Andréa Cristina Parra

**Investigação diagnóstica de doença concomitante
Babesiose e Anaplasmosse em rebanho eqüino, por
técnicas de *Nested* PCR e c – ELISA ou ELISA
indireto**

**São Paulo
2009**

Andréa Cristina Parra

***Investigação diagnóstica de doença concomitante
babesiose e anaplasmoses em rebanho eqüino, por
técnicas de Nested PCR e c – ELISA ou ELISA
indireto***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:
Clínica Médica

Área de concentração:
Clínica Veterinária

Orientador:
Prof. Dr. Wilson Roberto Fernandes

**São Paulo
2009**

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2199
FMVZ

Parra, Andréa Cristina

Investigação diagnóstica de doença concomitante babesiose e anaplasmoses em rebanho eqüino, por técnicas de Nested PCR e c – ELISA ou ELISA indireto / Andréa Cristina Parra. – 2009.
78 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.
Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Wilson Roberto Fernandes.

1. Eqüino. 2. *Theileria equi*. 3. *Anaplasma phagocytophilum*.
4. Nested PCR. 5. ELISA. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Investigação diagnóstica de doença concomitante babesiose e anaplasmoses em rebanho equino, por técnicas de Nested PCR e c - ELISA ou ELISA indireto", protocolado sob o nº1124/2007, utilizando 200 (duzentos) cavalos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Wilson Roberto Fernandes, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/08/07.

We certify that the Research "Diagnostic inquiry of concomitant illness Babesiose and Anaplasmoses, for techniques of Nested PCR and c - ELISA or ELISA indirect", protocol number 1124/2007, utilizing 200 (two hundred) horses, under the responsibility Prof. Dr. Wilson Roberto Fernandes, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 08/22/07.

São Paulo, 22 de agosto de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

HOSPITAL VETERINÁRIO

Ao Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Wilson Roberto Fernandes

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto "*Investigação diagnóstica de doença concomitante babesiose e anaplosmose em rebanho eqüino, por técnica de Nested PCR e c-Elisa ou Elisa indireto*", sob a sua responsabilidade, previamente aprovado pela Comissão de Bioética dessa Faculdade, foi analisado e atende as normas da Comissão de Ética desse Hospital, que acompanhará administrativamente sua execução. Substituição do responsável, inserção de novos colaboradores e mudanças na metodologia proposta deverão ser imediatamente comunicados a essa comissão, assim como as datas de suspensão ou término do projeto.

São Paulo, 17 de junho de 2008.

Prof. Dr. Idércio Luiz Sinhorini
Presidente da Comissão de Ética Hospitalar
HOVET - FMVZ/USP

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: PARRA, Andréa Cristina

Título: Investigação diagnóstica de doença concomitante babesiose e anaplasmoses em rebanho equino, por técnicas de *Nested* PCR e c – ELISA ou ELISA Indireto

Tese apresentada ao Programa Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data da Defesa: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais **DIOGO** e **ADÉLIA**, pelo apoio, incentivo e torcida.

Obrigado por sempre acreditaram em mim.....

Aos meus irmãos **CLÁUDIO** e **RICARDO**, e cunhadas **MARIA JOSÉ** e **ANDRÉA** (a caçula da família), e claro, meu sobrinho **RAFAEL**, pela descontração familiar.

Ao meu amigo e companheiro **FABRÍCIO** por fazer parte da minha vida,
iluminando meu caminho.

OFEREÇO

Aos meus “*filhos de coração*”, **Bobzinho** (meu cachorro favorito!!!!!!), **Loreco**,
as meninas (**Cotonete** e **Gatarina**) e **Jack** (o gatinho mais bonzinho do
planeta!!), por mostrarem o que é amor verdadeiro, incondicionalmente.....

Aos grandes amigos **CAVALOS**, por “darem o sangue” pela pesquisa.

Sem eles, impossível seria realizar o trabalho.

Agradecimentos

Ao meu orientador ***Prof. Dr. Wilson Roberto Fernandes*** pelos ensinamentos, amizade, momentos de descontração, e claro, paciência,..... tenho muito a agradecer pela oportunidade de ser uma discípula.

Aos Professores do VCM: ***Dr. Carlos Eduardo Larsson, Dra. Maria Helena Larsson, Dra. Silvia Ricci, Dra Alice Maria Della Libera, Dra. Maria Claudia Sucupira, Dr. Wanderley Pereira Araújo (in memorian), Dr. Fernando Benesi, Dra. Denise Saretta***, pela excelente convivência.

Aos Professores do Setor de equinos: ***Dr. Wilson Roberto Fernandes, Dra. Raquel Y. Baccarin, Dra. Carla B. Belli, Dr. Luis Cláudio Lopes Correia da Silva, Dr. André Zoppa e Dra Aline Magalhães*** pelos ensinamentos, amizade, momentos de descontração, e por me receberem nesta grande família.

A ***Dra. Mitika Hagiwara*** pelos ensinamentos e apoio para realização do PCR, sempre acreditando que daria certo.

Ao ***Dr. Cássio Xavier de Mendonça Jr.*** pela “luz” na realização da estatística do trabalho de qualificação, e mostrando que a estatística não é um “bicho de sete cabeças”.

Aos meus amigos-irmãos (conhecidos como a “turma do churrasco”): ***Patrícia Betiol (Petrícia), Mariana Chaparro (“Colomb´s”), Maurício Mirian (“Murício”), Rebeca Weigel (“Bebéca”), Maiara Garcia Blagitz (“Naiara”), Joyce Martins Coelho (“Coração”), Tiago Oliveira (o Ti)***, que fazem a diferença, conseguem manter o bom humor, mesmo em momentos de estresse (Muito!!!).... agradeço por entrarem na minha caminhada de vida.

Aos pós graduandos: **Ana Guiomar Matos, Angela Yasbek, Danielle Yuri, Camila (“Motel”), Fernando Nogueira, Milton Ricardo (“Tio Chico”), Magda Garcia Leal, Julio Spagnolo, Paulo Ari, Teresa Souto, Keila Ida, Paulo Frazão (“Cazé”)** pela convivência, amizade e risadas pelos corredores da vet.

Aos “Amigos do HOVET”: **Bruna (“Vruna”), Gustavo (o Gu) e Paolo** por proporcionarem muitas discussões engraçadas de “assuntos do dia-a-dia”.

A **Clarisse Simões Coelho**, que mesmo longe, sempre me incentivou e torceu.

Aos funcionários do HOVET de equinos: **Marquinhos (“Marcola”), Rosendo, Henrique, Cícero, Dona Maria, Ana Paula, Carla, Gervázio, José Antonio, Omar...** enfim todos, pela colaboração e descontração num ambiente hospitalar.

A **Dra. Alma Yasodhara** e sua equipe (**Renata, Marcelo, Soraya, Isabella, Inês**) por todo aprendizado, pela paciência para me convencer que a babesia estava na lâmina mesmo, pela amizade e inúmeras situações hilárias.

A **Dra. Rosangela Machado Zacarias** e sua equipe (**Marcos, Carla, Tamys, Marcia, Socorro, Arvelino**) por me mostrarem como lidar com o DNA, me ensinando o “B – A – BA” do PCR, me socorrendo quando algo dava errado, e torcendo para dar certo..... e deu!!!. Obrigada por me receberem de “braços abertos”.

Ao **Dr. Paulo Brandão, Alessandra Castro, Sheila e Gisele (VPS)** por terem me ajudado num momento de desespero, com tanta dedicação e torcida. Amizade criada instantaneamente.... Obrigada!!

As Meninas do Laboratório: **Claudia** (sempre me salvando das “garras do leitor de ELISA”), **Marli, Clara, Maria Helena, Maria Claudia, Carmem e Samantha** por socorrerem minhas amostras e pela excelente convivência.

As secretárias do VCM: **Cida, Silvana e Ellen** pela amizade, torcida e grande descontração.

A **Adelaide Borges** pela amizade, pelas conversas (muitas....), risadas, torcida. Valeu Adelaide!!!

Ao **Dr. Juarez Távora**, pela amizade, pelo grande incentivo e torcida, sempre presente durante todo processo, acreditando em mim. Esse é o Tio Juarez!!!!!!

Ao **Ronaldo Azevedo Ferreira**, pela torcida.

A **Camila Manoel** e **Bruno Teixeira** (PGs do VCM) pela convivência e troca de idéias sobre PCR.

A **Marise Piotto** pela ajuda na realização dos c-ELISA, pela troca de idéias sobre ELISA, pela amizade e torcida.

A grande amiga **Ana Paula Galis**, por todo apoio, amizade (Grande!!!), torcida e as inúmeras “nuvens rosas” que sempre enviou.

As irmãs-amigas da graduação: **Luciana Cyrillo, Adriana Boihagian e Andrea L. Baptista**, que mesmo de longe, torceram por mim.

A **Mariza Brandimarti, Ana Julia** e **Fabiano**, por sempre acreditarem em mim.

Ao **Instituto Butantan**, por autorizar a colheita de material na Fazenda São Joaquim – São Roque – SP.

A **Patricia (Sakê), Daniel Gorestein** (amigo de Colomb's), **Sandra** (ex-residente), **Teresa** e **Edson**, por colaborarem para a obtenção das amostras para realização deste trabalho.

Aos proprietários dos cavalos atendidos no HOVET por autorizarem a colheita de material visando a pesquisa.

As funcionárias da Biblioteca que sempre me receberam sorridentes, independente do problema que eu trouxesse.

As funcionárias da pós-graduação por sempre estarem prontas para qualquer dúvida que eu tivesse.

A todos, que de uma forma ou outra, colaboraram para realização deste trabalho.

A **FAPESP** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo Auxílio à Pesquisa concedido (Processo n. 07/53987-6).

A **CAPES** (Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior) pela concessão da bolsa de doutorado.

Obrigado a todos!!!!!!

*Quero, um dia, dizer às pessoas que nada foi em vão...
Que o amor existe, que vale a pena se doar às amizades e às pessoas, que a vida
é bela sim e que eu sempre dei o melhor de mim...
e que valeu a pena....*

Mário Quintana

*A vida não é um jogo onde só quem testa seus limites é que leva o prêmio.
Não sejamos vítimas ingênuas desta tal competitividade.
Se a meta está alta demais, reduza-a.
Se você não está de acordo com as regras, demita-se. Invente seu próprio jogo.
Faça o que for necessário para ser feliz.
Mas não se esqueça que a felicidade é um sentimento simples, você pode
encontrá-la e deixá-la ir embora por não perceber sua simplicidade.*

Mário Quintana

RESUMO

PARRA, A. C. Investigação diagnóstica de doença concomitante babesiose e anaplasmosse em rebanho eqüino, por técnicas de *Nested* PCR e c – ELISA ou ELISA indireto. [**Diagnostic investigation of concomitant disease babesiosis and anaplasmosis in equine herd, by *Nested* PCR e - ELISA or indirect ELISA**]. 2009. 78f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Em função da proximidade cada vez maior entre o cavalo e o homem, é de extrema importância ter conhecimentos das doenças que acometem os equinos, que por ventura, podem acometer seres humanos. Dentre muitas doenças, pode-se citar duas, que promovem grandes perdas econômicas aos rebanhos eqüinos, tanto no tratamento desses rebanhos, como com a morte dos mesmos, dificultando a importação e exportação de animais: a babesiose e a erliquiose (anaplasmosse), que podem estar ou não associadas, acometendo um animal, concomitantemente. A presente pesquisa teve como objetivo investigar e diagnosticar doença concomitante babesiose (por *Babesia equi* ou *Theileria equi*) e Erliquiose (por *Erlíquia equi* ou *Anaplasma phagocytophilum*), no estado de São Paulo, em rebanhos eqüinos, utilizando as técnicas de *Nested* PCR (*Nested* polymerase chain reaction – reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico de *T. equi* e *A. phagocytophilum*) e c-ELISA (*competitive enzyme-linked immunosorbent assay* para diagnóstico de *T. equi*) ou ELISA indireto (para diagnóstico de *A. phagocytophilum*) e comparar os resultados obtidos nas diferentes técnicas em 250 amostras de eqüino (sangue total e soro). Como resultado, obteve-se 38,4%, 46% e 36% de positividade, respectivamente, nos testes de pesquisa de hematozoário, c-ELISA e *Nested* PCR para *Theileria equi* e 0%, 3% e 0% de positividade, respectivamente, nos testes de pesquisa de hemoparasita, ELISA indireto e *Nested* PCR para *Anaplasma phagocytophilum*, não sendo observada a co-infecção de Babesiose e Anaplasmosse no rebanho estudo.

Palavras-chaves: Equino *Theileria equi* *Anaplasma phagocytophilum* *Nested* PCR ELISA.

ABSTRACT

PARRA, A. C. **Diagnostic investigation of concomitant disease babesiosis and anaplasmosis in equine herd by nested PCR e - ELISA or indirect ELISA.** [Investigação diagnóstica de doença concomitante babesiose e anaplasmoze em rebanho eqüino, por técnicas de *Nested* PCR e c – ELISA ou ELISA indireto]. 2009. 78f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

Due to the increasing proximity between horse and man, it is of extreme importance to understand the diseases that affect horses which by chance may affect humans. Among many diseases, babesiosis and ehrlichiosis (anaplasmosis) promote high economic losses to horses herds in consequence of costs of treatment and also death, making it difficult to import and export animals: They can or not be linked affecting an animal at the same time. This study aimed to investigate and diagnose concomitant babesiosis (*Babesia equi* and *Theileria equi*) and ehrlichiosis (for ehrlichia equipment or *Anaplasma phagocytophilum*) in equine herds of the state of Sao Paulo, using the techniques of *Nested* PCR (*Nested polymerase chain reaction* for the diagnosis of *T. equi* and *A. phagocytophilum*) and c-ELISA (competitive enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *T. equi*) or ELISA (for diagnosis of *A. phagocytophilum*). Also to compare results obtained in these different techniques in 250 samples of horse (whole blood and serum). Results showed 38.4%, 46% and 36% positivity, respectively, in tests for the detection of *Theileria equi* through hematozoan, c-ELISA and *Nested* PCR and 0%, 3% and 0% positivity, respectively, in tests for the detection of *Anaplasma phagocytophilum* through blood parasites, indirect ELISA and *Nested* PCR. It was not observed co-infection Babesiosis and anaplasmosis in the herd study.

Key-words: Equine *Theileria equi* *Anaplasma phagocytophilum* *Nested* PCR ELISA

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Reagentes utilizados na reação de amplificação para realização da PCR e <i>Nested</i> PCR para <i>Theileria equi</i>	39
Quadro 2 - Primers utilizados na reação de amplificação de PCR (primers externos) e <i>Nested</i> PCR (primers internos) para <i>Theileria equi</i> ..	40
Quadro 3 - Reagentes utilizados na reação de amplificação para realização da PCR e <i>Nested</i> PCR para <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	41
Quadro 4 - Primers utilizados na reação de amplificação de PCR (primers externos) e <i>Nested</i> PCR (primers internos) para <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	41
Quadro 5 - Condições de amplificação, número de ciclos, temperaturas e tempo, para realização de PCR para <i>Theileria equi</i>	42
Quadro 6 - Condições de amplificação (número de ciclos, temperaturas e tempo) para realização de <i>Nested</i> PCR para <i>Theileria equi</i>	43
Quadro 7 - Condições de amplificação (número de ciclos, temperaturas e tempo) para realização de PCR e <i>Nested</i> PCR para <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagem ilustrativa do KIT SNAP 4DX® (IDEXX)	45
Figura 2 - Imagem ilustrativa do conjugado do KIT 4DX® (IDEXX)	45
Figura 3 - Interpretação de resultados do KIT de teste SNAP 4DX®.....	51
Figura 4 - Imagem fotográfica de amostra positiva para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> no SNAP 4DX®, com intensidade de cor semelhante ao controle positivo do teste.....	52
Figura 5 - Imagem fotográfica de amostra positiva para <i>Erlquia canis</i> no SNAP 4DX®, com intensidade de cor inferior ao controle positivo do teste.....	52
Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose 2% com <i>Sybr safe</i> ®. Produtos amplificados com tamanho de 102pb (pares de bases) obtidos com oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>).....	54
Figura 7 Eletroforese em gel de agarose 2% com <i>Sybr safe</i> ®. Produtos amplificados com tamanho de 546pb (pares de bases) obtidos com oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>).....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição de amostras positivas e negativas na pesquisa de <i>Theileria equi</i> e <i>Anaplasma phagocytophilum</i> , em esfregaços sanguíneos (exame direto do sangue), em rebanho eqüino, Estado de São Paulo - 2009.....	47
Tabela 2 - Distribuição de amostras positivas e negativas na pesquisa de anticorpos para <i>Theileria equi</i> , em ensaio imunoenzimático competitivo ¹ (c-ELISA) em amostras de soro equino, Estado de São Paulo - 2009.....	49
Tabela 3 - Distribuição de amostras positivas e negativas na pesquisa de anticorpos para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> , em ensaio imunoenzimático indireto (iELISA) através de SNAP 4DX® (IDEXX®) em amostras de soro equino, no Estado de São Paulo, 2009.....	50
Tabela 4 - Distribuição de amostras positivas e negativas ao teste de <i>Nested</i> PCR para <i>Theileria equi</i> de sangue total eqüino, São Paulo-2009.	53
Tabela 5 - Distribuição de amostras positivas e negativas ao teste de <i>Nested</i> PCR para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> de sangue total eqüino, São Paulo - 2009.....	55

¹ VRMD, Inc. (<http://www.vmr.com/products/testkits/detail.aspx?CATNO=274-2>)

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Representação da distribuição de amostras positivas e negativas na pesquisa de <i>Theileria equi</i> em esfregaços sanguíneos (exame direto do sangue), em rebanho eqüino, Estado de São Paulo - 2009.....	48
Gráfico 2 - Representação da distribuição de amostras positivas e negativas para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> em esfregaços sanguíneos (exame direto do sangue), em amostras de sangue total equino, Estado de São Paulo - 2009.....	48
Gráfico 3 - Representação da distribuição de amostras positivas e negativas em ensaio imunoenzimático competitivo (c-ELISA) <i>Theileria equi</i> em amostras de soro equino, no Estado de São Paulo, 2009.....	50
Gráfico 4 - Representação da distribuição de amostras positivas e negativas em ensaio imunoenzimático indireto (i-ELISA – SNAP 4DX®) para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> em amostras de soro equino, Estado de São Paulo - 2009.....	51
Gráfico 5 - Representação da distribuição de amostras positivas e negativas em <i>Nested</i> PCR para <i>Theileria equi</i> de sangue total equino, no Estado de São Paulo, 2009.....	53
Gráfico 6 - Representação da distribuição de amostras positivas e negativas em <i>Nested</i> PCR para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> de sangue total equino, Estado de São Paulo - 2009.....	55

LISTA DE APÊNDICE

Apêndice A -	Resultados individuais obtidos através das técnicas de Pesquisa de hemoparasitas, ELISA competitivo ou indireto e <i>Nested</i> PCR de amostras de sangue equíno, do Estado de São Paulo, 2009.....	69
--------------	---	----

LISTA DE ANEXOS

Anexo A - Protocolo de PCR e <i>Nested</i> PCR utilizado para diagnóstico de <i>Anaplasma platys</i> descrito por INOKUMA (2002).....	75
Anexo B - Protocolo de PCR e <i>Nested</i> PCR utilizado para diagnóstico de <i>Ehrlichia canis</i> descrito por BULLA (2003).....	77

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	26
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	27
3	OBJETIVOS.....	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1	AMOSTRAS.....	36
4.2	TÉCNICA DE <i>NESTED</i> PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION – REAÇÃO EM CADEIA POLIMERASE).....	37
4.2.1	Extração do DNA a partir de amostras de sangue total.....	37
4.2.2	Reação em Cadeia Polimerase (PCR) – Amplificação do DNA da amostra.....	38
4.2.2.1	Protocolo de reação de amplificação de <i>Theileria equi</i>	39
4.2.2.2	Protocolo de reação de amplificação de <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	40
4.2.3	Ciclos de amplificação.....	42
4.2.3.1	<i>Theileria equi</i>	42
4.2.3.1.1	PCR - reação em cadeia polimerase.....	42
4.2.3.1.2	Nested PCR.....	42
4.2.3.2	PCR e Nested PCR <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	43
4.2.4	Eletroforese.....	43
4.2.5	Leitura do gel no Transiluminador.....	44
4.3	TÉCNICA DE C - ELISA (COMPETITIVE ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY) PARA DIAGNÓSTICO DE BABESIOSE.....	44
4.4	TÉCNICA DE ELISA INDIRETO PARA DIAGNÓSTICO DE ANAPLASMOSE.....	45
5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	46
6	RESULTADOS.....	47
7	DISCUSSÃO.....	57
8	CONCLUSÕES.....	62
	REFERENCIAS.....	63

APENDICE.....	69
ANEXOS.....	75

1 INTRODUÇÃO

O rebanho equino, no mundo, é estimado 55.147.395 equinos, sendo que destes, 5.900.700 no Brasil e 500.177 somente em São Paulo (CNA, 2006)

Devido ao grande número de animais em todo o mundo, é de extrema importância ter conhecimentos das doenças que acometem esses animais, que por ventura, podem acometer seres humanos.

Atualmente, os eqüinos representam grande importância no mercado mundial, participando de provas nacionais e internacionais de grande porte, gerando emprego e renda e exportações e importações financeiras em função de, movimentando grandes quantias.

O trânsito destes animais no âmbito internacional requer um rigoroso controle sanitário, exigindo que uma série de doenças estejam devidamente testadas quanto à sua negatividade, como a Anemia Infecciosa equina, Mormo, Metrite Infecciosa, Arterite Viral equina e a Babesiose equina (PIOTTO, 2006).

Visto que esses animais podem portar o agente da babesiose, pode se sugerir, que os mesmos possam ser portadores do agente causador de anaplasmoses, como descrito em outras espécies animais, inclusive em humanos. (SZPAKOWICZ et al., 2004)

Em estudos realizados no final da década de 90, descobriu-se que a Anaplasmoses (ou erliquiose), causada por *Anaplasma phagocytophilum* (anteriormente conhecida por *Erlíquia equi*) não é só um problema médico veterinário, mas também de saúde pública, por acometer tanto animais como humanos. Os organismos causadores de erliquiose humana são virtualmente indistinguíveis das espécies que acometem animais. (DAGNONE et al., 2001)

Dentre muitas doenças que acometem os equinos, pode-se citar duas, que promovem grandes perdas econômicas aos rebanhos, tanto no tratamento, como com a morte dos mesmos e ainda, dificultando a importação e exportação de animais: a babesiose e a erliquiose (anaplasmoses), que podem estar ou não associadas, acometendo concomitantemente o animal, podendo apresentar sintomatologia semelhante, como, por exemplo, hipertermia, anemia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Doenças como Babesioses e anaplasmoses (erliquioses) são endêmicas em muitas regiões do mundo (TEGLAS et al., 2005), tendo grande prevalência em muitas regiões do território brasileiro. (BARROS et al., 2005).

As duas espécies de babesia que acometem eqüinos mais comumente são *Babesia equi* e *Babesia caballi*. Estas possuem ampla distribuição geográfica, sendo maior em regiões tropicais e subtropicais, onde a doença é endêmica. Na Europa, a doença estende-se pela Espanha, Portugal, França e Itália, e na maioria dos outros países, no entanto, parece não ser endêmica na Inglaterra, Irlanda, Holanda, Alemanha e países escandinavos. A Austrália é o único país onde a babesiose eqüina não se estabeleceu, apesar de ter sido introduzida, provavelmente devido a ausência de vetores (KERBER, 2005). A doença possui grande importância econômica, por promover grandes prejuízos ao rebanho eqüídeo, como redução do rendimento e mortalidade de animais, e dificuldades na comercialização (importação e exportação) dos animais positivos, assim como a proibição de participações destes animais em competições internacionais. Além disto, devem ser salientados, os prejuízos decorrentes de gastos com tratamentos, abortos, mortes devido a infecções agudas, que não são comuns em áreas endêmicas, mas podem ocorrer quando há reagudização dos quadros crônicos em situações de stress, decorrente de doenças intercorrentes, treinamentos e viagens entre outros. (WALL, 1992; BARBOSA et al., 1995; FARIAS, 2001; NAGORE et al., 2004; KERBER, 2005;).

A transmissão de babesia é usualmente influenciada por dinâmicas das populações de vetores (carrapatos), que são diretamente influenciadas por condições climáticas. Assim, grandes países, como Brasil, apresentam condições climáticas com grande variação de temperatura, havendo áreas de temperaturas muito extremas, e também havendo ausência de diversidade, favorecendo a um adequado método de controle de vetores. (HEIM et al., 2007)

Outra forma de transmissão da *Babesia* spp acredita-se ser por via transplacentária, conforme demonstrado por Roncati (2006), avaliou 50 potros (machos

e fêmeas) e suas respectivas mães, logo após o parto, utilizando as técnicas de *Real Time* PCR e c-ELISA (ensaio imunoenzimático competitivo - VRMD®), e concluiu que 46% das éguas apresentaram resultado positivo para *Theileria equi* e 73% dos potros positivos nasceram de mães positivas.

O hospedeiro, infectado, apresentará sintomas de babesiose num período entre 12 e 19 dias após o contato com o agente *T. equi* e 10 a 30 dias após o contato com o agente *B. caballi*. A doença é caracterizada de três formas quais sejam aguda, subaguda e crônica, sendo que os hospedeiros infectados com *B. caballi* podem permanecer como portadores por 1 a 3 anos e os hospedeiros infestados por *T. equi* provavelmente pela vida toda. Nos quadros agudos e subagudos da doença observa-se febre intermitente, perda de peso, anorexia, pode haver edema nas extremidades e anemia leve, ou anemia hemolítica progressiva. Os quadros crônicos são mais comuns e geralmente estão associados à queda de performance, inapetência esporádica, pêlo sem brilho, e também considerados como achados laboratoriais ou casos agudizados após momentos de stress (FARIAS, 2001; KERBER, 2005). A maioria das lesões causadas pela *T. equi* é devido a estase de hemácias situadas em capilares de vários órgãos, determinando a disfunção dos órgãos afetados enquanto a infecção aguda pode promover hemólise intensa e morte do animal por hipóxia anêmica. (FARIAS, 2001)

Segundo trabalho realizado por Karatepe et al. (2009), na Turquia, eqüinos com idade variando entre 11 a 20 anos apresentam mais comumente anticorpos para *T. equi* que eqüinos com idade variando entre 1 e 10 anos, quando desafiados a testes sorológicos.

O diagnóstico de babesiose eqüina aguda ou subaguda pode ser feito direta ou indiretamente, por meio de várias técnicas. As técnicas utilizadas para identificação do agente são: exame direto ao microscópio, cultura “in vivo”, isoteste, Testes sorológicos e PCR (Reação em cadeia polimerase). O exame direto ao microscópico (método tradicional para detectar e identificar o agente, utilizando um esfregaço fino de sangue corado em lâmina, e examinando em microscópico óptico) pode ser muito útil para os casos agudos quando há alta parasitemia, quando se pode encontrar facilmente os parasitas dentro das hemácias (BÖSE et al., 1995; FARIAS, 2001; NAGORE et al.,

2004; KERBER, 2009;), utilizando um esfregaço espesso de sangue nos casos agudos nos quais se observa seqüestro de eritrócitos parasitados nos capilares de vários órgãos e sendo utilizados em casos onde há baixa parasitemia (BÖSE et al, 1995). Nos casos subagudos ou crônicos é mais difícil encontrar o parasita e o mesmo pode ser confundido com um artefato, de tal forma que a sensibilidade é baixa e resultados falso-positivo ou falso negativos são comuns. (KERBER, 2005). A Cultura *in vitro* de espécies de babesia tem sido aperfeiçoada nas últimas décadas, porém o tempo ainda é um fator limitante para diagnóstico já que a amostra cultivada é pequena e o teste pode levar até 4 semanas até a obtenção do resultado. Esta técnica é utilizada em casos especiais, como por exemplo, exportação de cavalos. A técnica de cultura pode ser usada como complemento de testes sorológicos para diagnóstico de babesiose. O Isoteste (*Isotest*) – consiste em sub-inoculações de 500 a 1000ml de sangue de um animal suspeito em animal suscetível esplenectomizado.

Outra possibilidade de diagnóstico são os testes sorológicos, onde não há necessidade da identificação do agente, dentre estes testes sorológicos realizados para diagnóstico da babesiose tem-se: 1) Fixação de complemento que é o teste mais aceito internacionalmente, embora a técnica seja trabalhosa, de fácil padronização, e apresenta boa sensibilidade; 2) Imunofluorescência indireta pode ser útil para diagnosticar infecções antigas, mas há o risco da existência de reações cruzadas. Esta técnica apresenta sensibilidade superior a da fixação de complemento, tendo como desvantagem a dificuldade de padronização e subjetividade na leitura, sendo em função disto, recomendado como teste complementar; (NAGORE et al., 2004; KERBER, 2005;). O Teste de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) utilizado no diagnóstico de *T.equi* e *B.caballi* (NICOLAIEWSKY et al., 2001). Recentes estudos tem demonstrado que uma proteína recombinante do merozoíta de *T.equi* e um anticorpo monoclonal específico podem ser usados para a inibição competitiva (c-ELISA) (KERBER, 2005). Atualmente, novas pesquisas têm sido feitas no sentido de se utilizar esta técnica no diagnóstico da *B.caballi* e pode ser considerada como uma técnica alternativa para diagnóstico dessa doença (XUAN et al, 2002). A Técnica de PCR (*polymerase chain reaction*) amplifica repetidamente a seqüência específica de DNA do genoma de um organismo-alvo que se possa detectar o DNA do parasito num sangue

com parasitemia muito pequena, sendo o teste de PCR, 100X mais sensível que os limites de detecção microscópica. A grande sensibilidade e especificidade da técnica de PCR faz-se útil para validar resultados obtidos por outras técnicas de diagnóstico para *Babesia* spp para certificados de exportação de gado. (BÖSE et al., 1995; BATTSETSEG et al., 2002). Atualmente, o método diagnóstico para Babesioses eqüinas, tanto por *Babesia equi* (*Theileria equi*) como *Babesia caballi*, mais aceito, é o ELISA competitivo (c-ELISA), exame negativo obrigatório para trânsito de eqüinos (LNIV, 2009).

Outra doença a ser estudada é a Erliquiose (ou anaplasmosse) descrita como moléstia infecciosa que acomete eqüinos, cães, ruminantes, gatos, primatas não-humanos e humanos, denominada como um grupo de doenças. Usualmente nomeada de acordo com a espécie do hospedeiro e o tipo de células brancas, que às vezes, são infectadas. Classificadas como: A) Erliquiose canina (tendo como agente *Ehrlichia canis* e *Ehrlichia ewingii* (Erliquiose monocítica canina) e *Ehrlichia chaffeensis* (ocasionalmente Erliquiose granulocítica canina); B) Erliquiose eqüina tendo agente *Ehrlichia risticii* (também nomeada *Neorickettsia risticii* – Erliquiose monocítica eqüina) e *Ehrlichia equi* (ou *Anaplasma phagocytophilum* – Erliquiose granulocítica eqüina), podendo acometer ruminantes; C) Erliquiose humana (tendo como agente *Ehrlichia chaffeensis* e *E.ewingii* (Erliquiose monocítica humana) e *Anaplasma phagocytophilum* (Erliquiose granulocítica humana) (OIE, 2005).

Em 2001, a taxonomia da erliquia foi modificada. Formalmente, denominada do gênero *Erlichia*, tribo *Ehrlichieae* e família *Rickettsiaceae*. Muitas espécies têm sido reclassificada por gênero *Anaplasma* ou *Neorickettsia* e família *Anaplasmataceae*. *Anaplasma phagocytophilum* é conhecida também como *E.equus*, *E.phagocytophilum* e o agente da Erliquiose granulocítica humana, sendo esses organismos reconhecidos, atualmente, como os mesmos (OIE, 2005).

As duas formas de erliquiose de importância no rebanho eqüino, atualmente, são a erliquiose monocítica e erliquiose granulocítica.

A erliquiose monocítica eqüina, também conhecida como “Febre eqüina do Potomac” (PHF – Potomac horse fever) foi recentemente descrita como uma doença importante, causada pela erliquia monocitotrófica *Ehrlichia risticii*, tendo como

principais sintomas clínicos: depressão, anorexia, variação de temperatura corporal, diarreia e ocasionalmente laminite. A infecção dos enterócitos tanto de intestinos delgado como do grosso resulta em colite aguda, um dos principais sintomas clínicos desta doença. Determina mortalidade variando entre 8 e 12% dos animais acometidos, principalmente em animais que não receberam tratamento adequado (BISWAS et al., 1991; REUBEL et al., 1998a; MADIGAN e PUSTERLA, 2000; PUSTERLA et al., 2000a). A via de transmissão da doença não está totalmente definida, por não haver evidências de vetores artrópodes como o carrapato. Devido ao fato, tem-se associado à doença a ambientes à beira de rios e outros habitats aquáticos. (REUBEL et al., 1998a; MADIGAN; PUSTERLA, 2000a). FEP tem sido confirmada sorologicamente utilizando teste de imunofluorescência indireta e por PCR (polymerase chain reaction). Alguns autores têm identificado o DNA da erlíquia em caramujos de lagos no Norte da Califórnia a partir de teste com PCR. (MADIGAN; PUSTERLA, 2000; PUSTERLA et al., 2000a). O diagnóstico de FEP é efetuado a partir de presença de sinais clínicos típicos, sazonalidade (entre maio e novembro) e distribuição geográfica da doença. O diagnóstico definitivo tem sido baseado em isolamento ou detecção do agente no sangue ou nas fezes do animal suspeito. Utiliza-se a técnica de imunofluorescência indireta, isolamento do agente em cultura de células, e mais recentemente, a utilização de PCR específico para *E.risticii*, que tem facilitado o diagnóstico de FEP, pois o PCR convencional, além de necessitar de um tempo maior para realização, também está propenso a contaminação. (BARLOUGH et al., 1997; MADIGAN; PUSTERLA, 2000; PUSTERLA et al., 2000a)

A erliquiose granulocítica eqüina (EGE) é uma doença rickettsial eqüina, que acomete também burros, cães, lhamas, roedores e humanos (conhecida como erliquiose granulocítica humana – HGE) (MERCK VETERINARY EDITION, 2003), reportada em 1960 no Norte da Califórnia, EUA, tendo como agente causador, a *Ehrlichia equi* (também conhecida como *Anaplasma phagocytophilum*), descrita como bactéria gram-negativa, com tropismo por neutrófilos e eosinófilos sanguíneos. Nas manifestações clínicas incluem-se: febre, letargia, anorexia, edema, ataxia, relutância ao se mover, hemorragias petequiais, e laboratorialmente se caracteriza por anemia, leucopenia e corpúsculos de inclusão (formações pleomórficas azul-acinzentadas para

preto-azuladas) encontrados nos neutrófilos ou nos eosinófilos. (BARLOUGH et al., 1996; REUBEL et al., 1998b; RIKIHASA, 2000; MADIGAN; PUSTERLA, 2000a; BERMANN et al., 2002). As inclusões aparecem somente em 30 a 40% dos neutrófilos circulantes, 3 a 4 dias após a infecção (MERCK VETERINARY EDITION, 2003). O vetor da EGE é o carrapato *Ixodes* spp, sendo o principal o *Ixodes pacificus*. A doença tem sido diagnosticada com frequência nos Estados Unidos e em países do norte da Europa, no Canadá e no Brasil, em menor número. (BARLOUGH et al., 1995; REUBEL et al., 1998b; MADIGAN e PUSTERLA, 2000a; BERMANN et al., 2002; BARCELOS et al., 2006)

Animais domésticos, como eqüinos, asnos, cachorros e gatos podem ser considerados reservatórios de *Anaplasma phagocytophilum*, assim como ruminantes e humanos (TORINA et al., 2008).

Hilton et al. (2008) descreveram um caso de anaplasmosose por *Anaplasma phagocytophilum* em eqüino, diagnosticado pela técnica de PCR, apresentando uma variedade de sinais clínicos como febre, petéquias, edema, icterícia, inclusive orquite e decúbito, ocasionado por miodegeneração (rabdomiolise) devido a infecção pelo agente.

Complicações podem ser incluídas no quadro de anaplasmosose, como abortos, espermiogênese alterada por vários meses (STUEN, 2007).

Morte de equinos associada com *Anaplasma phagocytophilum* é rara, mas Franzén et al. (2007) relataram um caso em eqüino experimentalmente infectado, no qual descreveram que seqüelas da doença como imunossupressão levaram a infecções secundárias simultâneas com outros agentes e traumas decorrentes por ataxia causada pela doença aguda, ocasionaram a morte do animal.

Estudo realizado com dois grupos de animais, um grupo com sintomatologia e outro sem sintomatologia para anaplasmosose, mostrou que 17,03% (23/135) dos animais sem sintomatologia desafiados ao teste de ELISA apresentaram anticorpos para o agente, enquanto somente 13,03% (2/15) dos animais com sintomatologia apresentaram anticorpos para o agente (PASSAMONTI et al., 2008).

Análise recente da seqüência genética 16S rRNA do DNA revelou que no máximo, três bases são diferentes entre *E. equi* e *E. phagocytophila*, descritos como

agente causador de doença em ruminantes, ovinos e caprinos na Europa, sendo recentemente elucidada, a similaridade genética ao agente da Erliquiose granulocítica humana (EGH) (RIKIHASA, 2000).

Franzén et al. (2005) relataram, em estudo com eqüinos infectados experimentalmente com *Anaplasma phagocytophilum*, que eqüinos com 5 dias de infecção, já apresentavam o teste de PCR positivo, e que todos animais se mostraram positivos ao teste, 2 a 3 dias antes do aparecimento dos sinais clínicos. Relataram também que esses animais, 4 a 7 dias antes do aparecimento de inclusões encontradas nos neutrófilos, já mostravam-se positivos ao teste de PCR para *A.phagocytophilum*.

O diagnóstico tem sido confirmado a partir dos sinais clínicos, anormalidades hematológicas e a observação de corpúsculos de inclusão. A erliquiose granulocítica eqüina (EGE) também pode ser diagnosticada, segundo Mutani e Kaminjolo (2001), a partir de cultura celular de granulócitos, prova que tem se mostrado mais eficiente para diagnóstico de erliquiose quando comparado a tradicional visualização microscópica de esfregaço de sangue para detecção de erlíquia.

Imunologicamente, os animais infectados desenvolvem anticorpos detectáveis por IFA (imunofluorescência), e leucócitos dos animais infectados apresentam inibição quando misturados ao antígeno *E.equi* (RIKIHASA, 2000). Os anticorpos maternos protegem os potros da doença por até 2 meses, mas não do estabelecimento da infecção (NYINDO et al., 1978).

Uma alternativa para diagnóstico de EGE tem sido o uso de teste de imunofluorescência indireta e recentemente, o uso de PCR (*polymerase chain reaction*), possuindo este, uma maior eficácia, comparada aos demais métodos de diagnóstico para a enfermidade em questão (BARLOUGH et al., 1995; REUBEL et al., 1998b; MADIGAN; PUSTERLA, 2000a; BERMANN et al., 2002; MERCK VETERINARY EDITION, 2003).

Trapp et al. (2006) relataram em estudo realizado em Hospital veterinário, em Londrina, Paraná, a ocorrência de co-infecção de *Babesia vogeli* e *Erlíquia canis*, em 6 dos 18 cães avaliados, que apresentaram sinais clínicos neurológicos, possivelmente devido a co-infecção.

A coexistência de anaplasmoses granulocítica, borreliose e babesiose em humanos foi descrita num estudo realizado por Szpakowicz et al., em 2004, que relata casos de coinfeção em humanos, sendo o diagnóstico feito por PCR (*polymerase chain reaction*). Esses autores descrevem que foram avaliados 96 pacientes infectados ou suspeitos para borreliose e que ao exame de PCR, dez demonstraram ser positivos para *Anaplasma phagocytophilum*, assintomaticamente, enquanto para *B.burgdorferi*, estes apresentavam sinais clínicos.

Segundo estudo epidemiológico realizado por Cringoli et al. em 2002, na região sul da Itália, 86,4% dos bovinos avaliados apresentaram tanto *Babesia bigemina* como *Anaplasma marginale*, ao teste de ELISA, o que coloca em risco os animais importados de áreas livres dessas doenças tais regiões.

Devido a relatos sobre a ocorrência de coinfeção de babesiose e anaplasmoses nas espécies descritas anteriormente, é de grande importância ter conhecimento se esta coinfeção pode estar acontecendo em equinos no Estado de São Paulo.

3 OBJETIVOS

O delineamento da pesquisa em questão objetivou investigar e diagnosticar doença concomitante babesiose (por *Babesia equi* ou *Theileria equi*) e Erliquiose (por *Erlíquia equi* ou *Anaplasma phagocytophilum*), no Estado de São Paulo, em rebanhos equinos, utilizando as técnicas de *Nested* PCR (*nested* polymerase chain reaction – reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico de *T. equi* e *A. phagocytophilum*) e c-ELISA (competitive enzyme-linked immunosorbent assay para diagnóstico de *T. equi*) ou ELISA indireto (para diagnóstico de *A. phagocytophilum*) comparando entre si, seus resultados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

Foram colhidas amostras de sangue de eqüinos (suspeitos ou não para erliquiose e/ou babesiose), independente de idade, sexo, raça e manejo, atendidos no Hospital Veterinário do Setor de eqüinos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (82 amostras), e de animais provenientes de propriedades localizadas no Estado de São Paulo (168 amostras), para realização de teste de *Nested* PCR para ambas enfermidades, c-ELISA para diagnóstico de *T. equi* e ELISA indireto para diagnóstico de *A. phagocytophilum*, totalizando 250 amostras de sangue.

As amostras foram obtidas através de punção da veia jugular, por sistema vacutainer®¹, em tubo siliconizado, estéril, com EDTA, para obtenção de sangue total e , tubo siliconizado, estéril, sem anticoagulante, para obtenção de soro.

Primeiramente, foi realizado um exame direto do sangue (esfregaço sanguíneo, corado com corante de Rosenfeld²) para verificar a presença de corpúsculos de inclusão em neutrófilos e/ou eosinófilos (para diagnóstico de erliquiose), ou a presença do parasito no interior do eritrócito (para diagnóstico de babesiose).

O sangue total obtido foi acondicionado em microtubos³ (com capacidade para 1,5 ml) previamente identificados, e armazenados em freezer - 70°C, para posterior processamento e realização de extração de DNA e realização de *Nested* PCR.

O material para obtenção de soro eqüino foi obtido após centrifugação⁴ à 8.000rpm por 5 minutos acondicionado em microtubos⁵ (com capacidade para 1,5 ml) previamente identificados, e armazenados em freezer - 70°C, para posterior desafio em teste de ELISA competitivo (c-ELISA) ou ELISA indireto.

¹Sistema vacutainer® – Becton Dickinson

² Giensa em pó (0,97g), May Grunwald (0,53g) e Metanol p.a q.s.q (1000ml). (BIRGEL et al, 1982)

³ Microtubos livres de DNA e RNA, marca Axygen.

⁴ Centrífuga para tubos, Modelo Combate, Marca CELM.

⁵ Marca Axygen

4.2 TÉCNICA DE NESTED PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION – REAÇÃO EM CADEIA POLIMERASE)

A técnica de *Nested PCR* consistiu em: extração do DNA da amostra, PCR – Reação em cadeia de polimerase (amplificação do DNA no Termociclador), amplificação do DNA obtido no PCR, eletroforese, leitura do gel no Trans-iluminador.

O protocolo utilizado para diagnóstico de *Theileria equi* foi descrito por Nicolaiewsky et al. (2001) com modificações, e para *Anaplasma phagocytophilum*, foi utilizado o protocolo descrito por Massung et al. (1998) com modificações, conforme descritas a seguir.

4.2.1 Extração do DNA a partir de amostras de sangue total

A extração do DNA foi realizada a partir da amostra de sangue total com EDTA, utilizando o KIT de extração *QIAmp Blood Mini Kit* - QIAGEN®, seguindo as recomendações do próprio KIT.

Uma alíquota de 200µl de sangue total de cada amostra foi adicionada a 20µl de *proteínase* e 200 µl de *Buffer AL* (tampão de lise) e homogeneizadas em vórtex⁶ por 15 segundos. Foram incubadas por 10 minutos à temperatura de 56°C em banho-seco⁷. Após incubação, o material foi adicionado a 200µl de Etanol a 96% e homogeneizado em vórtex por 15 segundos. Por 30 segundos, o material obtido foi centrifugado a 8.000 rpm à 20°C em centrífuga Marca Eppendorf⁸. O conteúdo foi transferido para *Spin colum*⁹ e centrifugado a 8.000 rpm por 3 minutos à 20°C. Dispensado o filtrado e transferida a rede de sílica para um tubo coletor¹⁰, houve centrifugação do material à 8.000 rpm por 1 minuto à 20°C. Adicionou-se 500µl de *Buffer AW1*¹¹ (primeira solução de lavagem) ao material e centrifugado à 8.000 rpm por 1 minuto à 20°C. Descartado o

⁶ Vórtex – agitador de tubos AP56, Marca Phoenix

⁷ Banho-seco Type 17600, Dri-Bath, Marca Barnstead (Termolyne)

⁸ Centrífuga para microtubos - Centrifuge 5417R, marca Eppendorf

⁹ Microtubo contendo filtro de sílica (parte integrante do KIT de extração de DNA, marca Qiagen);

¹⁰ Tubo coletor integrante do KIT de extração de DNA, marca Qiagen.

¹¹ Solução de lavagem integrante no KIT de extração de DNA, Marca Qiagen;

filtrado, a rede de sílica foi transferida a outro tubo coletor e adicionado a 500µl de *Buffer AW2*¹². Após centrifugação à 14.000 rpm por 3 minutos, foi descartado o filtrado e novamente centrifugado à 14.000 rpm por 1 minuto. Descartado o filtrado, a rede de sílica foi transferida para um microtubo com capacidade de 1,5 ml, e adicionado 200 µl de *Buffer AE*¹³. Após incubação em temperatura ambiente por 5 minutos, houve a centrifugação do material à 8.000 rpm por 1 minuto à 20°C e transferência do conteúdo para microtubo¹⁴ com capacidade de 0,5ml.

O DNA extraído acondicionado em microtubo de 0,5 ml foi armazenado em freezer à - 20°C até a realização do teste diagnóstico de *Nested PCR*.

4.2.2 Reação em Cadeia Polimerase (PCR) – Amplificação do DNA da amostra

A reação em cadeia polimerase é uma técnica de biologia molecular que permite a replicação *in vitro* do DNA, na qual ocorre a amplificação de material genético, permitindo a detecção de agentes. O processo de amplificação decorre de 3 (três) passos: desnaturação inicial, anelamento ou hibridização, e extensão final. (ROCHE, 2009)

A desnaturação inicial ou desnaturação térmica ocorre em altas temperaturas, promovendo a abertura da dupla fita de DNA, ligada por pontes de nitrogênio, expondo os nucleotídeos. Após a desnaturação, ocorre o anelamento, que consiste na ligação dos *primers* (ou iniciadores) em sequências-alvo, para dar início a sequência complementar. E finalmente, a fase da extensão final, no qual ocorre a replicação da sequência complementar, com o auxílio da *Taq polimerase*, com função de posicionar corretamente os nucleotídeos (dNTPs) na fita de DNA correspondente (ROCHE, 2009).

¹² Solução de lavagem integrante no KIT de extração de DNA, Marca Qiagen;

¹³ Solução de Tampão de diluição integrante no KIT de extração de DNA, Marca Qiagen.

¹⁴ Microtubo livre de DNA e RNA, Marca Axygen.

4.2.2.1 Protocolo de reação de amplificação de *Theileria equi*

Os protocolos de reação de amplificação para realização da PCR e da *Nested* PCR para *Theileria equi* foram realizadas em volume total de 25,0 µl, sendo utilizados 1,0 µl de cada amostra de DNA para reação de PCR e 1,0µl de cada amostra de DNA amplificado no PCR para *Nested* PCR, segundo descrição no quadro 1 a seguir:

Reagentes	Volumes por amostra
Água ultrapura	15,6 µl
Buffer 10x	2,5 µl
dNTP	2,5 µl
Mgcl ₂ **	0,75 µl
Primer – F ^a	1,25 µl
Primer – R ^b	1,25 µl
<i>Taq</i> DNA polimerase (Platinum®)	0,15 µl
Volume total	24,0 µl de mix

^a forward, ^b reverse; ** co-fator da *Taq* DNA polimerase

Quadro 1 - Reagentes utilizados na reação de amplificação para realização da PCR e *Nested* PCR para *Theileria equi*

A água ultrapura utilizada nas reações de amplificação foi obtida através do Sistema de purificação de água¹⁵ e autoclavada¹⁶ para descartar qualquer possível contaminação e os reagentes utilizados foram 10X PCR RXN Buffer (200 mM Tris-HCL (pH 8,4), 500 mM KCL), Mgcl₂ (50 mM) e *Platinum Taq DNA polimerase* (Invitrogen®).

O dNTP (200µM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP))¹⁷ foi preparado em laboratório especial para realização de PCR, em fluxo Laminar¹⁸, previamente descontaminado com luz ultravioleta (por 15 minutos)

Os primers utilizados na reação de amplificação de PCR (primers externos) e *Nested* PCR (primers internos) para *Theileria equi* estão descritos no quadro 2 abaixo, segundo Nicolaiewsky et al. (2001):

¹⁵ Sistema de Purificação de água – Modelo: MilliQ academia (Q-Gard®), Marca: Millipore.

¹⁶ Autoclave vertical – Phoenix – Equipamentos Científicos

¹⁷ 100 mM dNTP set (PCR grade), Marca Invitrogen® - Lote: 519801

¹⁸ Marca Trox® Technik, Série: 1871

Primers*		
Externos (produto – 396pb)	EMAE – F	5' - CCGCCCTTCACTCGTTCTCAA – 3'
	EMAE – R	5'- TCTCGGCGGCATCCTTGACCTC – 3'
Internos (produto – 102pb)	EMAI – F	5'- CCGTCTCCGTTGACTTGGCCG – 3
	EMAI – R	5'- GGACGCGCTTGCCTGGAGCCT – 3'

*consultados no Genbank¹⁹

Quadro 2: Primers utilizados na reação de amplificação de PCR (primers externos) e *Nested* PCR (primers internos) para *Theileria equi*

A amostra do controle positivo²⁰ para *Theileria equi* foi manejada igualmente as amostras a serem estudadas no teste, sendo utilizado 1,0 µl da amostra na reação.

4.2.2.2 Protocolo de reação de amplificação para *Anaplasma phagocytophilum*

Os protocolos de reação de amplificação para realização da PCR e de *Nested* PCR para *Anaplasma phagocytophilum* foram realizadas num volume total de 25,0 µl cada, sendo utilizados 1,0 µl de cada amostra de DNA para reação de PCR e 1,0µl de cada amostra de DNA amplificado no PCR para *Nested* PCR, segundo descrição no quadro 3 a seguir:

¹⁹ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

²⁰ Amostra do controle positivo para *T.equi* foi adquirida a partir do diagnóstico no *Nested* PCR realizado no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Patologia Veterinária da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus Jaboticabal.

Reagentes	Volumes por amostra
Água ultrapura	17,625µl
Buffer 10x	2,5µl
dNTP	2,0µl
Mgcl ₂	0,75µl
Primer - F	0,5µl
Primer - R	0,5µl
<i>Taq DNA polimerase</i> (Platinum®)	0,125µl
Volume total	24,0 µl de mix

^a forward, ^b reverse

Quadro 3: Reagentes utilizados na reação de amplificação para realização da PCR e *Nested PCR* para *Anaplasma phagocytophilum*

A amostra do controle positivo²¹ para *Anaplasma phagocytophilum* foi manejada igualmente as amostras a serem estudadas no teste, sendo utilizado 1,0 µl da amostra na reação.

A água ultrapura e os reagentes (10X PCR RXN Buffer, Mgcl₂ e *Taq platinum* e dNTP (Invitrogen®)), utilizados para realização da reação de PCR e *Nested PCR* para *Anaplasma phagocytophilum* foram manejados e preparados igualmente, como descritos para realização da reação para *Theileria equi*.

Os primers utilizados na reação de amplificação de PCR (primers externos) e *Nested PCR* (primers internos) para *Anaplasma phagocytophilum* estão descritos no quadro 4 abaixo, segundo Massung et al. (1998):

Primers*		
Externos (produto – 936pb)	gE3a	5' - CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC - 3'
	gE10R	5' - TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC – 3'
Internos (produto – 546pb)	gE2	5' - GGCAGTATTAAAAGCAGCTCCAGG – 3'
	gE9f	5' - AACGGATTATTCTTTATAGCTTGCT – 3'

* consultados no Genbank

Quadro 4 - Primers utilizados na reação de amplificação de PCR (primers externos) e *Nested PCR* (primers internos) para *Anaplasma phagocytophilum*

²¹ Amostra do controle positivo para *Anaplasma phagocytophilum* foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Steve Dumler, do John Hopkins Hospital, Baltimore, Maryland, USA.

4.2.3 Ciclos de amplificação

Os ciclos de amplificação foram realizados no Termociclador *Mastercycler gradiente*, Marca Eppendorf®.

4.2.3.1 *Theileria equi*

4.2.3.1.1 PCR - reação em cadeia polimerase

As condições de amplificação para realização da PCR estão descritas no quadro 5 abaixo:

Processo	Número de ciclos	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	1	94°C	4 minutos
Anelamento	40	94°C	30 segundos
		60°C	30 segundos
		72°C	30 segundos
Extensão final	1	72°C	4 minutos

Quadro 5 - Condições de amplificação, número de ciclos, temperaturas e tempo, para realização de PCR para *Theileria equi*

4.2.3.1.2 *Nested PCR*

As condições de amplificação para *Theileria equi* estão descritas no quadro 6 a seguir:

Processo	Número de ciclos	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	1	94°C	4 minutos
Anelamento	35	94°C	30 segundos
		60°C	30 segundos
		72°C	30 segundos
Extensão final	1	72°C	5 minutos

Quadro 6 - Condições de amplificação (número de ciclos, temperaturas e tempo) para realização de *Nested PCR* para *Theileria equi*

4.2.3.2 PCR e *Nested PCR* para *Anaplasma phagocytophilum*

As condições de amplificação para PCR e para *Nested PCR* para *Anaplasma phagocytophilum* estão descritas num mesmo quadro (quadro 7), por serem iguais, como visto a seguir:

Processo	Número de ciclos	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	1	94°C	5 minutos
Anelamento	40	94°C	30 segundos
		55°C	30 segundos
		72°C	1 minuto
Extensão final	1	72°C	5 minutos

Quadro 7 - Condições de amplificação (número de ciclos, temperaturas e tempo) para realização de PCR e *Nested PCR* para *Anaplasma phagocytophilum*

4.2.4 Eletroforese

Para realização da eletroforese horizontal, foi realizada a preparação do gel de corrida, gel de agarose (Ultrapure® agarose, Invitrogen® - cat: 15510-027) a 2%, que consistiu em 100 ml de tampão TBE 0,5X (5,4 g de Tris-base, 2,75g de Ácido Bórico, 2,0 ml EDTA a 0,5M (pH 8,0)), adicionada a 2g de agarose. A solução foi

homogeneizada e colocada em aparelho microondas²² por 1 minuto, para que ocorresse a dissolução total da agarose. Após dissolução total, houve a mensuração da temperatura, até atingir 55°C. Ao gel, ainda líquido, foi adicionado *Sybr safe*²³ (corante de DNA no gel), na proporção de 1µl para cada 10 ml de gel. Após solidificação do gel e adição de tampão TBE 0,5X, 10 µl de cada amostra foi adicionado a 2µl de *Blue Juice*²⁴ (corante de DNA na amostra) e colocadas nos poços do gel. Para determinação do tamanho dos produtos de amplificação, foi utilizado como marcador de peso molecular, 5µl de *100pb ladder*²⁵ (Invitrogen®) diluído e realizada a corrida eletroforética a 100v por 30 minutos (aproximadamente) em cuba horizontal²⁶.

4.2.5 Leitura do gel no Transiluminador

Os produtos da *Nested* PCR foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta²⁷ e as imagens armazenadas.

4.3 TÉCNICA DE C - ELISA (COMPETITIVE ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY) PARA DIAGNÓSTICO DE BABESIOSE.

A técnica de ELISA competitivo dá-se pelo princípio de bloqueio da atividade de uma enzima previamente marcada, na qual amostras suspeitas (com ou sem anticorpos específicos) são desafiadas em um recipiente com antígenos específicos. Caso essas amostras possuam anticorpos, estes irão ligar-se aos antígenos, bloqueando estes

²² Microondas, Modelo Instant action, Marca Sharp.

²³ Sybr® Safe DNA gel Stain (10X concentrate in DMSO) – S33102, Lot: 562411.

²⁴ 10x Blue Juice – gel Loading Buffer, Invitrogen®, Lot: 417673

²⁵ Diluição do *Ladder*: 10µl de *Ladder*, 10µl de *Blue Juice* 10%, 80µl de TE (10nM Tris Cl (pH 8,0), 1mM EDTA (pH 8,0))

²⁶ Cuba: Horizon® 58, Life technologies (Gibco BRL horizontal gel Electrophoresis Apparatus)

²⁷ Sistema de documentação de gel (transiluminador) Gene flash (Syngene Bio Imaging)

epítomos, inibindo a ligação das enzimas-marcadas. Quanto mais anticorpos presentes na amostra testada, menor será a coloração da reação. (IDEXX Laboratories, 2009)

Para diagnóstico de babesiose por *Theileria equi* foi utilizado Kit c - ELISA (ELISA competitive) específico²⁸.

4.4 TÉCNICA DE ELISA INDIRETO PARA DIAGNÓSTICO DE ANAPLASMOSE.

A técnica de ELISA indireto dá-se pelo princípio do anticorpo da amostra ser envolvido entre o antígeno que reveste a placa experimental e uma enzima-marcada. A adição de uma enzima reagente substrato-cromogênica promove uma cor ao ligar-se ao conjugado antígeno-anticorpo. A coloração produzida na reação é diretamente proporcional a quantidade de anticorpos presentes na amostra suspeita. (IDEXX Laboratories, 2009)

Para diagnóstico de Anaplasmosse por *Anaplasma phagocytophilum* foi utilizado Kit ELISA indireto específico²⁹, validado por Chandrashekar et al. (2008) para soro eqüino.

Figura 1 - Imagem ilustrativa do KIT SNAP 4DX® (IDEXX)

Figura 2 - Imagem ilustrativa do conjugado do KIT SNAP 4DX® (IDEXX)

²⁸ VRMD, Inc. (<http://www.vmr.com/products/testkits/detail.aspx?CATNO=274-2>)

²⁹ SNAP 4DX® (IDEXX - <http://www.idexx.com/animalhealth/testkits/4dx>)

5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foram avaliadas as percentagens obtidas entre os positivos e negativos para Erliquiose eqüina por *Ehrlichia equi* (*Anaplasma phagocytophilum*) e Babesiose por *Theileria equi* comparando com os resultados observados no esfregaço sangüíneo e no teste de *Nested* PCR e c – ELISA ou ELISA indireto, entre si.

6 RESULTADOS

Os resultados dos testes das 250 amostras analisadas tanto para *Theileria equi* como para *Anaplasma phagocytophilum* estão apresentados em forma de tabelas e quadros, divididos por método de análise utilizada e também estão dispostos no apêndice A (resultados individuais).

6.1 Esfregaço sanguíneo – Pesquisa de hemoparasitas

Os resultados das análises dos esfregaços sanguíneos para pesquisa de hemoparasitas para detecção de *Theileria equi* no interior dos eritrócitos demonstraram que 96 (38,4%) das amostras avaliadas apresentaram resultado positivo e 154 (61,6%) das amostras se mostraram negativas, totalizando 250 (100%) amostras, enquanto das amostras avaliadas para detecção de *Anaplasma phagocytophilum*, 100%, ou 250 amostras, apresentaram resultado negativo, não sendo observado a presença de mórula no interior de neutrófilos ou eosinófilos, como apresentado na tabela 1, e gráficos 1 e 2.

Tabela 1 - Distribuição de amostras positivas e negativas na pesquisa de *Theileria equi* e *Anaplasma phagocytophilum*, em esfregaços sanguíneos (exame direto do sangue), em rebanho equino, Estado de São Paulo - 2009

N° de amostras analisadas	<i>Theileria equi</i>		<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	
	<i>Positivo</i>	<i>Negativo</i>	<i>Positivo</i>	<i>Negativo</i>
250	96	154	0	250
100%	38,4%	61,6%	0%	100%

Gráfico 1 - Representação da distribuição de amostras positivas e negativas na pesquisa de *Theileria equi* em esfregaços sanguíneos (exame direto do sangue), em rebanho eqüino, Estado de São Paulo - 2009

Gráfico 2 - Representação da distribuição de amostras positivas e negativas para *Anaplasma phagocytophilum* em esfregaços sanguíneos (exame direto do sangue), em amostras de sangue total equino, Estado de São Paulo - 2009

6.2 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO

6.1.1 Competitivo (c-ELISA para *Theileria equi*)

Os resultados do Ensaio imunoenzimático competitivo (c-ELISA) para detecção de anticorpos para *Theileria equi* demonstraram que 115 (46%) das amostras avaliadas apresentaram resultado positivo e 135 (54%) das amostras se mostraram negativas, totalizando 250 (100%) amostras, como apresentado na tabela 2 e no gráfico 3.

Tabela 2 - Distribuição de amostras positivas e negativas na pesquisa de anticorpos para *Theileria equi*, em ensaio imunoenzimático competitivo³⁰ (c-ELISA) em amostras de soro equino, Estado de São Paulo - 2009

N° de amostras analisadas	<i>Theileria equi</i>	
	<i>Positivo</i>	<i>Negativo</i>
250	115	135
100%	46%	54%

³⁰ VRMD, Inc. (<http://www.vmr.com/products/testkits/detail.aspx?CATNO=274-2>)

Gráfico 3 - Representação da distribuição de amostras positivas e negativas em ensaio imunoenzimático competitivo (c-ELISA) para *Theileria equi* em amostras de soro equino, Estado de São Paulo - 2009

6.1.2 Indireto (SNAP 4DX® para *Anaplasma phagocytophilum*)

Os resultados do Ensaio imunoenzimático indireto (i-ELISA) para detecção de anticorpos para *Anaplasma phagocytophilum* demonstraram que 7 (3%) das amostras avaliadas apresentaram resultado positivo e 243 (97%) das amostras se mostraram negativa, totalizando 250 (100%) amostras, como apresentado na tabela 3 e no gráfico 4.

Tabela 3 - Distribuição de amostras positivas e negativas na pesquisa de anticorpos para *Anaplasma phagocytophilum*, em ensaio imunoenzimático indireto (iELISA) através de SNAP 4DX® (IDEXX®) em amostras de soro equino, no Estado de São Paulo, 2009.

N° de amostras analisadas	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	
	<i>Positivo</i>	<i>Negativo</i>
250	7	243
100%	3%	97%

Gráfico 4 - Representação da distribuição de amostras positivas e negativas em ensaio imunoenzimático indireto (i-ELISA – SNAP 4DX®³¹) para *Anaplasma phagocytophilum* em amostras de soro equino, Estado de São Paulo - 2009.

Uma das amostras testadas para *Anaplasma phagocytophilum* através do SNAP 4DX®, apresentou positividade com a mesma intensidade de cor que o controle positivo do teste, como mostra na figura 4, comparada à figura 3.

As demais 6 amostras que apresentaram positividade para *Anaplasma phagocytophilum*, mostraram fraca intensidade de coloração quando comparada a do controle positivo do teste e 9 amostras (9/250) apresentaram positividade para *Ehrlichia canis*, sugerindo a presença de anticorpos para o agente, exemplificado na figura 5.

Figura 3 - Interpretação de resultados do Kit de teste SNAP 4DX®

³¹ IDEXX® - <http://www.idexx.com/animalhealth/testkits/4dx>

Figura 4 - Imagem fotográfica de amostra positiva para *Anaplasma phagocytophilum* no SNAP 4DX®, com intensidade de cor semelhante ao controle positivo do teste

Figura 5 - Imagem fotográfica de amostra positiva para *Ehrlichia canis* no SNAP 4DX®, com intensidade de cor inferior ao controle positivo do teste

6.2 NESTED PCR

6.2.1 *Theileria equi*

Os resultados do *Nested* PCR para detecção *Theileria equi* demonstraram que 90 (36%) das amostras avaliadas apresentaram resultado positivo e 160 (64%) das amostras se mostraram negativas, totalizando 250 (100%) amostras, como apresentado na Tabela 4, no gráfico 5 e exemplificado em figura 6.

Tabela 4 - Distribuição de amostras positivas e negativas ao teste de *Nested* PCR para *Theileria equi* de sangue total eqüino, São Paulo - 2009

Nº de amostras analisadas	<i>Theileria equi</i>	
	<i>Positivo</i>	<i>Negativo</i>
250	90	160
100%	36%	64%

Gráfico 5 - Representação da distribuição de amostras positivas e negativas em *Nested* PCR para *Theileria equi* de sangue total equino, no Estado de São Paulo, 2009.

As amostras que demonstraram ser positivas apresentaram, após a reação de amplificação e leitura em gel de agarose, banda visível na altura de 102 pares de bases (NICOLAIEWSKY et al., 2001), concordando com o controle positivo para o agente em questão, como indicado o exemplo, na figura 6.

A,B,C,D e F, G - K: amostras positivas; E – amostra negativa, L (*ladder*): marcador de peso molecular, CN: controle negativo; CP: controle positivo.

Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose 2% com *Sybr safe*®. Produtos amplificados com tamanho de 102pb (pares de bases) obtidos com oligonucleotídeos iniciadores (*primers*).

6.2.2 *Anaplasma phagocytophilum*

Os resultados do *Nested* PCR para detecção *Anaplasma phagocytophilum* demonstraram que 250 (100%) das amostras avaliadas apresentaram resultado negativo, como mostrado na tabela 5 e gráfico 6, a seguir.

Tabela 5 - Distribuição de amostras positivas e negativas ao teste de *Nested* PCR para *Anaplasma phagocytophilum* de sangue total equino - São Paulo - 2009

N° de amostras analisadas	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	
	<i>Positivo</i>	<i>Negativo</i>
250	0	250
100%	0%	100%

Gráfico 6 - Representação da distribuição de amostras positivas e negativas em *Nested* PCR para *Anaplasma phagocytophilum* de sangue total equino, Estado de São Paulo - 2009

As amostras testadas não produziram, após a reação de amplificação e leitura em gel de agarose, banda visível na altura de 546 pares de bases (MASSUNG et al,1998) concordando com o controle positivo para o agente em questão, como indicado na figura 7.

Amostras 1 a 5: amostras negativas; L (*ladder*): marcador de peso molecular, CN: controle negativo; CP: controle positivo.

Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose 2% com *Sybr safe*®. Produtos amplificados com tamanho de 546pb (pares de bases) obtidos com oligonucleotídeos iniciadores

7 DISCUSSÃO

As hemoparasitoses, principalmente babesioses (por *Babesia caballi* e *Theileria equi* (*Babesia equi*)) e erliquioses (por *Neorickettsia risticii* e *Anaplasma phagocytophilum* (*Erliquia equi*)) (BARROS et al., 2005), são enfermidades sanguíneas de grande importância na Medicina Veterinária, acometendo várias espécies animais principalmente eqüinos, podendo acometer também humanos (MUNDIM et al, 2008), são endêmicas em muitas regiões do mundo e apresentam alta prevalência (*Babesia caballi* e *Theileria equi* (*Babesia equi*)) e erliquioses (por *Neorickettsia risticii*) em muitas áreas no território brasileiro (TEGLAS et al., 2005).

Anaplasmoose granulocítica equina, por *Anaplasma phagocytophilum*, foi reportada pela primeira vez nos EUA em 1969, a partir de então, há relatos em outros países como: Suíça, Suécia, França, Alemanha, Itália, Reino Unido e Holanda, (BUTLER et al, 2008), havendo somente um relato de caso da enfermidade no Brasil, na região serrana do Rio de Janeiro (BARCELOS et al, 2006).

Em rebanhos eqüinos, esses parasitas, *Babesia* sp e *Anaplasma* sp, promovem consideráveis perdas, quanto à saúde animal com gastos relacionados a tratamento, manutenção destes animais, como no comércio eqüestre, prejudicando o treinamento e acondicionamento de importantes e valiosos animais para competição (FRIEDHOFF, 1988).

Segundo pesquisa realizada no Brasil em 2007 por Heim et al., infecções por *Babesia caballi* e *Theileria equi* possuem ampla distribuição no país, visto a grande porcentagem de animais positivos. Nesse trabalho, os autores estudaram 487 amostras, e obtiveram 43,9% de positividade para *T.equi* e 47,4% para *B.caballi*, utilizando a técnica de imunofluorescência, sendo que na presente pesquisa, a porcentagem de soropositivos no c-ELISA para *T.equi* foi 46% (115/250), valor semelhante ao autor supracitado.

Na presente pesquisa, a ocorrência de Babesiose por *Theileria equi* e anaplasmoose por *Anaplasma phagocytophilum* foi amplamente investigada pelo exame

direto (esfregaço sanguíneo), sorologia e *Nested* PCR nas diferentes regiões no Estado de São Paulo.

Os resultados apresentados mostraram a existência de muitos animais portadores de *Theileria equi*, os quais não apresentavam sintomatologia característica para babesiose, podendo estes serem doentes crônicos, e que em situação de estresse, poderiam apresentar uma parasitemia com aparecimento de sintomas, como salientado por Phipps e Other (2004).

Após análise dos resultados das diferentes técnicas para diagnóstico de *Theileria equi*, observou-se que a maior incidência de animais positivos foi demonstrada pelo Teste c-ELISA. Não necessariamente são animais doentes, mas sim que tiveram contato com o agente em alguma fase da vida, podendo ou não estar com o agente em seu organismo no momento da colheita, induzindo a ativação do sistema imunológico.

Phipps e Other (2004) afirmam que após infecção inicial por babesia spp, os animais podem permanecer no estado de portadores do agente, sem contudo apresentarem manifestação clínica compatível com a mesma. No caso de infecção por *Babesia caballi*, o agente se mantém na circulação em quantidades pequenas e quando adequadamente tratados não mais respondem com produção de anticorpos e podem se mostram negativos em testes sorológicos. Quanto a *T. equi*, acredita-se que o agente permaneça no organismo animal durante toda vida deste, promovendo produção de anticorpos específicos que podem ser observados em reações sorológicos, principalmente nos testes mais sensíveis como o c-ELISA. Este fato faz com que os animais sejam considerados portadores quando de competições internacionais e exportações, visto que alguns países não permitem a entrada em seu território de equinos soropositivos.

A pesquisa de hematozoários em esfregaço sanguíneo para detecção de *Theileria equi* mostrou menor número de animais positivos (38,4% das 250 amostras avaliadas), quando comparado a técnica de c-ELISA (46% das 250 amostras avaliadas), concordando com Kerber (2009), que descreve este método como de baixa sensibilidade, podendo promover falso-positivos devido a artefatos de técnica ou falso-negativos, por baixa parasitemia. Deve – se considerar que esta é uma técnica, rotineiramente utilizada como triagem em centros hípicas devido a sua praticidade,

havendo a necessidade de um profissional treinado para realização do teste, para que possa minimizar possíveis erros na leitura.

A técnica de PCR tem sido amplamente utilizada e reportada na literatura, como método que visa à investigação do DNA do agente causador de doença na amostra testada, sendo considerado método direto com maior sensibilidade que a microscopia (BASHIRUDDIN et al., 1999). Em nossa pesquisa, 36% (90/250) das amostras apresentaram positividade para *Theileria equi*, na técnica de *Nested* PCR, portanto, esses animais portavam o agente no organismo, mesmo sendo assintomáticos. Isto pode indicar uma infecção antiga onde o animal já passou pelo quadro clínico ou infecção muito recente onde o agente está circulante, mas ainda não causou alterações clínicas no animal.

O agente *Anaplasma phagocytophilum*, bactéria intracelular obrigatória, um dos causadores de anaplasmoze, tem sido reportado em muitos países como determinante de quadros de hipertermia, depressão, inapetência, relutância ao movimento, edema de membros, ataxia, trombocitopenia, petéquias em mucosas, anemia e leucopenia (BARLOUGH et al.; 1995 BUTLER et al., 2008; CHANDRASHEKAR et al., 2008), e em uma citação (BERMANN et al., 2002), causador de gastro-enterite hemorrágica.

A *Ehrlichia* spp pode ser visualizada como corpúsculo de inclusão ou mórulas em leucócitos (neutrófilos e eosinófilos) e em plaquetas em esfregaços sanguíneos feitos de sangue total ou papa de leucócitos, líquido cefalorraquidiano, líquido sinovial, aspirados de medula óssea e baço. (DAGNONE et al., 2001).

Na pesquisa de hemoparasitas, com intuito de observar a presença de corpúsculo de inclusão ou mórulas de *Anaplasma phagocytophilum* das amostras analisadas na presente pesquisa, não foi possível a visualização do parasito em neutrófilos nem eosinófilos, resultando em 100% de negatividade das 250 amostras estudadas. Este era um resultado esperado em função de termos trabalhado com animais assintomáticos e considerando que as inclusões são observadas somente em 30 a 40% dos neutrófilos circulantes, em 3 a 4 dias após a infecção (MERCK VETERINARY EDITION, 2003).

As amostras apresentaram baixa positividade pelo método ELISA indireto, realizado com SNAP 4DX®, havendo apenas 7 animais dos 250 testados, com a

presença de “possíveis” anticorpos contra *A.phagocytophilum*, podendo ser anticorpos para *Anaplasma platys*, como descrito por Breitschwerdt (2007), que sugeriu a reatividade cruzada sorológica entre anticorpos para *Anaplasma phagocytophilum* e para *Anaplasma platys* em cães. Devido ao resultado apresentado, essas amostras foram testadas utilizando a técnica de Nested PCR para *Anaplasma platys* (protocolo - anexo A, segundo Inokuma (2002)), realizadas no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus Botucatu, mostrando negatividade em todas essas amostras.

Das 250 amostras testadas, 3,6% (9/250) apresentaram reatividade a *Erlíquia canis*, mostrando um “fraco” positivo à reação de ELISA indireto (coloração da reação no teste foi mais fraca do que o controle positivo, visualizado na Figura 5, da página 50). Segundo COHN (2003), esta pode ser uma reação cruzada de anticorpos para *Neorickettsia risticii* e *Erlíquia canis*. Em função deste resultado, foi realizado Nested PCR para *E.canis*, segundo protocolo (em anexo B) de Bulla (2003), resultando em negatividade das nove amostras testadas e Nested PCR para *Neorickettsia risticii*, onde somente duas amostras, apresentaram resultado positivo, o que pode indicar que houve, de fato, reação cruzada com *Erlíquia canis* no teste ELISA indireto (SNAP 4DX®), sendo estes animais portadores de DNA de *N.risticii* e provavelmente de anticorpos para tal agente, evidenciado no teste indireto.

Greig e Armstrong (2006) descrevem que determinações de anticorpos, como o ensaio *imunoblot*, são espécie-específicas, mas reatividade cruzada com outras espécies pode ocorrer, tanto com o *imunoblot* como nos testes de Imunofluorescência e no ELISA indireto. Esta reatividade cruzada é causada por proteínas de superfície imunodominantes, que possuem peso molecular similar a outras proteínas imunodominantes, particularmente da mesma família, como no caso da *Erlíquia spp* e *Anaplasma phagocytophilum*. Reatividade cruzada sorológica entre *Anaplasma phagocytophilum* e outros agentes, transmitidos por carrapatos, tem sido avaliada, sendo incomum uma reatividade forte entre *A.phagocytophilum* e agentes erliquiais como *Erlíquia canis*, *Erlíquia ewingii* e *Erlíquia chaffeensis*, e não relatada entre *A.phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* e *Bartonella sp* ou *Rickettsia rickettsii*. A proteína de membrana de superfície externa imunodominante, a 44 – kDa ou também

chamada de p44, existente no *Anaplasma phagocytophilum*, é utilizada no ensaio *Western immunoblotting*, e tem sido identificada como marcador consistente para soroconversão para o agente, com mínima reação cruzada com *Erliquia sp* e outras espécies de anaplasma.

Avaliando os resultados apresentados pelos testes sorológicos para diagnóstico de *Anaplasma phagocytophilum*, neste estudo, pode-se afirmar que existe a necessidade de desenvolvimento de novas provas sorológicas, visando a diminuição dessas reações cruzadas, possivelmente utilizando proteínas imunodominantes específicas de cada agente, ou mesmo com a utilização de outras técnicas diagnósticas, visando a identificação do agente, como na reação em cadeia polimerase, técnica esta que vem sendo amplamente utilizada para diagnóstico de diferentes enfermidades, como exemplo da babesiose e anaplasmoses.

O DNA do agente *Anaplasma phagocytophilum*, não foi detectado na prova de *Nested PCR*, do estudo realizado em 250 amostras de sangue equino, portanto, não houve a amplificação do DNA do agente na reação, havendo somente a amplificação do DNA da amostra utilizada como controle positivo, que apresentou banda correspondente a de 546pb** (MASSUNG et al., 1998), mostrando que as amostras testadas não possuíam o DNA de *Anaplasma phagocytophilum* naquele momento.

Como já descrito na literatura, a coexistência de anaplasmoses e babesioses é um fato importante em saúde pública e animal, relatado em humanos (SZPAKOWICZ et al., 2004), em rebanhos bovinos (CRINGOLI et al., 2002) e em canídeos por TRAPP et al. em 2006.

Nesta pesquisa não foi possível a observação de animais com babesiose (por *Theileria equi*) e Anaplasmoses (por *Anaplasma phagocytophilum*) concomitantemente, o que mostra a necessidade de aumentar o número de amostras e que estas sejam colhidas em outras regiões do território brasileiro, no qual existam condições climáticas diferenciadas, que possam facilitar a proliferação dos vetores, e consequentemente a distribuição das doenças envolvidas.

** pb: pares de base

8 CONCLUSÕES

Nas amostras testadas para *Theileria equi* não houve correlação entre os resultados obtidos pelas três diferentes técnicas.

A ocorrência de mais amostras positivas na microscopia quando comparado a *Nested* PCR pode ser indicativo de falha na microscopia devido a artefato de técnica.

O teste de ELISA indireto para *Anaplasma phagocytophilum* mostrou a possibilidade de reação cruzada com outros agentes da mesma Família Eritríquia.

Nas amostras testadas não foi observada co-infecção de babesia e anaplasma.

REFERENCIAS

- BATTSETSEG, B.; LUCERO, S.; XUAN, X.; CLAVERIA, F.G.; INOUE, N.; ALHASSAN, A.; KANNO T.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; MIKAMI, T.; FUJISAKI, K. Detection of natural infection of *Boophilus microplus* with *Babesia equi* and *Babesia caballi* in Brazilian horses using nested polymerase chain reaction. **Veterinary Parasitology**. v.107, p. 351 –357, 2002.
- BARBOSA, I. P.; BOSE, R.; PEYMANN, B.; FRIEDHOFF, K. T. Epidemiological aspects of equine babesioses in a herd of horses in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.58, p. 1-8, 1995.
- BARCELOS, K. M. C.; FERRÃO, C. M.; RODRIGUES, T. N. G. Erliquiose granulocítica em potro (Relato de caso). **Revista Equina**. v. 2. n. 3. p.18 - 22. 2006.
- BARLOUGH, J. E.; MADIGAN, J. E.; DeROCK, E.; BIGORNIA, L. Nested polymerase chain reaction for detection of *Ehrlichia equi* genomic DNA in horses and ticks (*Ixodes pacificus*). **Veterinary Parasitology**. v.63, p.319-329. 1996.
- BARLOUGH, J. E.; RIKIHISA, Y. MADIGAN, J. E. Nested polymerase chain reaction for detection of *Ehrlichia risticii* genomic DNA in infected horses. **Veterinary Parasitology**. v.68. p. 367-373, 1997.
- BARLOUGH, J. E.; MADIGAN, J. E.; DeROCK, E.; DUMLER, J. S.; BAKKEN, J. Protection against *Ehrlichia equi* Is conferred by Prior Infection with the human Granulocytotropic erlichia (HGE Agent). **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.12, p.3333 – 3334, 1995.
- BARROS, S. L.; MADRUGA, C. R.; ARAUJO, F. R.; MENK, C. F.; ALMEIDA, M. A. O.; MELO, E. P. S.; KESSLER, R. H. Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the semi-arid region of the state of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assays. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v.100, n.6. p. 613 – 617, 2005.
- BASHIRUDDIN, J .B.; CAMMA, C.; REBELO, E. Molecular detection of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horse blood by PCR amplification of part of the 16S rRNA gene. **Veterinary Parasitology** v.84, p. 75 – 83, 1999.
- BERMANN, F.; DAVOUST, B.; FOURNIER, P. E.; BRISOU-LAPOINTE, A. V.; BROUQUI, P. *Ehrlichia equi* (*Anaplasma phagocytophila*) infection in a an adult horse in France. **Veterinary Record**. v. 22, p.787 – 8, 2002.
- BISWAS, B.; MUSKHERJEE, D.; MATTINGLY-NAPIER, B. L.; DUTTA, S. K. Diagnostic application of Polymerase chain reaction for detection of *Ehrlichia risticii* in Equine Monocytic (Potomac horse fever). **Journal of Clinical Microbiology**. v.10. p.2228 – 2233, 1991.

BIRGEL, E. H.; LARSSON, M. H. M. A.; HAGIWARA, M. K.; VASCONCELLOS, S. A.; LARSSON, C. E.; OGASSAWARA, S.; BENESI, F. J. **Patologia Clínica Veterinária**. SPMV. São Paulo. p.21. 1982

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

BREITSCHWERDT, E. Questions related to interpretation of the IDEXX SNAP 4DX®. [2007]. Disponível em <http://www.cvm.ncsu.edu/vth/documents/interpretation_SNAP_4DX_1_07.pdf> Acesso em 15 set. 2009.

BULLA, C. **Contagem de plaquetas como um teste de triagem para diagnóstico da infecção por *Ehrlichia canis***. 2003. 52 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

BUTLER, C. M.; NIJHOF, A. M.; JONGEJAN, F.; VAN DER KOLK, J. H. *Anaplasma phagocytophilum* infection in horses in the Netherlands. **The Veterinary Record**, v.162, p.216 – 218, 2008.

CHANDRASHEKAR, R.; DANILUK, D.; MOFFITT, S.; LORENTZEN, L.; WILLIS, J. Serologic diagnosis of equine borreliosis: Evaluation of an In-clinic Enzyme-Linked Immunosorbent assay (SNAP® 4DX®). **Internnacional Journal Research Veterinary Medicine**, v..6, n. 3, p.145 –150, 2008.

CNA. Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. Disponível em <<http://www.cna.org.br/cna/index.wsp>>. Acesso em 08 mar 2007.

CRINGOLI, G.; OTRANTO, D.; TESTINI, G.; BUONO, D.; Di GIULIO, G.; TRAVERSA, D.; LIA, R.; RINALDI, L.; VENEZIANO, V.; PUCCINI, V. Epidemiology of bovine tick-borne diseases in southern Italy. **Veterinary Research**. v. 33, n.4, p.421-428, 2002.

COHN, L. A. Ehrlichiosis and related infections. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v.. 33, n. 4, p. 863-884, 2003

DAGNONE, A. S.; MORAIS, H. S. A.; VIDOTTO, O. Erliquiose nos animais e no homem. (Animal and human ehrlichiosis). **Semina: Ciências agrárias**, Londrina, v.22,n.2, p.191-201,.2001.

FARIAS, N. A. Babesiose eqüina. In: RIET-CORREA, F; SCHILD, A. L.; MENDEZ, M. D. C.; LEMOS, R. A. A. **Doenças de Ruminantes e eqüinos** . São Paulo: Livraria Varela, v..2, p.42-47, 2001.

FRANZÉN, P.; BERG, A-L.; ASPAN, A.; GUNNARSSON, A.; PRINGLE, J. Death of a horse infected experimentally with *Anaplasma phagocytophilum*. **Veterinary Record**, v.160, 122-125, 2007

FRANZÉN, P.; ASPAN, A.; ENGENVALL, A.; GUNNARSSON, A.; BERG, A-L PRINGLE, J. Acute clinical, hematologic, serologic and polymerase chain reaction finding in horses experimentally infected with a European strain of *Anaplasma phagocytophilum*. **Journal Veterinary Internal Medicine**. v.19: p. 232-239. 2005.

FRIEDHOFF, K. T. Transmission of Babesia. In: **Babesiose in domestics animals and man**. Boca Raton. Florida: C.R.C Press. 1988. p. 23 – 52.

GREIG, B.; ARMSTRONG, P. J. Canine granulocytotropic anaplasmosis (*A.phagocytophilum* infection). In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3.ed. – Saunders Elsevier. 2006, p. 222.

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

HILTON, H.; MADIGAN, J. E.; ALEMAN, M.; Rhabdomyolysis associated *Anaplasma phagocytophilum* infection in a horse. **Journal Veterinary Internal Medicine**. v.22, p. 1061 – 1064, 2008.

IDEXX Laboratories. 2009. Disponível em <<http://www.idexx.com/production/elisa/>> . Acesso em 14 fev. 2009.

INOKUMA, H.; FUJI, K.; OKUDA, M.; ONISHI, T.; BEAUFILS, J. P.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Determination of the nucleotide sequences of heat shock operon groESL and the citrate synthase gene (gltA) of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* for phylogenetic and diagnostic studies. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunologic**. v.9, n.5, p.1132-1136, 2002.

KARATEPE, B.; KARATEPE, M.; CAKMAK, A.; KARAER, Z.; ERGUN, G. Investigation of seroprevalence of *Theileria equi* e *Babesia caballi* in horses in Nigde province, Turkey. **Tropical Animals Health Production**, v. 41, p. 109 – 113, 2009.

KERBER.C.E. **Babesiose ou Piroplamose dos eqüinos**. 2005. Disponível em: <http://www.bichoonline.com.br/artigos/Xck0001.html> >. Acesso em 14 fev. 2009.

LNIV. **Laboratório Nacional de Investigação Veterinária**. 2006. Disponível em <http://www.lniv.min-agricultura.pt/PresentationLayer/lniv_conteudoAgregador.aspx?itemMenu=160&menuID=160> . Acesso em 14 fev. 2009.

MADIGAN, J. E.; PUSTERLA, N. Ehrlichial diseases. **Veterinary Clinics of North America (Emerging infectious diseases)**. v.16. n. 3. p.487-499. 2000.

MASSUNG, R. F.; SLATER, K; OWNES, J.; NICHOLSON, W. L; MATHER, T. N.; SOLBERG, V. B; OLSON, J. G. Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n.4. p.1090–1095, 1998.

MERCK VETERINARY EDITION. 2003. Disponível em: <http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp>>. Acesso em 04 jan. 2007.

MUNDIM, E. C. S.; FRANCISCO, M. M. S.; SOUZA, J. N.; ALENCAR, M. A. G.; RAMALHO, P. C. D. Incidência de hemoparasitoses em cães (*Canis familiares*) capturados em rua pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da cidade de Anápolis – GO. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**. V.11, n.2. 2008.

MUTANI, A.; KAMINJOLO, J. S. The value of in vitro cell culture of granulocytes in the detection of Ehrlichia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.34. n.4, Uberaba. July/ Aug. 2001. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822001000400012> Acesso em 25 fev. 2007.

NAGORE, D.; GARCIA-SANMARTIN, J.; GARCIA-PEREZ, A. L.; JUSTE, R. A.; HURTADO, A. Detection and identification of equine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blotting: epidemiological survey and phylogenetic analysis. **Veterinary Parasitology**, v.123, p. 41-54, 2004.

NICOLAIEWSKY, T. B.; RICHTER, M. F.; LUNGE, V. R.; CUNHA, C. W.; DELAGOSTIN, O.; IKUTA, N.; OZAKI, L. S. Detection of *Babesia equi* (Laveran, 1901) by nested polymerase chain reaction. **Veterinary Parasitology**, v.101, p. 9-21. 2001.

NYINDO, M. C. A.; RISTIC, M.; LEWIS Jr., G. E. Immune responses of ponies to experimental infection with *Ehrlichia equi*. **American Journal Veterinary Research**. v.39, n.1, p.15-18, 1978.

OIE. Organização Internacional de epizootias. Institute for International Cooperation in Animal Biologics – The Center for food Security & Public Health. – Ehrlichiosis. 2006. Disponível em: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/ehrlichiosis.pdf>> Acesso em 19 dez 2006.

PASSAMONTI, F.; VERONESI, F.; CAPPELLI, K.; CAPOMACCIO, S.; COPOLA, G.; MARE, ZONI, M. L.; PIERGILI, D. F.; VERINI, A. S.; COLETTI, M. *Anaplasma phagocytophilum* in horses and ticks: a preliminary survey of Central Italy. **Comparative Immunology Microbiology Infectious Diseases**, 2008. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6T5H-4TGPB60-2-3&_cdi=5003&_user=5674931&_orig=search&_coverDate=09%2F20%2F2008&_sk=999999999&_view=c&_wchp=dGLbVzb-zSkzk&md5=665c4065a4c040189cece1cedd641072&ie=/sdarticle.pdf> Acesso 02 ago 2008.

PIOTTO, M. A. Comparação da Técnica de ELISA competitivo com outras metodologias para diagnóstico das Babesioses equinas. 2006. 21f. Monografia. Especialização em Patologia Clínica Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, “Julio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, Botucatu.

PHIPPS, L. P.; OTHER, A. Transplacental transmission of *Theileria equi* in two foals born and reared in the United Kingdom. **Veterinary Record**, v. 154, n. 17, p. 406-408, 2004.

PUSTERLA, N.; JOHNSON, E.; CHAE, J.; PUSTERLA, J. B.; DeROCK, E. MADIGAN, J. E. Infection rate of *Ehrlichia risticii*, the agent of Potomac horse fever, in freshwater stream snails (*Juga yrekaensis*) from northern California. **Veterinary Parasitology**. v.92. p. 151-156. 2000a.

REUBEL, G. H.; BARLOUGH, J. E.; MADIGAN, J. E. Production and Characterization of *Ehrlichia risticii*, the Agent of Potomac Horse Fever, from Snails (Pleuroceridae: *Juga* spp.) in Aquarium Culture and Genetic Comparison to Equine Strains. **Journal of Clinical Microbiology**. v.36, n.6, p. 1501–1511.1998a.

REUBEL, G. H.; KIMSEY, R. B.; BARLOUGH, J. E.; MADIGAN, J. Experimental transmission of *Ehrlichia equi* to horses through naturally infected ticks (*Ixodes pacificus*) from Northern California. **Journal of Clinical Microbiology**., v. 36, n.7, p. 2131- 2134. 1998b

ROCHE. Introdução à PCR. Disponível em:
<<http://www.roche.pt/portugal/index.cfm/produtos/equipamentos-de-diagnostico/products/molecular-diag/intro-pcr/>>
Acesso em 17 set 2009.

RIKIHISA, Y. Doenças causadas por Riquetsias. In: REED, S. M.; BAYLY, W. M. **Medicina Interna Equina**. Ed. Guanabara. Rio de Janeiro. 2000. p.96 – 106.

RONCATI, N. V. Ocorrência de *Theileria equi* congênita em potros Puro Sangue Lusitano no Brasil, diagnosticada através da técnica de RT – PCR. 2006. 69f. (Tese) Doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo.

STUEN, S. *Anaplasma phagocytophilum* – the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. **Veterinary Research Communications**, v.31, p. 79 – 84, 2007. Supplement 1º

SZPAKOWICZ T. H; SKOTARCZAK, B.; KONDRUSIK, M.; RYMASZEWSKA, A.; SAWCZUK, M.; MACIEJEWSKZ, A.; ADAMSKA, M.; PANCEWICZ, S.; ZAJKOWSKA, J. Detecting of *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia* in the blood of patients suspected of Lyme disease. **Annals of Agricultural Environmental Medicine**, v.11, 351 –354, 2004.

TEGLAS, M.; MATERN, E.; LEIN, S.; FOLEY, P.; MAHAN, S.M.; FOLEY, J. Ticks an tick-borne disease in Guatemalan cattle and horses. **Veterinary Parasitology**. v.131 p. 119 – 127, 2005.

TRAPP, S. M.; DAGNONE, A. S.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R. L.; AMUDE, A. M.; AUTRAN DE MORAIS, H. S. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Veterinary Parasitology** v.140, p.223 – 230, 2006.

TORINA ,A.; ALONGI, A.; NARANJO, V.; SCIMECA, S.; NICOSIA, S.; Di MARCO, V.; CARACAPPA, S.; KOCAN, K. M.; De la FUENTE, J. Characterization of Anaplasma Infections in Sicily, Italy. **Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Annals New York Academic Science**. v.1149, p. 90-93, 2008.

WALL, D. T. Equine piroplasmosis: a review. **British Veterinary Journal**. v.148, p.06 - 14. 1992.

XUAN, X.; CAHHAN, B.; HUANG, X.; YOKOYAMA, N.; MAKALA, L. H.; IGARASHI, I.; FUJISAKI, K.; MARUYAMA, S.; SAKAI, T.; MIKAMI, T. Diagnosis of equine piroplasmosis in Xinjiang province of china by the enzyme-linked immunosorbent assays using recombinant antigens. **Veterinary Parasitology**, v. 108, p.179-182. 2002.

Apêndice A - Resultados individuais obtidos através das técnicas de Pesquisa de hemoparasitas, ELISA competitivo ou indireto e *Nested* PCR de amostras de sangue equino, do Estado de São Paulo, 2009

Amostra	Pesquisa de hemoparasitas		ELISA		Nested PCR	
	<i>T.equi</i>	<i>A.phagoc.</i>	competitivo	indireto	<i>T.equi</i>	<i>A.phagoc.</i>
			<i>T.equi</i>	<i>A.phagoc.</i>		
1	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
2	positivo	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo
3	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
4	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
5	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
6	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
7	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
8	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
9	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
10	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
11	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
12	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
13	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
14	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
15	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
16	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
17	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
18	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
19	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
20	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
21	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
22	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
23	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
24	positivo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo
25	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
26	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
27	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
28	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
29	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
30	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
31	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
32	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
33	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
34	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
35	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
36	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
37	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
38	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
39	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
40	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
41	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
42	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
43	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
44	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo

Amostra	Pesquisa de hemoparasitas		ELISA		Nested PCR	
	<i>T.equi</i>	<i>A.phagoc</i>	competitivo	indireto	<i>T.equi</i>	<i>A.phagoc.</i>
			<i>T.equi</i>	<i>A.phagoc.</i>		
45	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
46	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
47	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
48	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
49	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
50	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
51	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
52	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
53	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo
54	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo
55	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo
56	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
57	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
58	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
59	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
60	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
61	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
62	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
63	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
64	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
65	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
66	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
67	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
68	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo
69	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo
70	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
71	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
72	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
73	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
74	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
75	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
76	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
77	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
78	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
79	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
80	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
81	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo
82	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
83	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
84	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
85	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
86	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
87	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
88	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
89	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
90	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
91	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo

Amostra	Pesquisa de hemoparasitas		ELISA		Nested PCR	
	<i>T.equi</i>	<i>A.phagoc.</i>	competitivo	indireto	<i>T.equi</i>	<i>A.phagoc.</i>
			<i>T.equi</i>	<i>A.phagoc.</i>		
92	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
93	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
94	positivo	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo
95	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
96	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
97	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
98	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
99	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
100	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
101	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo
102	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
103	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
104	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
105	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
106	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
107	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
108	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
109	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
110	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
111	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo
112	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
113	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
114	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo
115	positivo	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo
116	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
117	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
118	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
119	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo
120	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
121	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
122	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
123	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
124	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
125	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
126	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
127	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
128	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
129	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
130	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
131	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
132	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
133	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
134	positivo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo
135	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
136	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo
137	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
138	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo

Amostra	Pesquisa de hemoparasitas		ELISA		Nested PCR	
	<i>T.equi</i>	<i>A.phagoc.</i>	competitivo	indireto	<i>T.equi</i>	<i>A.phagoc.</i>
			<i>T.equi</i>	<i>A.phagoc.</i>		
139	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
140	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
141	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
142	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
143	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo
144	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo
145	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
146	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
147	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
148	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
149	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
150	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
151	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
152	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
153	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
154	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
155	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
156	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
157	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
158	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
159	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo
160	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
161	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
162	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
163	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
164	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
165	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
166	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
167	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
168	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
169	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
170	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
171	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
172	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
173	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
174	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
175	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
176	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
177	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
178	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
179	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
180	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
181	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
182	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
183	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
184	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
185	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo

Amostra	Pesquisa de hemoparasitas		ELISA		Nested PCR	
	<i>T.equi</i>	<i>A.phagoc.</i>	competitivo	indireto	<i>T.equi</i>	<i>A.phagoc.</i>
			<i>T.equi</i>	<i>A.phagoc.</i>		
186	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
187	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
188	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
189	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
190	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
191	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
192	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
193	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
194	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
195	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
196	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
197	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
198	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
199	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
200	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
201	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
202	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
203	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
204	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
205	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
206	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
207	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
208	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
209	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
210	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
211	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
212	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
213	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
214	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
215	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
216	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
217	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
218	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
219	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
220	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
221	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
222	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
223	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
224	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
225	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
226	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo
227	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
228	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
229	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
230	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
231	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
232	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo

Amostra	Pesquisa de hemoparasitas		ELISA		Nested PCR	
	<i>T.equi</i>	<i>A.phagoc.</i>	competitivo	indireto	<i>T.equi</i>	<i>A.phagoc.</i>
			<i>T.equi</i>	<i>A.phagoc.</i>		
233	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
234	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
235	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
236	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
237	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
238	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
239	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
240	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
241	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
242	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
243	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
244	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
245	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
197	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
246	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
247	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
248	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
249	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
250	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo

Anexo A - Protocolo de PCR e *Nested* PCR utilizado para diagnóstico de *Anaplasma platys* descrito por INOKUMA (2002) conforme descrito a seguir:

A - Protocolo de reação de amplificação de *Ehrlichia canis* (PCR e *Nested* PCR)

Os protocolos de reação de amplificação para realização da PCR e *Nested* PCR para *Anaplasma platys* foram realizadas em volume total de 25,0 µl, sendo utilizados 1,0 µl de cada amostra de DNA para reação de PCR e 1,0 µl de DNA amplificado para reação de *Nested* PCR segundo descrição no quadro a seguir:

Reagentes	Quantidades
Água ultrapura	Quantidade suficiente para completar o volume total da reação
Tampão da reação ¹	-
Triton a 0,1%	-
Mgcl ₂	1,75 mM
dNTP	0,2 mM
Primer ^b	1,0 mM
Primer ^c	1,0 mM
<i>Taq</i> DNA polimerase	0,625 U
Volume total	25µl

Quadro 1a: Reagentes utilizados na reação de amplificação para realização da PCR para *A.platys*

^b forward, ^c reverse

Os primer utilizados na reação de amplificação de PCR (primers externos) e *Nested* PCR (primers internos) para *A.platys* estão descritos no quadro abaixo, segundo INOKUMA (2002):

¹ 50mM KCL, 20 mM tris-HCL (pH 8,4)

<i>Primers</i>		
Externos	EHO -F	5'-AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC-3
	EHO -R	5'- CGTATTACCGCGGCTGCTGGC-3`
Internos (produto – 384pb)	APL - F	3'-TTTTTGTCTGGAGCTTGCTATGATA-5
	APL -R	3'-TGTGGGTACCG TCATTATCTTCCCCA-5 '

Quadro 1b: Primers utilizados na reação de amplificação de PCR (primers externos) e *Nested* PCR (primers internos) para *A.platys*

C - Ciclos de amplificação

Os ciclos de amplificação foram realizados no Termociclador *Mastercycler gradiente*, Marca Eppendorf®.

C.1 – PCR (reação em cadeia polimerase) e *Nested* PCR

As condições de amplificação para PCR e para *Nested* PCR para *A.platys* estão descritas num mesmo quadro, por serem iguais, como visto a seguir:

Processo	Número de ciclos	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	1	94°C	10 minutos
Anelamento	40	94°C	1 minuto
		60°C	1 minuto
		72°C	1 minuto
Extensão final	1	72°C	4minutos

Quadro 1c: Condições de amplificação, número de ciclos, temperaturas e tempo, para realização de PCR e *Nested* PCR para *A.platys*.

Anexo B - Protocolo de PCR e *Nested* PCR utilizado para diagnóstico de *Ehrlichia canis* descrito por BULLA (2003), conforme descrito a seguir:

A - Protocolo de reação de amplificação de *Ehrlichia canis* (PCR)

Os protocolos de reação de amplificação para realização da PCR para *Ehrlichia canis* foram realizadas em volume total de 25,0 µl, sendo utilizados 5,0 µl de cada amostra de DNA para reação de PCR segundo descrição no quadro a seguir:

Reagentes	Volumes por amostra
Água ultrapura	7,1 µl
Master Mix ^a	12,5 µl
Primer ^b (EHPS)	0,2 µl
Primer ^c (EHPAS)	0,2 µl
Volume total	20,0 µl de mix

Quadro 1a: Reagentes utilizados na reação de amplificação para realização da PCR para *Ehrlichia canis*

^b forward, ^c reverse

B - Protocolo de reação de amplificação de *Ehrlichia canis* (Nested PCR)

Os protocolos de reação de amplificação para realização da *Nested* PCR para *Ehrlichia canis* foram realizadas em volume total de 25,0 µl, sendo utilizados 1,0 µl de cada amostra de DNA amplificada para reação de *Nested* PCR segundo descrição no quadro a seguir:

Reagentes	Volumes por amostra
Água ultrapura	11,1 µl
Master Mix ^a	12,5 µl
Primer ^b (EHPS)	0,2 µl
Primer ^c (EHPAS)	0,2 µl
Volume total	24,0 µl de mix

Quadro 1b: Reagentes utilizados na reação de amplificação para realização da PCR para *Ehrlichia canis*

^b forward, ^c reverse

^a Master Mix: Go Taq® Green Master Mix – Marca: Promega

Os primers utilizados na reação de amplificação de PCR (primers externos) e *Nested* PCR (primers internos) para *Ehrlichia canis* estão descritos no quadro abaixo, segundo BULLA (2003):

Primers*		
Externos (produto – 478pb)	ECG	5'-AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC-3'
	ECB	5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGCTGGC-3'
Internos (produto –389pb)	HE-E	5'-TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT-3'
	ECA	5'-CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGAA-3'

Quadro 1c: Primers utilizados na reação de amplificação de PCR (primers externos) e *Nested* PCR (primers internos) para *Ehrlichia canis*

C - Ciclos de amplificação

Os ciclos de amplificação foram realizados no Termociclador *Mastercycler gradiente*, Marca Eppendorf®.

C.1 – PCR (reação em cadeia polimerase) e *Nested* PCR

As condições de amplificação para PCR e para *Nested* PCR para *Ehrlichia canis* estão descritas num mesmo quadro, por serem iguais, como visto a seguir:

Processo	Número de ciclos	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	1	94°C	5 minutos
Anelamento	40	94°C	1 minuto
		60°C	1 minuto
		72°C	1 minuto
Extensão final	1	72°C	5 minutos

Quadro 1d: Condições de amplificação, número de ciclos, temperaturas e tempo, para realização de PCR e *Nested* PCR para *Ehrlichia canis*