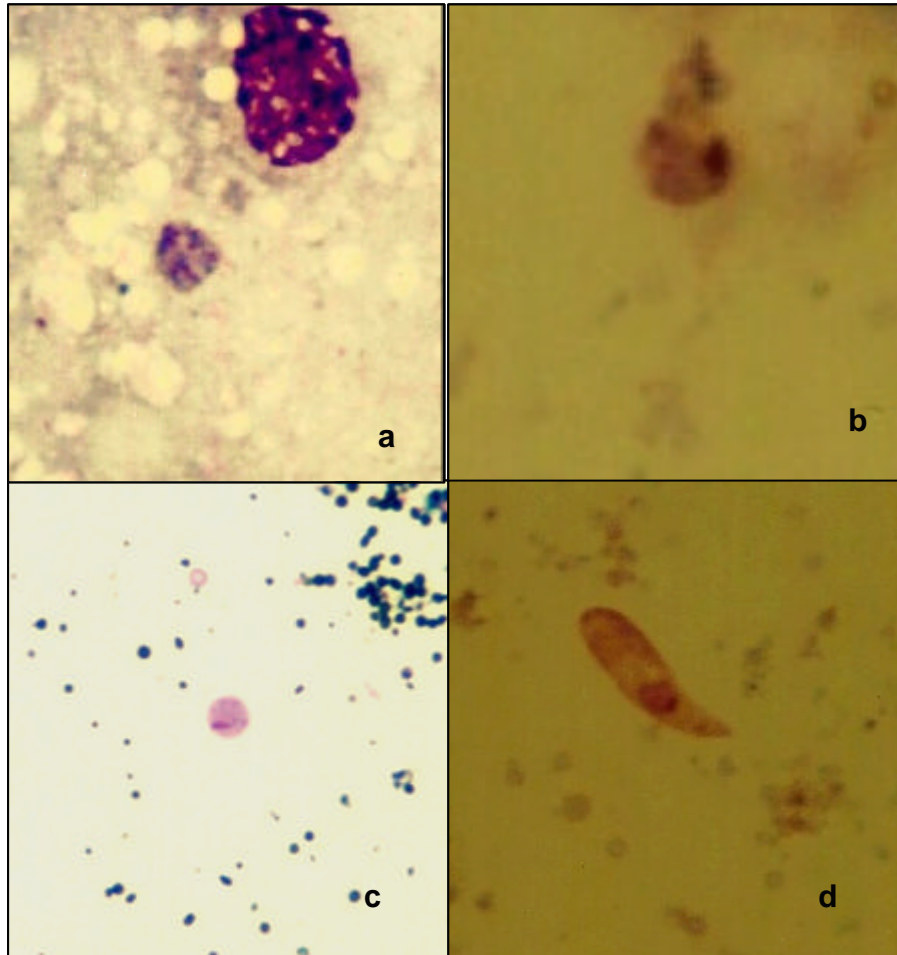
Apesar de não ter sido observado a fusão dos gametas, contudo, a partir do 5º e 7º dia pós-ecdise, formas apresentando citoplasma disperso e com coloração violeta avermelhado e um núcleo mal definido situado na periferia foram visualizadas assemelhando-se a um zigoto imaturo (**Figura 1c**).

A partir do 8º dia foram observadas formas com aspecto claviforme, denominados de oocinetos medindo 11,2 -15,6 µm de comprimento e 3,5 – 8 µm de largura com núcleo central localizado na porção posterior. Algumas vezes localizado na região mediana do parasito. O citoplasma apresentava-se com aspecto denso e uniforme (**Figura 1d**). Pode-se observar nestes estágios a formação de vacúolos no citoplasma.

As análises por microscopia óptica do conteúdo intestinal de fêmeas e machos não revelaram a presença de formas em desenvolvimento de *B. equi*.

### 3.3 Análise das Amostras de Hemolinfas de Ninfas, Machos e Fêmeas

Os primeiros esporocinetos de *B. equi* foram observados nas hemolinfas das ninfas a partir do 8º pós-ecdise e somente ocorreu até o 10º dia pós-ecdise. Os esporocinetos imaturos, inicialmente observados no 8º pós-ecdise, apresentavam-se com formas vermiculares, possuindo núcleo arredondado, corado de vermelho e localizado principalmente na extremidade anterior do parasito, entretanto, foi observado também na região mediana. O citoplasma nestes estágios imaturos é denso e uniforme, corando-se de rosa em toda a sua extensão. Com a maturação dos esporocinetos, o citoplasma começou a apresentar vacúolos que aumentaram de tamanhos. Os esporocinetos na hemolinfa variaram de 4,0 a 8,0 µm no seu diâmetro menor e 11 a 16 µm no seu diâmetro maior. Nas hemolinfas de fêmeas e machos não foram observadas a presença destes esporocinetos.



**Figura 1 - a, b, c e d**– Formas de *Babesia equi* em conteúdo intestinal de ninfas de *Boophilus microplus* infectadas experimentalmente. **a)** microgamonte multinucleado mostrando três núcleos; **b)** macrogameta binucleado; **c)** zigoto imaturo; **d)** oocineto com citoplasma homogêneo. (100x obj x 10x oc).

### 3.4 Desenvolvimento de *B. equi* em Glândulas Salivares de Ninfas, Fêmeas e Machos de *B. microplus*

#### 3.4.1 Microscopia óptica

Das 860 glândulas salivares observadas foram observadas 376 com infecção por *B. equi*, sendo 214 (50,23%) ninfas, 98 (35%) fêmeas e 64 (43,25%) machos.

A partir do 3º dia pós-ecdise foram observados esporocinetos nos ácinos das glândulas salivares das ninfas, alguns apresentavam mudanças em suas características estruturais e transformaram-se em corpos esféricos densos (**Figura 2**).

No 4º dia pós-ecdise, inicialmente massas esporogônicas ou corpos multinucleados foram observados nos alvéolos parasitados. Essas massas esporogônicas são denominadas de esporoblastos que podem apresentar uma coloração pálida e homogênea pelo corante Giemsa. A partir do 5º dia foi observada a fragmentação destas massas que se transformaram em vários esporoblastos esféricos mensurando 5-16 µm de diâmetro (**Figura 3**), com a evolução da esporogonia, após múltiplas divisões, pequenos pontos com intensa coloração roxa, iniciaram um processo de brotamento radial, na periferia destes esporoblastos dando origem aos esporozoítas (**Figura 4**).

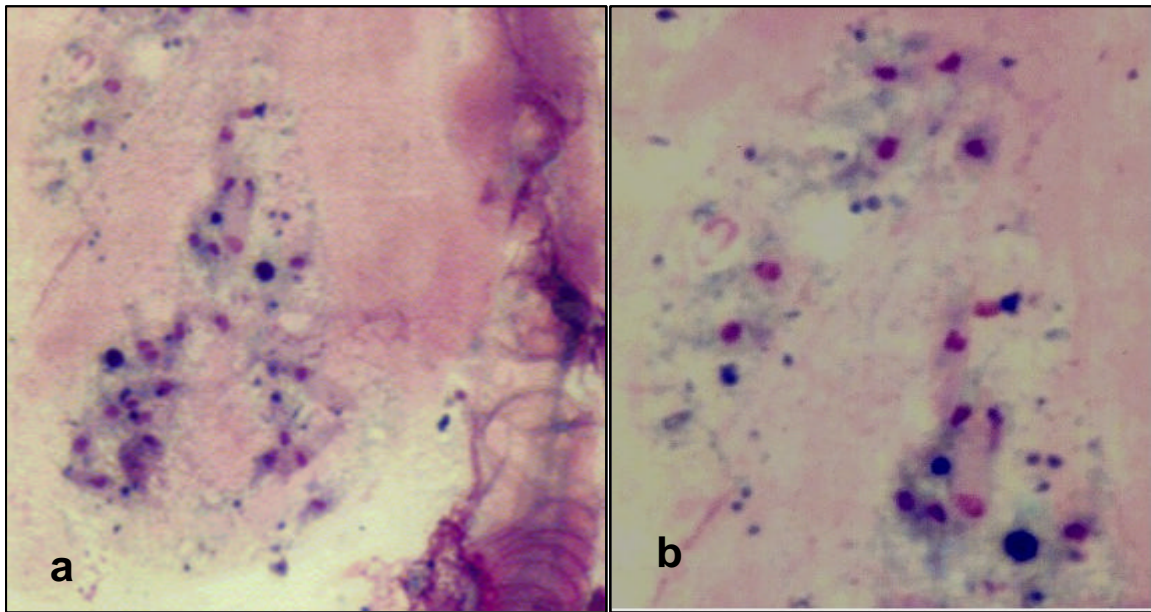
As massas esporogônicas levaram a hipertrofia dos ácinos parasitados que apresentaram um aumento de tamanho significativo. O diâmetro destes ácinos variou entre 380 a 560 µm, considerando que para os alvéolos não infectados o diâmetro variou de 73 a 120 µm (**Figura 5a**).

A formação dos esporozoítas não foi sincronizada e os ácinos infectados apresentavam diferentes estágios de desenvolvimento em todas as glândulas analisadas, com a presença de esporoblastos e esporozoítas simultaneamente dentro da mesma célula acinar.

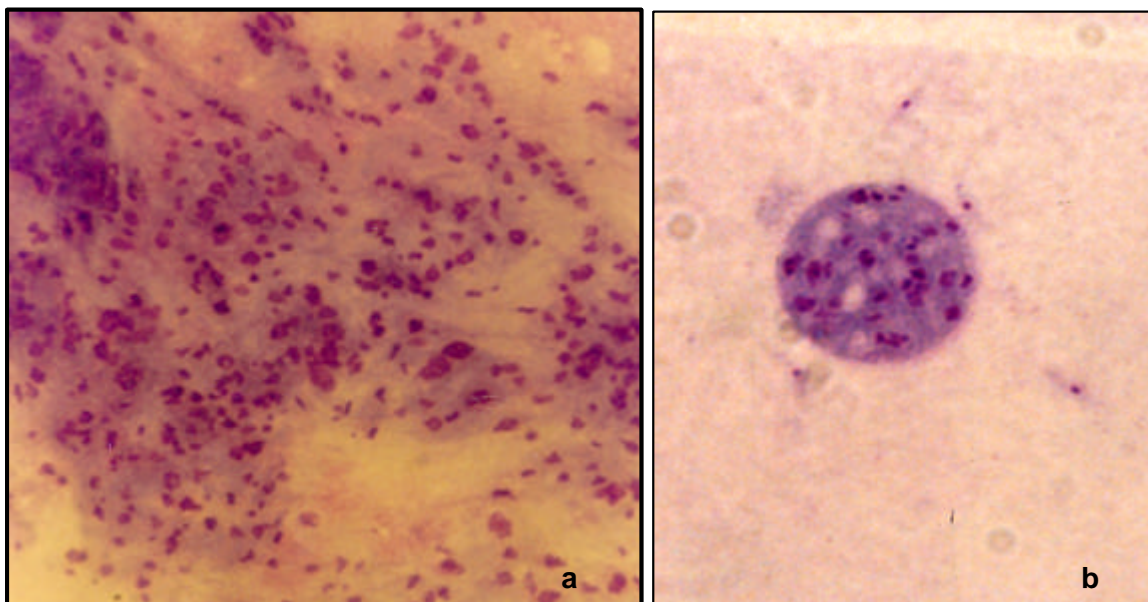
O processo de desenvolvimento de esporozoítas foi rápido, visto que no 4º dia após ecdise, as células acinares estavam repletas por um grande número de parasitos (**Figura 5b**). Foram observados esporozoítas ovóides com 1,5 µm de diâmetro e, alongados com 3,8 a 5,2 µm de comprimento de 0,8 a 1,5 µm de largura (**Figura 6**) com núcleo pequeno e excêntrico.

Após ecdise para fêmeas e machos, pode ser observado o mesmo desenvolvimento esporogônico observado para as ninfas desde o estágio de esporoblastos e esporozoítas indicado um nova fase de esporogonia nestes estágios (**Figura 7**).

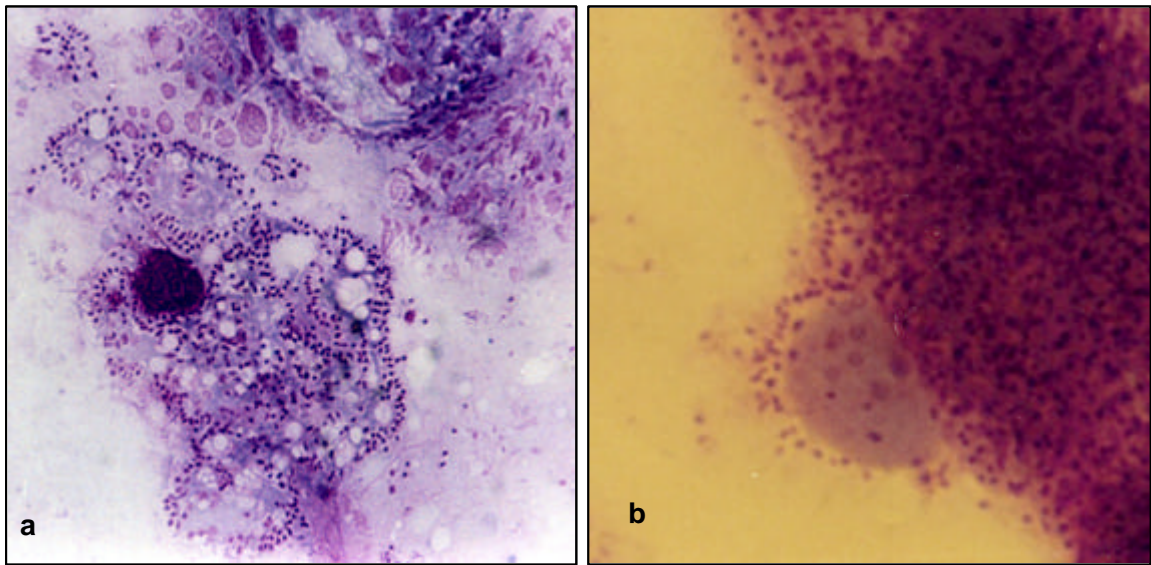




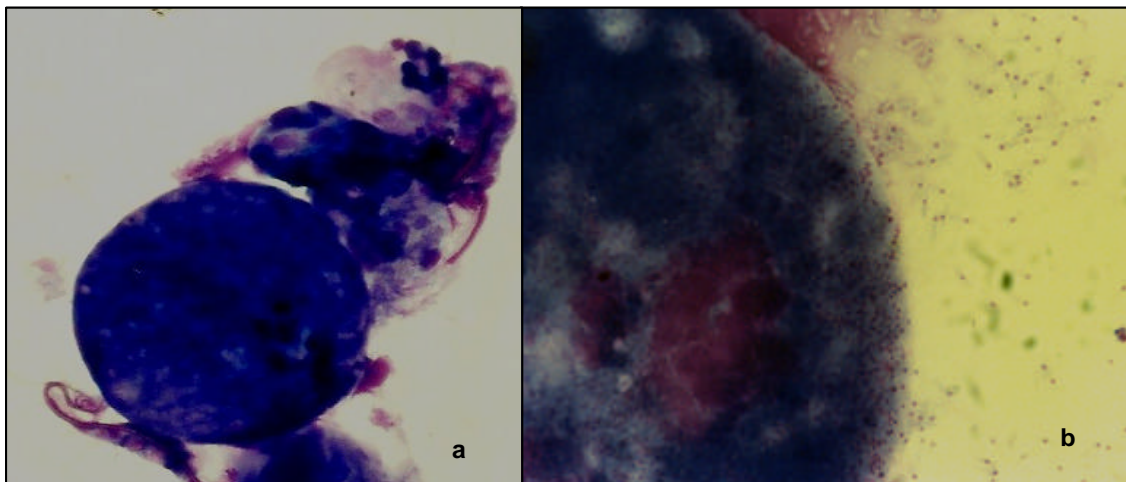
**Figura 2** – Esporocinetos de *Babesia equi* em glândulas salivares de ninfas de *Boophilus microplus* transformando-se em corpos esféricos densos.



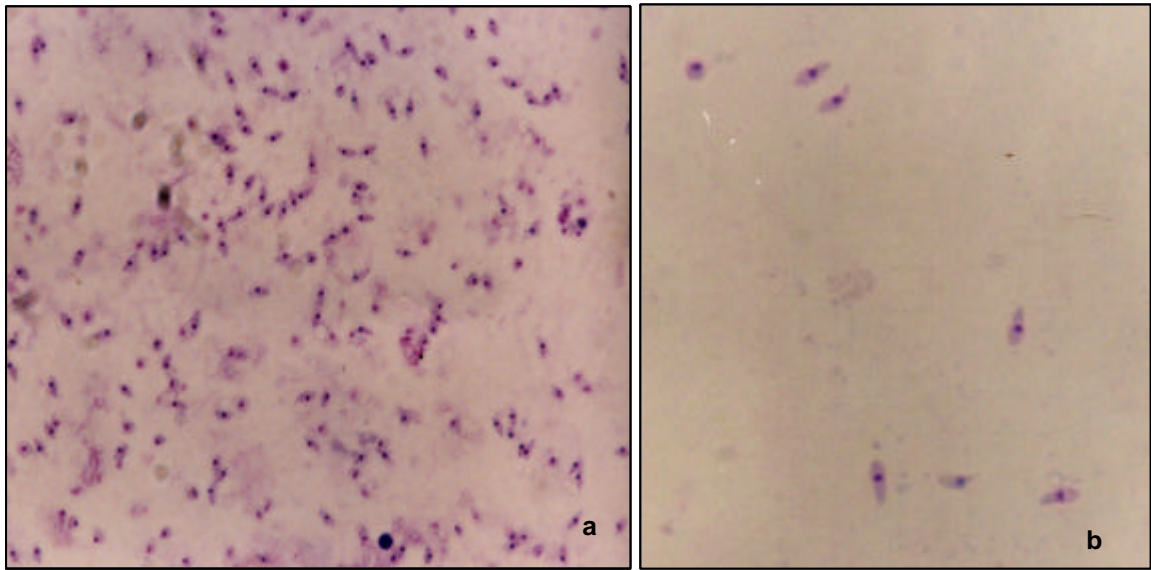
**Figura 3 - a)** Massas esporogônicas multinucleadas de *Babesia equi* observadas em ácinos de glândulas salivares de ninfas de *Boophilus microplus*; **b)** esporoblasto esférico multinucleado (100x obj x 10x oc)



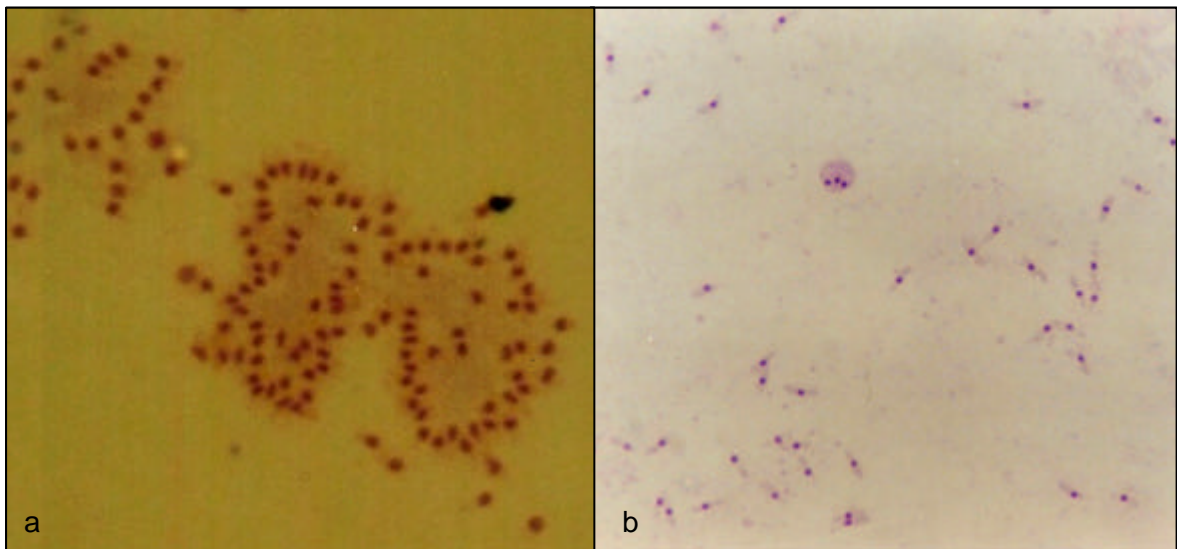
**Figura 4 a e b)**- Esporozoítas de *Babesia equi* em desenvolvimento pelo processo de brotamento radial, a partir de corpos resultantes da fissão múltipla em glândulas salivares de ninfas de *Boophilus microplus* infectados experimentalmente (100x obj x 10x oc).



**Figura 5- a)** Ácino celular de glândula salivar de ninfa de *Boophilus microplus* com visível aumento alveolar parasitada por *Babesia equi*; **b)** ácino celular com vários esporozoítas de *B. equi*. (100x obj x 10x oc).



**Figura 6 – a e b)** Esporozoítas alongados e ovóides de *Babesia equi* em glândulas salivares de ninfas de *Boophilus microplus* infectados experimentalmente. (100x obj x 10x oc).



**Figura 7 –** Formas de *Babesia equi* em glândulas salivares de machos de *Boophilus microplus* infectados experimentalmente. **a)** Esporozoítas em desenvolvimento pelo processo de brotamento radial. **b)** Esporozoítas alongados e ovóides. (100x obj x 10x oc).



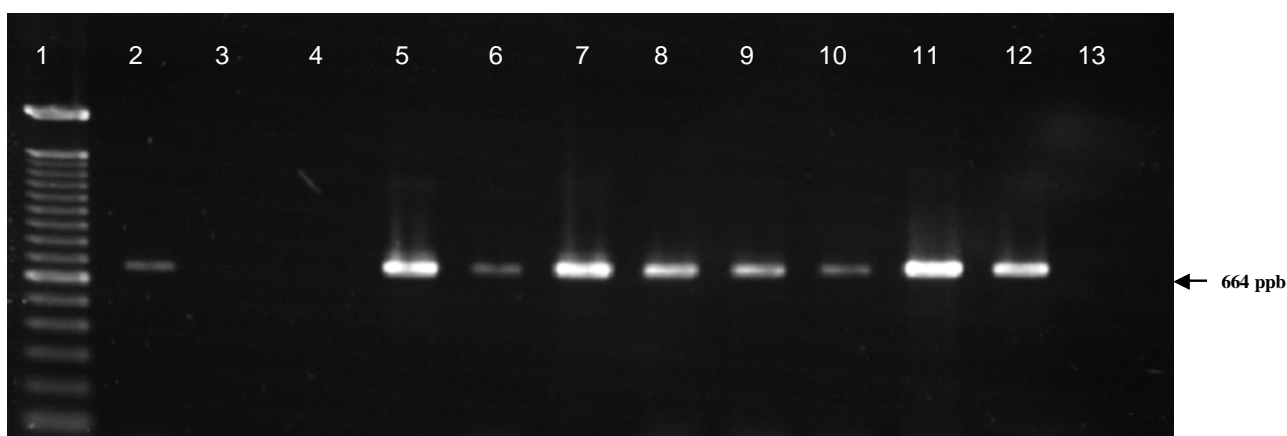
### 3.4.2 Amplificação de DNA de *B. equi* em glândulas salivares de ninfas, fêmeas e machos de *B. microplus*.

A reação em cadeia de polimerase, realizada a partir de glândulas salivares de ninfas, fêmeas e machos, empregando-se os iniciadores BEQF e BEQR gerou produtos de amplificação espécie específico de 667 pb para *B. equi* (**Figura 7**).

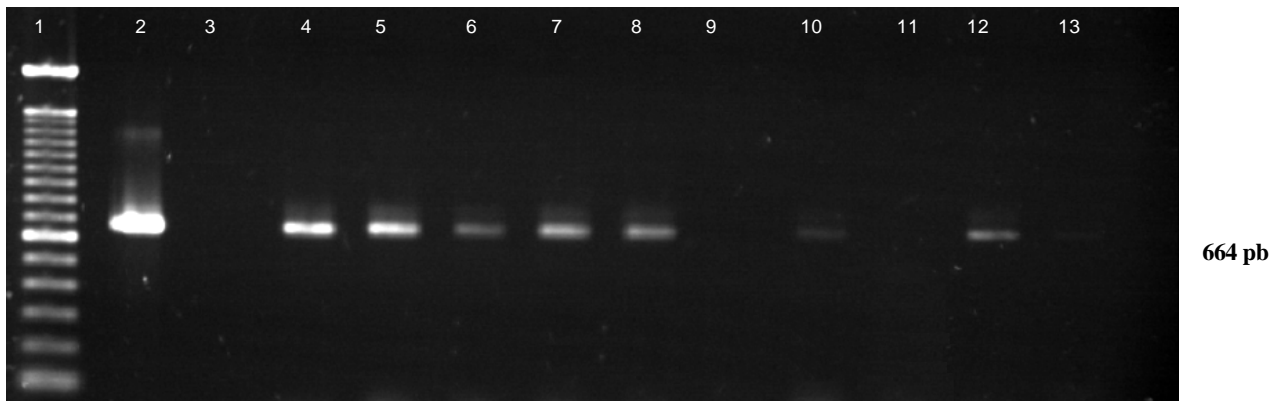
### 3.5 Amplificação de DNA de *B. equi* em ovos e larvas de *B. microplus*.

A análise eletroforética dos produtos de amplificação mostrou a presença de bandas de aproximadamente 667 pb para DNA de *B. equi* extraídos de ovos e larvas procedentes de fêmeas experimentalmente infectadas (**Figura 8 e Figura 9**).

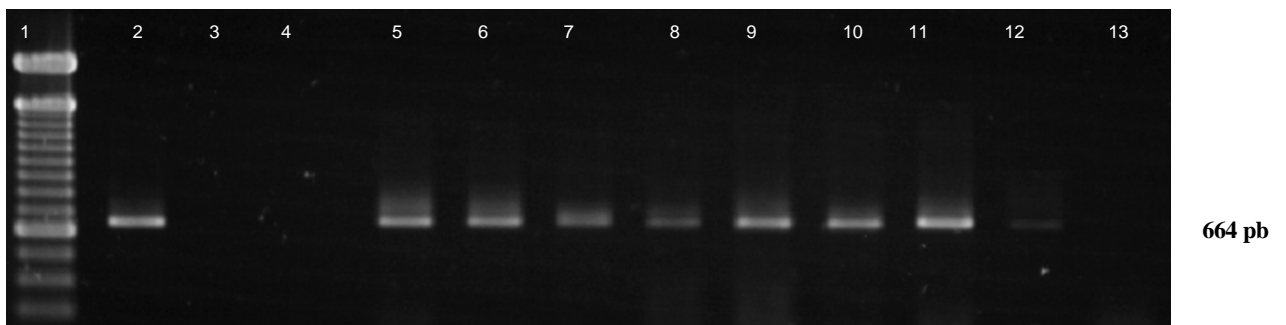
A reação em cadeia de polimerase, realizada a partir de ovos e larvas de *B. microplus*, foi capaz de produzir sinais de amplificação em aproximadamente 74% e 67% das amostras testadas.



**Figura 7-** Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *Babesia equi* pela técnica de PCR, em glândulas salivares de ninfas, fêmeas e machos de *Boophilus microplus*. **Linha 1**, marcador de peso molecular 100pb; **Linha 2**, controle positivo; **Linha 3**, controle negativo da reação; **Linha 4**, DNA *B. microplus* livres de *B. equi* colhido de bovino **Linhas 5, 6 e 7** glândulas salivares de ninfas; **Linhas 8, 9, 10 e 11**, glândulas salivares de fêmeas; **Linhas 12 e 13**, glândulas salivares de machos.



**Figura 8:** Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *Babesia equi* pela técnica de PCR, em ovos de *Boophilus microplus*. **Linha 1**, marcador de peso molecular 100pb; **Linha 2**, controle positivo; **Linha 3**, controle negativo da reação; **Linhas 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13**, amostras de ovos de *Boophilus microplus*



**Figura 9:** Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *Babesia equi* pela técnica de PCR, em larvas de *Boophilus microplus*. **Linha 1**, marcador de peso molecular 100pb; **Linha 2**, controle positivo; **Linha 3**, controle negativo da reação; **Linhas 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13**, amostras de larvas de *Boophilus microplus*

## 4 DISCUSSÃO

Todas as formas de desenvolvimento de *B. equi* observadas no conteúdo intestinal de *B. microplus* corroboram com as observações de Zapf; Schein (1994) em *Hyalomma* spp. Entretanto, as formas iniciais de desenvolvimento do parasito após ingestão de sangue infectado não foram observadas, assim como a fase da reprodução sexual.

Os estágios raiados, considerados como microgametas, descritos pela primeira vez por Koch (1906) para *B. bigemina* e posteriormente observado por outros autores para diferentes espécies, incluindo *B. equi* (ZAPF; SCHEIN, 1994a), não foram observados no presente estudo, provavelmente em decorrência destes corpos desaparecerem em poucas horas e, somente parasitos uninucleados similares a microgametas puderam ser observados.

O desenvolvimento da esporogonia de *B. equi* em glândulas salivares de *B. microplus* inicia-se com a penetração dos esporocinetos nas células acinares entre o 2º e 4º dia após a ecdise para ninfas e termina seu processo com o ingurgitamento das ninfas período este que correspondeu a 10 dias. Depois da ecdise foi observado em fêmeas e machos o desenvolvimento de uma nova esporogonia a partir do 2º dia após ecdise, concordando com o observado por Zapf; Schein (1994b) em *Hyalomma*.

Neste estudo foram observados, esporocinetos, esporoblastos e esporozoítas em ácinos tipo III de glândulas salivares de ninfas, fêmeas e machos de *B. microplus*. A caracterização morfológica e morfométrica dos esporozoítas observados nas glândulas salivares dos espécimes estudados coincidem com as características descritas por Zapf; Schein (1994b) em estudo por microscopia óptica e por Guimarães et al. (1998) em nível de microscopia eletrônica.

As massas de parasitos observadas em glândulas salivares de ninfas, fêmeas e machos de *B. microplus* podem ser consideradas esporoblastos (formas jovens), baseado nas suas características morfológicas, que são similares aos estudos descritos anteriormente para *B. equi* (MOLTMANN et al. 1983; ZAPF; SCHEIN, 1994b; GUIMARÃES et al., 1998a) e para *Theileria* spp (PURNELL et al., 1975; YOUNG et al., 1980; HIGUCHI, 1986).

O desenvolvimento de esporozoítas de *B. equi* não foi tão rápido quando comparado com o que foi observado em outras espécies de *Babesia* e *Theileria*. Entretanto a comparação das taxas de desenvolvimento durante a esporogonia, em diferentes espécies de *Babesia*, é difícil, pois nem todos os carrapatos fixam-se ou alimentam-se ao mesmo tempo ou com a mesma velocidade e a rapidez com que o parasito se desenvolve depende da idade do carrapato e da temperatura do ambiente (YOUNG et al., 1979). Esporocinetos penetram nas glândulas salivares em tempos diferentes e o grau de desenvolvimento do parasito em ácinos adjacentes pode variar (FAWCETT et al., 1985). A análise do estágio de diferenciação dos parasitos, alguns dias após a fixação dos carrapatos, oferece somente uma base grosseira para a comparação do tempo de curso da esporogonia. É importante que os carrapatos alimentem-se por um período suficiente para permitir a completa formação dos esporozoítas. Nas espécies de *Hyalomma* o período varia de um a cinco dias (MOLTMANN et al., 1983; ZAPF; SCHEIN, 1994) em fêmeas adultas de *B. microplus* foi observado a partir de 2º dia após a alimentação (GUIMARÃES et al. 1998a). Em *Theileria anullata* em *H. anatolicum anatolicum* foi de dois a três dias (SINGH et al., 1979). Em *H. detritum* o período observado foi de três dias (SAMISH; PAPINO, 1978). Neste estudo foi observada a presença de esporozoítas a partir do 4º dia pós-ecdise das ninfas de *B. microplus* e a partir do 5º dia um grande número de formas livres ocupava todo o interior da célula do hospedeiro.

Os esporozoítas alongados observados em glândulas salivares de ninfas e adultos apresentaram dimensões similares (3,8 a 5,2 µm) aos observados em *Hyalomma* -3,0 x 1,2 µm (MOLTMANN et al., 1983) e apresentaram dimensões superiores ao observado em *B.*

*microplus* – 2,0 x 1,2 µm (GUIMARÃES et al. 1998a) e também quando comparado com outras espécies de *Babesia*, incluindo *B. bovis* – 2,5 x 1,3 µm e *B. bigemina* – 2,9 x 1,83 µm, (POTGIETER; ELS, 1976 e 1979) *B. bovis* 2,8 x 1,23 µm (MOLTMANN et al., 1982), *B. microti* – 2,4x 0,73 µm (KARAKASHIAN et al., 1983; PIESMANN et al., 1986) e *B. caballi* 2,5 x 1,5 µm (BLOUIN; DE WALL, 1989).

O progressivo aumento das células alveolares ao mesmo tempo, representa uma característica semelhante no desenvolvimento de *B. equi* e *Theileria* como citado anteriormente por Young; Purnell (1973) e tem sido também considerado como uma diferença significativa entre outras espécies de *Babesia* (HOLBROOK et al. 1968; WEBER; FRIEDHOFF, 1979).

Young; Purnell (1973) classificaram os estágios parasitários de *T. parva* em desenvolvimento nas glândulas salivares de adultos de *R. appendiculatus* como esporontes (forma jovem), esporoblastos (formas intermediárias) e esporozoítas (formas maduras) com base em esfregaços corados com Giemsa. Schein; Friedhoff (1978) e Young et al. (1980) fizeram várias subdivisões descrevendo os esporoblastos como formas primárias (esporonte), secundárias e terciárias em *T. annulata* e *T. taurotragi*, os quais eles identificaram em glândulas salivares de adultos nas espécies *Hylomma* e *Rhipicephalus*, respectivamente.

Comparando estes achados com o presente resultado mostra que a morfologia dos estágios em desenvolvimento de *B. equi* nas células acinares das ninfas ingurgitadas e, após a ecdise dos adultos alimentados, respectivamente, se assemelha em grande parte com as espécies de *Theileria*. Assim, o aparecimento do complexo multinucleado e de diversos corpos em fissão múltipla descritos como esporoblastos é semelhante em espécies de *Theileria* bovina. Também a formação de numerosos esporozoítas ovóides ou alongados pela contínua divisão nuclear e pelo processo de divisão radial dos corpos em fissão múltipla assemelham-se com o que foi descrito para o gênero *Theileria* e diverge-se do que foi descrito para o gênero *Babesia* (ZAPF; SCHEIN, 1994).

Guimarães et al. (1983) estudaram anteriormente a formação de esporozoítas de *B. equi* em glândulas salivares de adultos ingurgitados do carrapato *B. microplus*, por microscopia óptica e eletrônica. Entretanto, em contraste com nossos resultados, estes autores não demonstraram a formação de estágios infectantes nas ninfas ingurgitadas. No entanto, a esporogonia em *B. equi* descrito por estes autores corresponde em detalhes com o presente trabalho obtido pela microscopia óptica.

Como resultado, este é a primeira descrição do desenvolvimento de *B. equi* no intestino de ninfas de *B. microplus*, assim como da esporogonia em glândulas salivares de ninfas durante e a alimentação em equinos infectados naturalmente. Embora, no presente estudo não tenha sido demonstrado a função da esporogonia na transmissão de *B. equi*, os esporozoítas observados nas glândulas salivares das ninfas, fêmeas e machos apresentam todas as características de formas infectantes em desenvolvimento. Portanto, é possível que a esporogonia possa ter significativa importância na transmissão de *B. equi* principalmente pelo macho de *B. microplus*, como demonstrado por Stiller et al. (2002). Principalmente em virtude da motilidade e longa sobrevivência (70 dias) permitindo desta forma a sua transferência para outro hospedeiro (GONZALES et al., 1974; MASON; NOVAL, 1981).

Neste estudo a taxa de infecção dos carrapatos com *B. equi* foi de aproximadamente 44%, demonstrando alta susceptibilidade dessa espécie. Guimarães et al. (1998) e Uetti et al. (2005) relataram esta alta susceptibilidade ao observarem uma infecção de 80% e 70%, respectivamente. Uetti et al (2005) demonstraram esta habilidade do *B. microplus* de se infectar ao ser alimentado em equinos com baixa parasitemia (infecção crônica) para *B. equi* o que corrobora com os dados observados neste trabalho.

A detecção de DNA de *B. equi* em ovos e larvas de *B. microplus* demonstram a infecção destes estágios de desenvolvimento do carrapato e sugerem também a possibilidade

de transmissão transovariana por este carrapato. Estes resultados são semelhantes ao observados por Battsetseg et al. (2001a, 2002) em *D. nuttalli* na Mongólia e em *B. microplus* procedentes do Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil (BATTSETSEG, 2001b).

Os resultados deste estudo demonstram que *B. equi* é capaz de um completo desenvolvimento em intestino e glândulas salivares de *B. microplus*. Estes fatos sugerem que o *B. microplus* possa atuar como vetor natural da *B. equi* e explicar a sua presença em áreas da América Latina onde o carrapato vetor é desconhecido, e em áreas do Brasil onde o *B. microplus* é a espécie predominantemente observada em equídeos. Entretanto estudos futuros devem ser realizados para comprovar a eficiência e os tipos de transmissão de *B. equi* em *B. microplus*.



## CAPÍTULO II

### **DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO E MOLECULAR DE *Babesia equi* EM GLÂNDULAS SALIVARES DE NINFAS E ADULTOS DE *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) INFECTADOS NATURALMENTE NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - BRASIL**

## RESUMO

FERNANDES, Kátia Roberta. **Diagnóstico morfológico e molecular de *Babesia equi* em glândulas salivares de ninfas e adultos de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) infectados naturalmente no Estado do Rio de Janeiro – Brasil.** 2007. 58p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

O presente trabalho demonstrou por meio da reação de cadeia de polimerase (PCR) e microscopia ótica a presença de *Babesia equi* em ninfas e adultos de *Boophilus microplus* coletados de equinos naturalmente infestados e comprovadamente infectados por *B. equi*, procedentes do município de Seropédica, Rio de Janeiro. Foram dissecados 324 espécimes (ninfas= 145, fêmeas= 138 e machos= 41). As glândulas salivares dissecadas foram divididas em duas alíquotas. A primeira foi macerada em lâminas de vidro para microscopia, corada pelo método de Giemsa e observada em microscópio ótico para análise morfológica. E a segunda alíquota foi realizada a extração de DNA, sendo submetida a PCR com *primers* específicos para o gene 18S rRNA. Das glândulas salivares coletadas e submetidas à PCR, 70% apresentaram infecção com *B. equi*. As análises por microscopia ótica das glândulas salivares positivas revelaram os estágios de esporoblastos nas células acinares e o desenvolvimento de esporozoítas alongados. Estes resultados permitem considerar o carrapato *B. microplus*, como potencial vetor biológico desta espécie de *Babesia* no Estado do Rio de Janeiro.

**Palavras chaves:** equídeos, *Theileria equi*, babesiose equina, vetor, ciclo biológico, PCR

## ABSTRACT

FERNANDES, Kátia Roberta. **Diagnosis morphologic and molecular of *Babesia equi* in the salivary glands of nymphs and adults of the *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) naturally infected in the state of Rio de Janeiro – Brazil.** 2007. 58p. (Doctor in Sciences Veterinary, Parasitology Animal). Veterinary Institute, Animal Parasitology Department, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

The present study demonstrated by PCR and optic microscopy the detection of *Babesia equi* in nymphs and adult mature *Boophilus microplus*. The ticks were collected from equines proven to be naturally infected with *B. equi*, from Seropédica city, state of Rio de Janeiro. There were dissected 324 ticks, being 145 nymphs, 138 females and 41 males. The salivary glands were dissected and divided in two parts. The first one was smashed on a microscopic slide, stained with Giemsa and examined on optic microscopy for morphological analyze. The second part was utilized for DNA extraction, being submitted for PCR utilizing specific primers for the 18SRNA. The PCR results from the salivary glands revealed 70% infected with *B. equi*. The analysis utilizing optical microscopy of salivary glands revealed sporoblast stages in acinary cells and the development of elongated sporozoites. The results allow to consider the tick *B. microplus* as a potential biologic vector of *B. equi* in the state of Rio de Janeiro.

**Key words:** *Babesia equi*, vector, *Boophilus microplus*, salivary glands, PCR

## 1 INTRODUÇÃO

A *Babesia equi* é um hemoparasito transmitido por carrapatos que acomete equídeos determinando uma manifestação clínica que pode variar de uma infecção leve, sem sintomas aparentes, até uma doença aguda e fatal, atingindo principalmente equinos adultos, importados de áreas indenes e introduzidos em regiões endêmicas. É uma doença cosmopolita, considerada emergente nos países subtropicais, e presente em áreas que abrigam 90% da população equina mundial (FRIEDHOFF et al., 1990).

A transmissão e distribuição de *B. equi* na Europa e Ásia, está relacionada a cerca de oito espécies de carrapatos dos gêneros *Dermacentor*, *Hyalomma* e *Rhipicephalus*. No entanto, os vetores deste protozoário nas Américas são pouco conhecidos, sendo que experimentalmente, já foi demonstrada a infecção de *Boophilus microplus* (STILLER et al., 2002, GUIMARÃES, et al., 1998; UETI et al., 2005) por esta espécie do gênero *Babesia*.

A primeira citação sobre prováveis formas de desenvolvimento de *B. equi* em glândulas salivares, foi descrita por Brocklesby (1965), citado por Young, Purnell (1973) em carrapatos adultos da espécie *R. pulchellus*, colhidos de uma zebra que apresentava infecção por *B. equi*. Posteriormente, Young, Purnell (1973), estudaram o desenvolvimento de *B. equi* em carrapatos adultos de *R. evertsi* coletados de 40 zebras da Tanzânia. Battsetseg et al. (2001) demonstraram, por meio de técnicas de PCR e nested PCR, a infecção por *B. equi* e *B. caballi* em fêmeas ingurgitadas de *D. nuttalli* coletadas na vegetação da província de Tuv na Mongólia. Posteriormente, esses autores detectaram DNA de ambos protozoários, em ovos e larvas de fêmeas de *D. nuttalli* sugerindo a possibilidade de transmissão transovariana nessa espécie de carrapato (BATTSETSEG et al. 2002a).

No Brasil, a babesiose equina por *B. equi* foi descrita pela primeira vez por Carini (1910) através do diagnóstico clínico e laboratorial de animais originados do Estado de São Paulo, sendo desde então diagnosticada em diversos estados como Rio de Janeiro (PFEIFER BARBOSA et al., 1995; BOTTEON et al., 2002), Minas Gerais (RIBEIRO; LIMA, 1989), Goiás (LINHARES, 1994), e Rio Grande do Sul (CUNHA et al., 1996). Em relação ao vetor biológico, apesar de *Anocentor nitens* e *Amblyomma cajennense* serem as principais espécies de carrapatos que parasitam os equídeos no Brasil, até o presente momento, não foi evidenciado a participação deles na transmissão de *B. equi* (DENNING, 1988).

Battsetseg et al. (2002b) demonstraram por PCR e nested PCR a detecção de DNA de *B. equi* em aproximadamente 96% das amostras de sangue de equinos em 45,3% a 62,5% das fêmeas ingurgitadas, ovos, larvas e ninfas de *B. microplus* colhidos de equinos naturalmente parasitados no Mato Grosso do Sul no Brasil.

O presente trabalho teve como objetivo detectar por meio de microscopia óptica e PCR, a infecção natural de *B. equi* em glândulas salivares do carrapato *B. microplus* coletados de equinos naturalmente infestados com *B. microplus* e infectados para esta hemoparasitose no Estado do Rio de Janeiro

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção das Amostras de *B. microplus*

Foram coletados 360 carrapatos ninfas e adultos (machos e fêmeas ingurgitadas) de dois equinos naturalmente infestados sendo, um macho e uma fêmea, mestiços, mantidos no Campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e comprovadamente infectados por *B. equi* diagnosticado por meio de esfregaços sanguíneos corados pelo método de Giemsa e através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI). No laboratório de Protozoologia da UFRRJ, os carrapatos foram lavados, secados e identificados morfológicamente como sendo da espécie *B. microplus* com base na chave dicotômica proposta por Aragão; Fonseca (1961).

### 2.2. Dissecção de ninfas e adultos de *B. microplus*

Os carrapatos foram dissecados individualmente sobre lâminas de microscopia ótica com solução salina fisiológica estéril (0,75%). Para a extração das glândulas salivares foi realizada incisão no sulco marginal de cada carrapato, contornando totalmente o idiossoma com auxílio de tesoura oftálmica curva de ponta fina e pinças entomológicas, em microscópio estereoscópico. O tegumento dorsal foi rebatido expondo a cavidade geral a qual foi banhada com solução fisiológica fria (4°C) para aumentar a consistência dos órgãos e possibilitar a extração das glândulas salivares de cada exemplar estudado.

As glândulas salivares das ninfas, machos e fêmeas foram divididas em duas partes, sendo que uma parte foi colocada em tubos criogênicos de 2ml com tampa de rosca (Simport-CAN) contendo PBS e mantida criopreservada a -196°C para posterior extração de DNA. A outra parte foi macerada em lâmina de microscopia, fixada em metanol e corada pelo método de Giemsa. O exame do material foi realizado em microscópio ótico (Dilaux 20 ES, Leitz), utilizando-se objetivas de 100X e ocular micrométrica de 10X. A caracterização morfológica e morfométrica das formas observadas foi realizada por meio de ocular micrométrica (pZo, Wild) acoplada ao microscópio ótico.

### 2.3 Detecção Molecular de *Babesia equi* em Glândulas Salivares de Ninfas e Adultos de *B. microplus*.

A Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) foi realizada no laboratório de Biologia Molecular da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO.

#### 2.3.1 Obtenção de DNA a partir de amostras de glândulas salivares de ninfas, fêmeas e machos.

A extração de DNA das amostras de glândulas salivares foi realizada empregando-se o Kit comercial GFX<sup>TM</sup> Genomic Blood DNA Purification Kit, Amershan Biosciences, seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram acondicionadas em tubos do tipo *ependorff* (1,5 ml) identificados onde foram adicionados 300 µl de solução de lise. Após homogeneização por inversão e incubação à temperatura ambiente, por cinco minutos, a mistura foi centrifugada a 5.900 xg por um minuto e o sobrenadante foi descartado. Após o descarte, 300 µl de solução de lise, os tubos foram homogeneizados como descrito anteriormente e incubados por cinco minutos a temperatura ambiente, a mistura foi transferida

para a coluna GFX e centrifugada a 5.900 xg durante um minuto. O filtrado foi descartado, e 500 µl da solução de extração foi adicionada e centrifugada a 16.110 xg por um minuto. O filtrado foi descartado, e 500 µl da solução de lavagem foram adicionados a cada coluna e centrifugados a 16.110 xg durante três minutos. Em seguida, as colunas GFX foram transferidas para tubos do tipo *eppendorf* (1,5 ml) identificados e foi adicionada água estéril a 70 °C e incubado a temperatura ambiente por um minuto. Após centrifugação a 5.900 xg, por um minuto a coluna GFX foi descartada e o eluato obtido no final da extração foi armazenado a -20 °C, em tubos do tipo *eppendorf* de 0,2 ml, em alíquotas de 25 µl para posterior utilização no PCR.

### 2.3.2 Reação de amplificação

Os testes de PCR para *B. equi* foram realizados empregando-se iniciadores e protocolo, segundo ALLSOP et al. (1994).

Foram empregados os pares iniciadores BEQF (5´CATCGTTGCGGCTTGGTTGG-3´) e BEQR (5´-CCAAGTCTCACACCCTATTT-3´) os quais codificam para a sequência de DNA da região 18S rRNA (ALLSOPP et al. 1994) e flanqueiam um fragmento espécie-específico de 664 pares de base.

Para a preparação do mix das reações foi utilizado um volume total de 50µl, composto por 35,75 µl de água ultra pura (DNase/RNase-Free Distilled Water – Invitrogen), 5 µl de Tampão para PCR 10X (PCR buffer 10X Invitrogen), 2,0 µl de Cloreto de Magnésio (MgCl<sub>2</sub>) 50 mM (Invitrogen); 1µl de dNTP 10 mM (Amersham Biosciences); 0,5 µl (10 pM) do iniciador *forward*, 0,5 µl (10 pM) do iniciador *reverse*, 0,25 µl de Taq 5 U/µL (Invitrogen) e 5 µl do DNA genômico da amostra.

O processo de amplificação foi realizado em termociclador (Mastercycler Personal, Eppendorf) programado para um ciclo inicial de 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos repetidos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e uma extensão final de 72°C a 2 minutos.

### 2.3.3 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os produtos de DNA amplificado (*amplicons*) foram posteriormente inoculados em gel de agarose 1,5% (Agarose NA – Amersham Biosciences) em tampão TBE1x. Um volume de 10 µL dos produtos de PCR homogeneizados em 2,5 µl de corante de corrida (25% Ficoll 400, 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol em 9 partes de glicerol) era então inoculado em cada poço do gel. Como marcador de massa molecular foi empregado o *DNA Ladder 100pb* (Invitrogen).

As eletroforeses foram conduzidas em cuba (Horizon 11.14, Life Technologies) ligada à fonte (250 EX, Gibco EBRL) programada para corrida a 90V, durante 60 minutos.

Após a corridas os géis foram corados por imersão em solução de brometo de etídio (0,4µg/mL) e os produtos visualizados em transiluminador de UV (Electronic UV Transilluminator, Ultra-Lum), em ambiente escuro.

A documentação fotográfica dos resultados das eletroforese foi efetivada em equipamento fotodocumentador de géis (Vilber Lourmat) e armazenadas em arquivos digitais no formato JPG por meio de *software* processador de imagens (PhotoCapt, Viber Lourma).

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Desenvolvimento de *B. equi* em Glândulas Salivares de *B. microplus* Infectado Naturalmente

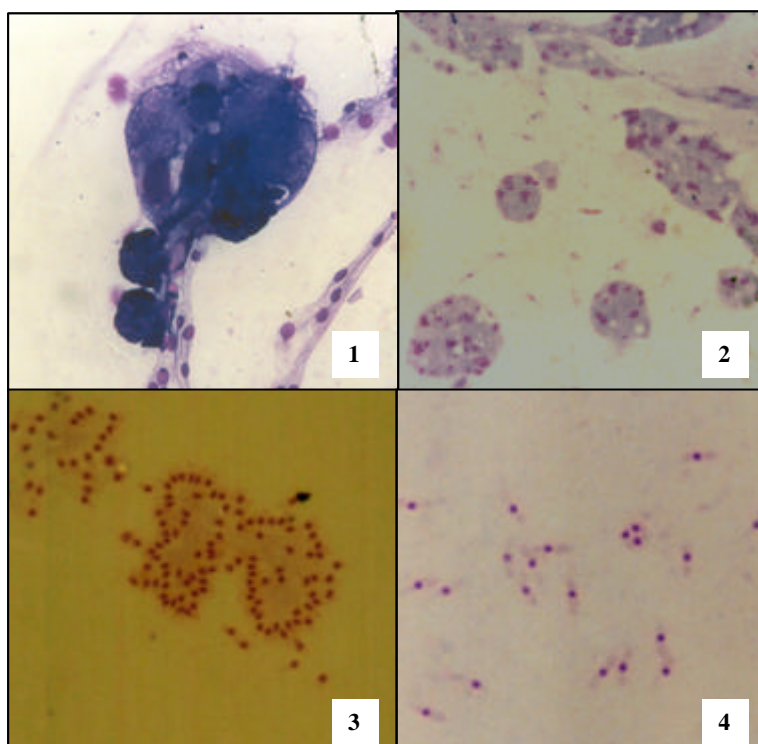
Foram coletados o total de 360 carrapatos sendo dissecados 324 espécimes (Ninfas= 145, fêmeas= 138 e machos= 41). Nos esfregaços foram observados esporozoítas nas glândulas salivares de 67 espécimes sendo 27 ninfas, 6 machos e 34 fêmeas. A análise por microscopia óptica dos ácinos das glândulas salivares de ninfas, fêmeas e machos, revelou a presença de estágios de esporoblastos polimórficos e multinucleados (**Figuras 2 e 3**), esporoblastos com esporozoítos em desenvolvimento, após a divisão múltipla (**Figura 3**) e esporozoítas livres alongados com 3-4  $\mu\text{m}$  de comprimento e 1-2,5  $\mu\text{m}$  de largura e com núcleo visivelmente excêntrico (**Figura 4**).

Os ácinos parasitados apresentam um aumento de tamanho quando comparado com os ácinos de glândulas salivares não infectadas. O diâmetro variou de 350 a 560  $\mu\text{m}$ , considerando que os alvéolos não infectados o diâmetro variou de 80 a 120  $\mu\text{m}$  (**Figura 1**).

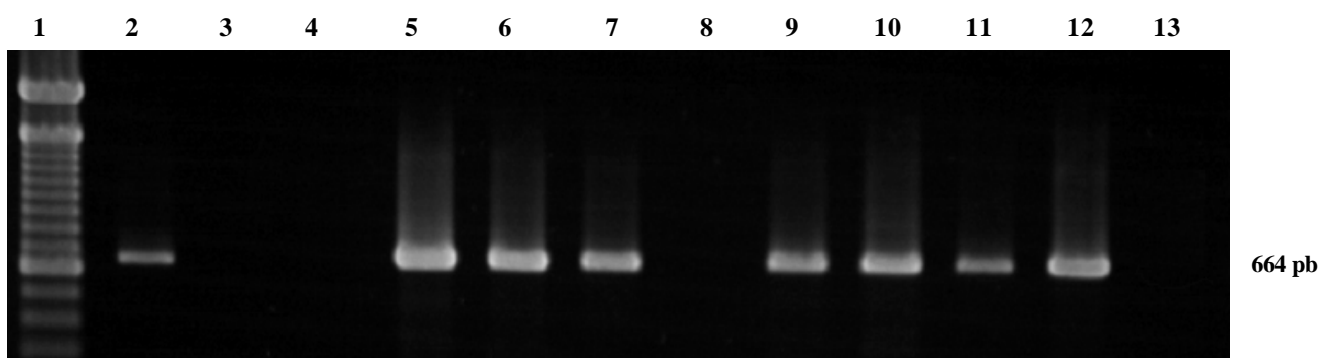
### 3.2 Detecção de *B. equi* em Glândulas Salivares de Ninfas e Adultos por PCR

Um total de 50 glândulas salivares foram testadas sendo, 35 fêmeas divididas em seis pools contendo cinco glândulas salivares em cada pool, 10 ninfas divididas em dois pools com cinco glândulas salivares em cada e cinco machos em um único pool. As análises dos produtos de amplificação por eletroforese mostraram a presença de bandas de aproximadamente 664 pb para *B. equi* em DNA de glândulas salivares de ninfas e fêmeas (**Figura 5**) naturalmente infectados.

A amplificação foi observada em 70% das amostras submetidas a PCR., sendo que, nas amostras de glândulas salivares dos machos não foram detectadas a presença de DNA de *B. equi*.



**Figuras 1 a 4** – Estágios de desenvolvimento de *Babesia equi* em glândulas salivares de ninfas de *Boophilus microplus* corados com Giemsa. **Fig 1)** Célula acinar com visível aumento alveolar **Fig 2)** Esporoblastos polimórficos e multinucleados **Fig 3)** Esporoblastos com esporozoítas em desenvolvimento, após a divisão múltipla do esporoblasto **Fig 4)** Esporozoítas (100x obj x 10x oc).



**Figura. 5.** Produtos de amplificação de DNA de *Babesia equi* pela técnica da PCR, em glândulas salivares de *Boophilus microplus*, naturalmente infectados. **Linha 1,** Marcador de peso molecular 100pb; **Linha 2,** controle positivo; **Linha 3,** controle negativo; **Linhas 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10,** glândulas salivares de fêmeas de *B. microplus*; **Linhas 11 e 12,** glândulas salivares de ninfas de *B. microplus*; **Linha 13,** glândulas salivares de machos de *B. microplus*



## 4 DISCUSSÃO

Neste estudo foram observados nos ácinos das glândulas salivares a presença de esporoblastos e esporozoítas de *B. equi* em ninfas, fêmeas e machos de *B. microplus*. Os ácinos parasitados apresentaram acentuadas hipertrofias. A caracterização morfológica e morfométrica dos esporozoítos encontrados concordam com as características descritas para formas evolutivas de *B. equi* de *Hyalomma* (MOLTMANN et al., 1983; ZAPF, SCHEIN, 1994; MEHLHORN, SCHEIN, 1998) e *B. microplus* (GUIMARÃES, 1998) em condições experimentais.

O desenvolvimento de *B. equi* em glândulas salivares de ninfas, machos e fêmeas de *B. microplus* observados no presente trabalho, foi observado a partir de esporoblastos até a formação de esporozoítos na sua superfície. Esta forma de desenvolvimento se assemelha ao descrito para *B. equi* em outras espécies de carrapatos vetores (MOLTMANN et al., 1983; ZAPF; SCHEIN, 1994; GUIMARÃES et al., 1998) e para o gênero *Babesia* (MELHORN, SCHEIN, 1984), com exceção de *B. canis*, cuja formação ocorre por contínua divisão binária (SCHEIN et al., 1979). Durante o estudo foi observado o desenvolvimento não sincronizado dos esporozoítas, com presença de esporoblastos e esporozoítas simultaneamente, concordando com descrições feitas para *B. equi* por outros autores (MOLTMANN, et al., 1983; ZAPF & SCHEIN, 1994) e para o gênero *Theileria* (FAWCETT, et al., 1985; SHAW & YONG, 1995).

Neste estudo a taxa de infecção dos carrapatos com *B. equi* foi de aproximadamente de 60%, demonstrando a alta susceptibilidade dessa espécie. Esta taxa de infecção é confirmada pelo resultado da PCR baseado no genes espécie específico 18S rRNA, demonstrando uma infecção de 70% das amostras testadas.

Apesar das amostras das glândulas salivares dos machos apresentarem positivas no exame por microscopia óptica, na análise molecula não houve a amplificação específica do DNA de *B. equi*. Esta ausência de amplificação nas amostras de glândulas salivares de machos pode estar relacionado a degradação do DNA durante a extração ou preservação. Outras razões menos prováveis que podem explicar a ocorrência de falsos negativos nas técnicas de PCR incluem mutações ou deleções das sequências a serem amplificadas e presença de substâncias inibidoras da polimerase em amostras de alguns materiais biológicos e sangue (HAYDEN et al., 1991).

Apesar de *B. microplus* ser um carrapato homoxeno, estudos prévios demonstraram a sua transferência ocasional de um hospedeiro para outro (UILENBERG, 1970 e 1973). Mason; Norval (1981) comprovaram que larvas e machos adultos de *B. microplus* são capazes de se transferirem de um hospedeiro para outro sob condições de campo. *B. bigemina* pode ser transmitida, em condições a campo, pela transferência de adultos de *B. microplus* de bovinos infectados para susceptíveis (DALGLIESH et al., 1978). Machos adultos de *B. microplus* mantêm-se no hospedeiro por até 70 dias, esta longevidade associada a grande motilidade, permite provavelmente, a sua transferência de animais portadores para outros animais susceptíveis, demonstrando o grande significado na epidemiologia da *B. equi*.

Como demonstrado neste estudo, o desenvolvimento de esporozoítos de *B. equi* não é sincronizado. Este tipo de desenvolvimento não sincronizado pode contribuir para que diferentes estágios dos carrapatos possam infectar mais de um animal, após sua transferência para outro hospedeiro susceptível.

A importância de *B. microplus* na epidemiologia de *B. equi* no Brasil foi proposta por Heuchert et al. (1999), que ao realizarem um estudo soropidemiológico para *B. equi* e *B. caballi* em diferentes propriedades no Estado de São Paulo, observaram uma prevalência para

*B. equi* de 49,2% para eqüinos machos e de 36,0% para potros até seis meses de idade. O estudo evidenciou que em propriedades cujos eqüinos não apresentavam contato direto ou indireto com bovinos, somente 17,5% dos animais estavam infectados com *B. equi* e 89,5% com *B. caballi*, e que apenas a espécie *A. nitens* foi observada nestes eqüinos. Nas propriedades que havia o contato direto ou indireto com bovinos, 89,5% dos eqüinos estavam infectados por *B. equi* sendo observado também a infestação por *B. microplus* sobre os eqüinos por eles estudados.

No presente estudo, foi comprovado através da técnica molecular a infecção de *B. microplus* por *B. equi*, reforçando as observações experimentais de Guimarães et al. (1998) de que *B. microplus* pode ser um provável vetor natural de *B. equi* no Brasil. A presente pesquisa indica com segurança a participação deste carrapato na transmissão e distribuição de *B. equi*, principalmente em locais onde o *B. microplus* é a espécie de carrapato predominantemente encontrada parasitando eqüinos de acordo com as observações de Freire (1972) e Cunha et al. (1996).

## 5 CONCLUSÕES

1- A identificação de formas evolutivas de *Babesia equi* no intestino, hemolinfa e glândulas salivares de ninfas e adultos de *Boophilus microplus* permite concluir que esta espécie de carrapato atua como hospedeiro de *B. equi*.

2- O *B. microplus* é altamente susceptível à infecção por *B. equi*, tanto na infecção natural como experimental;

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAGÃO, H.; FONSECA, F. Notas de Ixodologia. *Memorial do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 59, p.131-148, 1961.
- BARREIRA, J.D. **Caracterização morfológica, aspectos biológicos e patogenia das formas evolutivas de *Babesia bovis* (Babés, 1888) e *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) (Protozoa: Babesiidae) em *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887)**. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, RJ, 1988, 103 p.
- BARREIRA, J.D. **Efeitos da infecção de *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) e *Babesia bovis* (Babés, 1888) sobre os parâmetros biológicos do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887)**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2001, 138 p.
- BASHIRUDDIN, J.B.; CAMMA, C.; REBELO, E. Molecular detection of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horse blood by PCR amplification of part the 16S rRNA gene. *Veterinary Parasitology*, v. 84, n. 1-2, p. 75-83, 1999.
- BATTSETSEG, B. et al. Detection of *Babesia caballi* e *Babesia equi* in *Dermacentor nuttalli* adults ticks. *Internacional Journal of Parasitology*, v.31, n.4, p.384-386, 2001.
- BATTSETSEG, B. et al. Detection of equine *Babesia spp.* gene fragments in *Dermacentor nuttalli* Olenov 1929 infesting Mongolian horses, and their amplification in egg and larval progenies. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 64, n. 8, p. 727-730, 2002a.
- BATTSETSEG, B. et al. 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. 351-157, 2002b.
- BINNINGTON, K.C. Sequential changes in salivary gland structure during attachment and feeding of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *International Journal of Parasitology*, v. 8, p. 97-115, 1978.
- BLOUIN, E.F., DE WALL, D.T. The fine structure of development stages of *Babesia caballi* in the salivary glands of *Hyalomma tuncatum*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v. 56, p. 189- 195, 1995.
- BLOUIN, E.F., VAN RENSBURG, L. An ultrastructural study of the development of baesia ocutans in the salivary glands of adult hyalomma margiantum rufipes. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v. 55, p. 93-100, 1988.
- BORGES, L.M.F., SILVA, C.R.F. Ixodídeos parasitos de bovinos e equinos na microrregião de Goiana, Goiás. *Revista de Patologia Tropical*, v. 23, p. 69-74, 1994.
- BOSE, R.; JORGENSEN, W.K.; DALGLIESH, R.J.; FRIEDHOFF, K.T.; de VOS, A.J. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Veterinary Parasitology*, v. 57, p. 61-74, 1995.
- BOTTEON, P.T.L.; MASSARD, C.L.; BOTTEON, R.C.C.M.; LOSS, Z.G.; LINHARES, G.F.C. Seroprevalence de *Babesia equi* en tres diferentes sistemas de crianza de equinos. *Parasitologia Latinoamericana*, v. 57, n. 3-4, p. 141-145, 2002.
- BURGDORFER, W. Hemolymph test: A technique for detection of rickettsiae in tick. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 19, p. 1010-1014, 1970.
- CARINI, A. Sobre uma piroplasmose equina observada em São Paulo. *Arquivo da Sociedade de Medicina Cirúrgica de São Paulo*, v.1, p.63-66, 1910. CONRAD, P.A.; ELLY, B.G.; BROWN, C.G. Intraerythrocytic schizogony of *Theileria annulata*. *Parasitology*, v. 91, p. 67-82, 1985.
- CONRAD, P.A., KELLY, B.G., BORWN, C.G. Intraerythrocytic schizogony of *Theileria annulata*. *Parasitology*, v. 91, p. 67-82, 1985.

- CORDERO del CAMPILLO, M., ORDÁZ ALVAREZ, J., ROJO VÁZQUEZ, F.A., ESCUDERO DIAZ, A. Equine babesia infection in Spain. *Trabajos de la Estación Agrícola Experimental de León*, v. 11, p. 11-22, 1974.
- COSTA, R.P., MELLO, R.P. Nota prévia sobre a ocorrência de *Babesia caballi* (Nuttall, 1910) em *Equus caballus* no Brasil. *Veterinária*, v. 16, p. 74-75, 1963.
- CRIADO-FORNELIO, A. et al. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history. *Veterinary Parasitology*, v. 114, n. 3, p. 173-194, 2003.
- CUNHA, C.W.; DA SILVA, S. S.; PIMENTEL, C. A.; DAPPER, E. Avaliação da frequência de equinos soropositivos a *Babesia equi* no Jóquei Clube de Pelotas e em dois Haras da Zona Sul do Rio Grande do Sul, RS. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 5, n. 2, p. 119-122, 1996.
- DALGLIESH, R.J; STEWART, N.P; CALLOW, L.L. Transmission of *Babesia bigemina* by transfer of adult male *Boophilus microplus*. *Australian of Veterinary Journal*, v. 54, p. 205-206, 1978.
- DAVEY, R.B., OSBURN, R.L., MILLER, J.A. Ovipositional and morphological comparisons of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) collected from different geographic areas. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 77, p. 1-3, 1984.
- DENNING, F. **Unsuccessful attempts to transmit *Babesia equi* by *Anocentor nitens* and *Amblyomma cajennense***. 1988. 112 p. Tese (Doutorado), Escola de Medicina Veterinária, Hanover, 1988.
- DE VÓS, A.J., STEWART, N.P., DALGLIESH, R.J. The effects of chemotherapy on *Babesia bigemina* in the tick vector *Boophilus microplus*. *International Journal for Parasitology*, v. 14, p. 249-252, 1984.
- DE WALL, D.T. Equine piroplasmiasis: a review. *British Veterinary Journal*, v. 148, p. 6-14, 1992.
- DE WALL, D.T., HEERDEN, J. van, BERG, S.S. van den, STEGMANN, G.F., POTGIETER, F.T. Isolation of pure *Babesia equi* and *Babesia caballi* organisms in splenectomized horses from endemic areas in South Africa. *Onderstepoort Journal Veterinary Research*, v. 55, p. 33-35, 1988.
- ECHAIDE, S.T.; DALGLIESH, D.P., McGUIRRE, T.C.; PALMER, G.H.; SUAREZ, C.E.; McELWAIN, T.F. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, p. 777-782, 1998.
- ERBSLOH, .K.E. Babesioseis in the newborn foal. *Journal of Reproducion an Fertilidad Supplment*, v. 23, p. 725-726, 1975.
- FALCE, H.C., FLEHTMANN, C.H.W., FERNANDEZ, B.C. Ixodidae (Acari) on horses, mules and asses in the satate of Parana, Brazil. *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo*, v. 20, p. 103-106, 1983.
- FAWCETT, D. W.; YONG, A. S.; LEITCH, B. L. Sporogony in *Theileria* (Apicomplexa: Piroplasmida). A comparative ultrastructural study. *Journal of Submicroscopic Cytology*, v. 17, p. 299-314, 1985.
- FIGUEROA, J.V.; BUENING, G.M. Nucleic acid probess as a diagnostic method for tick-borne hemoparasites of veterinary importance. *Veterinary of Parasitology*, v. 75, p. 75-92, 1995.
- FIGUEROA, J.V.; CHIEVES, L.P.; JOHNSON, G.S.; BUENING, G.M. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Veterinary Parasitology*, v. 50, p. 69-81, 1993.

- FIGUEROA, J.V.; CHIEVES, L.P.; JOHNSON, G.S.; BUENING, G.M. Detection of *Babesia bigemina*-infected carriers by polymerase chain reaction amplification. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 30, n. 10, p. 2576-2582, 1992.
- FREIRE, J.J. Revisão das espécies da família Ixodidae. *Revista de Medicina Veterinária*, São Paulo, v. 8, p. 1-6, 1972.
- FRERICHS, W.M.; HOLBROOK, A.A. Feeding mechanisms of *Babesia equi*. *Journal Protozoology*, v. 21, n. 5, p. 707-709, 1974.
- FRIEDHOFF, K.T., TENTER, A.M., MULLER, I. Haemoparasites of equines: impact on international trade of horses. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties*, v. 9, p. 1187-1194, 1990.
- FRIEDHOFF, K.T. Transmission of *Babesia*. In: RISTIC, M. (Ed). Babesiosis of domestic animals and man. Boca Raton: CRS Press, 1988. p. 197-208.
- GUIMARÃES, A.M., LIMA, J.D., RIBEIRO, M.F.B.; CAMARGOS, E.R.S.; BOZZI, I.A. Ultrastructure of sporogony in *Babesia equi* in salivary glands of adult female *Boophilus microplus* ticks. *Parasitology Research*, v. 84, p. 69-74, 1998.a
- GUIMARÃES, A.M., LIMA, J.D., RIBEIRO, M.F.B. Sporogony and experimental transmission of *Babesia equi* by *Boophilus microplus*. *Parasitology Research*, v. 84, p. 323-327, 1998b.
- GUIMARÃES, L.M., ARAÚJO, T.L., LACERDA JR., P.M.G. de. Ocorrência de nutaliose em equinos puro sangue de corrida, em São Paulo. *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária de São Paulo*, v. 4, p. 357-362, 1950.
- HAYDEN, J.D.; HO, S.A.; HAWKEY, P.M.; TAYLOR, G.R.; QUIRKE, P. The promises and pitfalls of PCR. *Veterinary of Medical Microbiology*, v. 2, p. 129-137, 1991.
- HEUCHERT, C.M.; DE GIULLI JR, V.; DE ATHAIDE, D.F.; BÖSE, 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.
- HIGUCHI, S. The development of *Theileria sergenti* in the salivary gland of the tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Japanese Journal of Veterinary Science*, v. 48, p. 801-807, 1986.
- HOLBROOK, A.A. Biology of equine piroplasmiasis. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 155, p. 453-454, 1969.
- HOLBROOK, A.A.; JOHNSON, A.J.; MADDEN, P.A. Equine piroplasmiasis: Intraerythrocytic development of *Babesia caballi* (NUTALL) and *Babesia equi* (LAVERAN). *American Journal of Veterinary Research*, v. 2, p. 297-303, 1968.
- KAPPMAYER L.S.; PERRYMAN L.E.; KNOWLES, D.P. A *Babesia equi* encodes a surface protein with homology to *Theileria* and *Babesia equi*. *Molecular Biochemical of Parasitology*, v. 62, p. 121-124, 1993.
- KARAKASHIAN, S.J.; RUDZINSKA, M.A.; SPILEMAN, A. Ultrastructural studies on sporogony of *Babesia microti* in salivary gland cells of the tick *Ixodes dammini*. *Cell and Tissue Research*, v. 231, p. 275-287, 1983.
- KATZER, F. et al. Phylogenetic analysis of *Theileria* and *Babesia equi* in relation to the establishment of parasite populations within novel host species and the development to diagnostic tests. *Molecular Biochemical Parasitology*, v. 95, n. 1, p. 33-44, 1998.
- KAWAZU, S.I.; KAMIO, T.; SEKIZAKI, T.; FUJISAKI, K. *Theileria sergenti* and *T. buffeli*: Polymerase chain reaction-based marker system for differentiating the parasite species from infected cattle blood and infected tick salivary gland. *Experimental Parasitology*, v. 81, p. 430-435, 1995.
- KNOWLES, R.C., MATHIS, R.M., BRYANT, J.E., WILLERS, K.H. Equine piroplasmiasis. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 148, p. 407-410, 1966.

- KNOWLWES, D.P., LOWELL, D.P., KAPMEYER, S., STILLER, D., HENNAGER, S.G., PERRYMAN, L.E. Antibody to a recombinant merozoite protein epitope identifies horses infected with *Babesia equi*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 30, p. 3122-3126, 1992.
- KOCH, R. Beitrag zur entwicklungsrichtung der piroplasmaen. *Z. hyg. Infert. Kr.*, v. 54, p. 1-9, 1906.
- KUMAR S., GUPTA, A.K., PAL, Y., DWIVEDI, S.K. In-vivo therapeutic efficacy trial with artemisinin derivative, buparvaquone and imidocarb dipropionate against *Babesia equi* infection in donkeys. *Journal of Veterinary Medical Science*. v. 65, n. 11, p. 1171-7, 2003.
- KUTTLER, K.L. World-wide impact of babesiosis, p.1-22. In: RISTIC, M. *Babesiosis of Domestic Animals and Man*. Boca Raton: CRC Press, 1988.
- LAVERAN, A. Contribution a l'étude du *Piroplasma equi*. *C. R. Seances Soc. Biol.*, v. 12, p. 385-389, 1901.
- LEVINE, N.D. Blood parasites: the piroplasms. In: the protozoan phylum Apicomplexa. Florida: CRC Press, Boca Raton, 1988, p. 35-45.
- LIMA, J.D., BIONDINI, J., REIS, R. *Babesia caballi* infection in a pure-bred horse in Minas Gerais, Brazil. *Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais*, v. 28, p. 87-92, 1976.
- LINHARES, G.F.L. **Aspectos biológicos e epidemiológicos das babesioses de equídeos, com ênfase a microrregião de Goiânia, Goiás, Brasil.** 1994. 120 p. Tese (Doutorado em Parasitologia Veterinária), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 1994.
- MAHONEY, D.F., MIRRE, G.B. The selection of larvae of *Boophilus microplus* infected with *Babesia bovis* (syn. *B. argentina*). *Research in Veterinary Science*, v. 23, p. 37-126-127, 1977.
- MASON, C.A.; NORVAL, R.A.I The transfer of *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae) from infested to uninfested cattle under field conditions. *Veterinary Parasitology*, v. 8, p. 185-188, 1981.
- MEHLHORN, H., SCHEIN, E. Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* MEHLHORN, SCHEIN, 1998. *Parasitology Research*, v. 84, p. 467-475, 1998.
- MEHLHORN, H., SCHEIN, E. The piroplasm: Cycle and sexual stages. *Advance in Parasitology*, v. 23, p. 37-103, 1984.
- MOLTMANN, U.G., MEHLHORN, H., SCHEIN, E., VOIGT, W.P., FRIEDHOFF, K.T. Fine structure of *Babesia equi* Laveran, 1901 within lymphocytes and erythrocytes of horses: an in vivo and in vitro study. *Journal of Parasitology*, v. 69, n. 1, p. 11-120, 1983.
- MOLTMANN, U.G., MEHLHORN, H., FRIEDHOFF, K.T. Electron microscopic study on the development of *Babesia ovis* (Piroplasmia) in the salivary glands of the vector tick. *Acta Tropical*, v. 39, p. 29-40, 1982.
- MORENO, E.C. **Incidência de ixodídeos em bovinos de leite e prevalência em animais domésticos da região metalúrgica de Minas Gerais, Belo Horizonte, M.G.** 1984. 105p. Dissertação (Mestrado) Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, M.G., 1984.
- MUJICA LINAREZ, F.F. ***Babesia caballi* (NUTTAL; STRICKLAND, 1912): patogenia, transmissão e alterações no carrapato *Anocentor nitens* (Neumann, 1897), vetor biológico nas Américas.** 2002. 80 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, R.J., 2002.
- NUTTAL, G.H.F., STRICKLAND, C. On the occurrence of two species of parasite in equine piroplasmias or biliary fever. *Parasitology*, v. 12, p. 65-69, 1910.

- OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G.; OLIVEIRA, M.C.S.; ARAUJO Jr., J.P.; AMARANTE, A.F.T. PCR-based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. *International Journal of Parasitology*, v. 35, p. 105-111, 2005.
- PEREIRA, M.A.V.C., MASSARD, C.L., FACCINI, J.L.H., SIQUEIRA, de, L.F.G. Ocorrência de *Babesia equi* (LAVERAN, 1901) e *Babesia caballi* (NUTTALL & STRICKLAND, 1912) em eqüinos da raça Puro Sangue Inglês de pequenos estabelecimentos eqüestres. *Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo*, v. 71, n. 4, p. 405-409, 2004.
- PERSING, D.H.; MATHIESEN, D.; MARSHALL, W.F.; TELFORD, S.R.; SPIELMAN, A.; THOMFORD, J.W.; CONRAD, P.A. Detection of *Babesia microti* by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 30, p. 2097-2103, 1992.
- PIERCE, M.A. Nuttalia FRANCA 1909 (Babesiidae) preoccupied by *Nuttalia* Dall, 1898 (Psammobiidae): A reappraisal of the taxonomic position of the avian piroplasms. *International Journal of Parasitology*, v. 34, p. 75-78, 1989.
- PFEIFER BARBOSA, I.B.F. **Epidemiologische untersuchungen über infectionen von pferden mit *Babesia equi* und *Babesia caballi* in Brasilien**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Instituto de Parasitologia, Escola de Medicina Veterinária de Hannover, Hannover, 1993, 109 p.
- PFEIFER BARBOSA, I.; 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.
- PFEIFER BARBOSA, I.; BOSE, R.; PEYMANN, B.; FRIEDHOFF, K.T. Diagnosis of natural infection with *Babesia cabali* Nuttal; Strickland, 1910 in horses and *Anocentor nitens* Neumann, 1897 in Itaguaí, RJ, Brazil. *Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*. v. 15, p. 105-107, 1992.
- PIESMAN, J. KARAKASIAN, S.J.; LEWENGRUB, S. RUDZINSKA, M.A. Development of *Babesia microti* sporozoites in adult *Ixodes dammini*. *International Journal of Parasitology*, v. 6, p. 381-385.
- POSNETT, E.S et al. Detection of *Babesia equi* in infected horses and carrier animals using a DNA probe. *Veterinary Parasitology*, v. 39, n. 2-2, p. 19-32, 1991.
- POTGIETER, F.T.; ELS, H.J. Light and electron microscopic observations on the development of *Babesia bovis* in larvae, nymphae and non-replete females of *Boophilus microplus*. *Onderstepoort Journal Veterinary Research*, v. 44, p. 213-232, 1977.
- POTGIETER, F.T.; ELS, H.J. An electron microscopic study of intra-erythrocytic stages of *Babesia bovis* in the brain capillaries of infected splenectomized calves. *Onderstepoort Journal Veterinary Research*, v. 46, p. 41-49, 1979.
- PURNELL, R.E.; YOUNG, A.S.; PAYNE, R.C.; MWANGI, J.M. Development of *Theileria mutans* (Aitong) in the tick *Amblyomma variegatum* compared to that of *T. parva* (Muguga) in *Rhipicephalus appendiculatus*. *Journal of Parasitology*, v. 61, p. 725-729, 1975.
- REITER, I.; WEILAND, G. Recently developed methods for the detection of babesial infections. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 83, p. 21-23, 1989.
- RIBEIRO, M.F.B.; LIMA, J.D. Diagnóstico sorológico da babesiose equina por *Babesia equi* em Minas Gerais. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA. 6. 1989. Bagé, Anais... CBPV, 1989, p. 111.
- ROBY, T.O., ANTHONY, D.W. Transmission of equine piroplasmiasis by *Dermacentor nitens* Neumann. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 142, p. 768-769, 1963.



- ROBY, T.O., ANTHONY, D.W., THORNTON, C.W., HOLBROOK, A.A. The heredity transmission of *Babesia caballi* in the tropic horse ticks, *Dermacentor nitens*, Neumann. *American Journal of Veterinary Research*, v. 25, p. 494-499, 1964.
- ROCHA, J.M., COSTA, N. de A., VIEIRA FILHO, H., ALENCAR, S.P. Diagnóstico da babesiose por *Babesia aballi* no Município de Garanhuns - PE. In: XXI CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1988, Salvador, *Anais...CBPV*, 1988, p. 202.
- RUDOLPH, W., CORREA, J., ZURITA, L., MANLEY, W. Equine piroplasmiasis: leukocytic response to *Babesia equi* (Laveran, 1901) infection in Chile. *British Veterinary Journal*, v. 131, p. 601-609, 1975.
- SAMISH, M. Infective *Theileria annulata* in the tick without a blood meal stimulus. *Nature*, v. 270, p. 51-52, 1977.
- SCHEIN, E. Equine babesioses. In: RISTIC, M. (Ed). Babesiosis of domestic animals and man. Boca Raton: CRS Press, 1988. p.197-208.
- SCHEIN, E., RHBEIN, G., VOIGT, E.P., ZWEYGARTH, E. *Babesia equi* (Laveran, 1901). I. Developmente in horses and in lymphocyte culture. *Tropenmedizian und Parasitologie*, v. 32, p. 223-227, 1981.
- SCHEIN, E., MEHLHORN, H., VOIGHT, W.P. Electron microscopical studies on the development of *Babesia canis* (Sporozoa) in the salivary gland of the vector tick *Dermacentor reticulatus*. *Acta Tropical*, v. 36, p. 229-241, 1979.
- SCHEIN, E. On the life cycle of *Theileria annulata* in the midgut and hemolymph of *Hyalomma anatolicum excavatum*. *Zeitschrift fur Parasitenkunde*, v. 47, p.165-167, 1975.
- SHAW, M. K. & YOUNG, A. S. Differential development and emission of *Theileria parva* sporozoites from the salivary gland of *Rhipicephalus appendiculatus*. *Parasitology*, v. 111, p. 153-160, 1995.
- SIMPSON, C.F.; NEAL, F.C. Ultrastructure of *Babesia equi* in ponies treated with imidocarb. *American Journal Veterinay Research*, v. 42, p. 267-271, 1980.
- SIMPSON, C.F., KIRKHAN, W.W., KLING, J.M. Comparative morphologic features of *Babesia caballi* and *Babesia equi*. *American Journal Veterinay Research*, v. 28, p. 1693-1697, 1967.
- SINGH, D.K.; JADISH, S.; GAUTAM, O.P.; DHAR, S. Infectivity o ground up tick supernates prepared from *Theileria annulata* infected *Hyalomma anatolicum anatolicum*. *Tropical Animal Health Production*, v. 11, p. 87-90, 1979.
- SOUZA, A.P.; SARTOR, A.A.; BELLATO, V.; SILVA, A.B. Prevalência de anticorpos anti *Babesia equi* em equinos do Planalto Catarinense. *Ciência Rural*, v. 30, p. 119-121, 2000.
- STICH, R.W.; RIKIHISA, Y.; EWING, S.A.; NEEDHAN, G.R.; GROVER, D.L.; JITTAPALAPONG, S. Detection of *Ehrlichia canis* in canine carrier blood and in individual experimentally infected ticks with a pp30-based PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, p. 540-546, 2002.
- STILLER, D.,GOFF, W.L; JOHNSON, L.W.; KNOWLES, D.P. *Dermacentor variabilis* and *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae): Experimental vectors of *Babesia equi* to equids. *Journal of Medical of Entomology*, v. 39, n. 4, p. 667-670, 2002.
- STILLER, D.; COAN, M.E. Recent developments in elucidating tick vector relationships for anaplasmosis and equine piroplasmiasis. *Veterinary Parasitology*, v. 57, p. 9-108, 1995.
- STILLER, D. et al. Transmission of equine babesiosis and bovine anaplasmosis by *Dermacentor albipictus*, (Packard) (Acari: Ixodidae). *J. New York, Entomololgy Soc.*, v. 88, p. 75-76, 1980.
- TANAKA, T. et al. Expression of *Babesia equi* merozoite antigen-2 by recombinant baculovirus and its use in the ELISA. *International Journal of Parasitology*, v. 29, n. 11, p. 1803-1808, 1999.

- TAYLOR, W.M., BRYANT, J.E., ANDERSON, J.B., WILLER, K.H. Equine piroplasmiasis in the United States – a review. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 155, p. 915-919, 1969.
- THEILER, A. Die pferde malaria. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.*, Zurich, v. 43, p. 252-256, 1901.
- 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.
- THOMPSON, P.H. Ticks as vectors of equine piroplasmiasis. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.155, p.454-457, 1969.
- TREVOR, P.F.; BARBET, A.F.; ALLEMAN, A.R.; SIMBI, B.H.; BURRIDGE, M.J.; MAHAN, S.M.; Detection of the agent of heartwater, *Cowdria ruminantium*, in *Amblyomma* ticks by PCR: validation and application of the assay to field ticks. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, p. 1539-1544, 2000.
- UETI, M. W.; PALMER, G. H.; KAPPEMEYER, L. S.; STATDFIELD, M.; SCOES, G.; KNOWLES, D.P. Ability of the 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.
- UILENBERG, G. Notes sur les babesioses et l'anaplasmose des bovines à Madagascar. IV Note additionnelle sur la transmission. *Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, v. 23, p. 309-312, 1970.
- UILENBERG, G. Transmission of *Anaplasma marginale* by the cattle tick *Boophilus microplus*. *Australian Veterinary Journal*, v. 49, p. 216, 1973.
- WATT, D.; KIARA, H.; SPARAGANO, O.A.E. A PCR-based field evaluation of Theileria infections in cattle and ticks in Kenya. *Annals New York Academia Science*, v. 849, p. 69-77, 1998.
- WEBER, G.; FRIEDHOFF, K.T. Electron microscopic detection of initial and some subsequent development stages of *Babesia bigemina* in salivary glands of ticks. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, v. 58, p. 191-194.
- WEILAND, G. Species-specific serodiagnosis of equine piroplasma infections by means of complement fixation test (CFT), immunofluorescence (IIF), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Veterinary Parasitology*, v. 20, p. 43-48, 1986.
- YOUNG, A.S.; GROOTENHUIS, J.G.; LEITCH, B.V.; SCHEIN, E. The development of *Theileria (cytauzoon) tauratrogii* (MARTIN and BROCKLESBY, 1980) from eland in its vector *Rhipicephalus appendiculatus* *Parasitology*, v. 81, p. 129-144, 1980.
- YOUNG, A.S., MORZARIA, S.P. Biologic of *Babesia*. *Parasitology Today*, v. 2, p. 211-218, 1986.
- YOUNG, A.S.; GROOTENHUIS, J.G.; LEITCH, B.V.; SCHEIN, E. Induction of infective stages *Theileria parva* (MA exposure of host ticks to high temperature. *Veterinary Record*, v. 105, p. 531-533, 1979.
- YOUNG, A.S.; PURNELL, R.E. Observations on *Babesia equi* in the salivary glands of *Rhipicephalus evertsi*. *Bulletin of Epizootic Diseases in Africa* v. 21, p. 377-383, 1973.
- ZAPF, F.; SCHEIN, E. The development of *Babesia (Theileria) equi* (Laveran, 1901) in the gut and hemolymph to the vector ticks, *Hyalomma* species. *Parasitology Research*, v. 80, p. 297-302, 1994a.
- ZAPF, F.; SCHEIN, E. New findings in the development of *Babesia (Theileria) equi* (Laveran, 1901) in the salivary glands of the vector ticks, *Hyalomma* species. *Parasitology Research*, v. 80, p. 543-548, 1994b.
- ZAUGG, J.L., LANE, V.M. Evaluations of buparvaquone as a treatment for equine babesiosis (*Babesia equi*). *American Journal Veterinary Research*, v. 50, n. 5, p. 782-785, 1989.

ZWEYGARTH, E., AHMED, J.S., REHBEIN, G. The effect of halofuginone, welcome 993c, oxytetracycline and diminazene diacetate on *Babesia equi* infected lymphoblastoid cell cultures. *Journal of Parasitology*, v. 70, p. 542-544, 1984.