MARISE ANDRI PIOTTO

Determinação da infecção por *Theileria equi* e *Babesia caballi* em equinos alojados no Jockey Clube de São Paulo por meio da técnica de C-ELISA (Competitive Enzyme Lynked Immunosorbent Assay)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre 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.2201
FMVZ

Piotto, Marise Andri

Determinação da infecção por *Theileria equi* e *Babesia caballi* em equinos alojados no Jockey Clube de São Paulo por meio de técnica de C-ELISA / Marise Andri Piotto. – 2009.

63 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - 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. *Theileria equi*. 2. *Babesia caballi*. 3. Piroplasmose equina.
4. Sorologia. 5. ELISA competitivo. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Determinação da prevalência de infecção por *Theileria equi* e *Babesia caballi* em eqüinos puro sangue inglês alojados no Jôquei Clube de São Paulo, através da técnica de C.Elisa (competitive Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)", protocolado sob o nº 1698/2009, 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 19 de agosto de 2009.

We certify that the Research "Determination of prevalency of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infection in horses of Jockey Club of São paulo by competitive enzyme linked immuno sorbrent assay", protocol number 1698/2009, 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 Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 08/19/09.

São Paulo, 24 de agosto de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: PIOTTO, Marise Andri

Título: Determinação da infecção por *Theileria equi* e *Babesia caballi* em equinos alojados no Jockey Clube de São Paulo por meio da técnica de C-ELISA Competitive Enzyme Lynked Immunosorbent Assay)

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

Data: ____ / ____ / ____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura _____ Jungamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura _____ Jungamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura _____ Jungamento: _____

*Ofereço esta conquista a minha filha **Mariana Andri Piotto**.*

Uma criança tão maravilhosa, tão tranquila, permitiu que eu conseguisse trabalhar e estudar durante todo esse projeto. Você é a razão para eu viver. Amo você mais do que qualquer coisa nesse mundo. Minha princesinha, minha paçoquinha, meu pedacinho de gente...

*Dedico esta conquista ao meu marido **Silvio Batista Piotto Júnior**.*

Persistente por natureza estive ao meu lado em quase todas as minhas conquistas, sendo que muitas delas eu jamais teria conseguido sem ele.

Sua força de vontade e perseverança fazem com que arregace as mangas e trabalhe mais que qualquer pessoa que eu jamais tenha conhecido e assim alcance seus objetivos. As pedras no caminho servem para alertar, passar por cima e andar para frente. Os erros servem para ensinar a não mais cometê-los.

Minhas conquistas pessoais e profissionais sempre contaram com seu apoio, e essa em especial só ocorreu devido ao seu incentivo, à sua insistência e porque você deseja sempre o melhor para mim.

Obrigado por você existir, por fazer parte da minha vida e por ter me dado uma família tão maravilhosa, uma filha sensacional. Obrigada por seu amor indiscutível.

Agradecimentos

Meus agradecimentos vão àqueles que traçaram meu caminho para que eu chegasse até aqui. Mesmo que não tenham contribuído diretamente para este projeto essas pessoas maravilhosas contribuíram para minha vida e não existem palavras suficientes para expressar a minha gratidão.

*Agradeço ao meu pai **Massimiliano** (“**Nonno Max**”) e minha mãe **Maria Matilde** (“**Nonna Matilde**”) por terem sido a essência mais pura do amor e da dedicação pelos filhos, procurando, da melhor maneira em que conseguiram, oferecer formação pessoal e profissional. Obrigada mãe e pai por continuarem me incentivando profissionalmente e ajudando nos meus momentos de necessidade atendendo sempre, sempre e sempre aos meus chamados. Amo vocês exatamente como são.*

*Agradeço aos meus irmãos **Eliane** (“**Nane**”), **Viviane** (“**Vivi**”) e **Marco** (“**Marquito**”) pelo apoio em todos os momentos da minha vida tão privilegiada de caçula, desde a infância até a maternidade. Obrigada “Tia Nane” pela paciência de brincar horas a fio com a Mariana, por ficar conversando comigo até eu dormir, por querer sempre unir nossa família nas festas de fim de ano e por me ajudar a organizar minha desorganização. Obrigada “Tia Vivi” e meu cunhadinho **Éden** por terem nos trazido a **Luísa** (“**Lulu**”) essa afilhada maravilhosa que eu amo tanto, pelas longas conversas ao telefone e pelas milhares de consultas 24 horas, (gratuitas!) da Mariana. Obrigada “Marquito” por ser amigo e também colega, por ter nos presenteado junto a **Silvia** (“**Silvinha**”) com o **Pedro** (a maior prova da existência de Deus) e o **Lucas**, meus sobrinhos lindos dos quais tenho muito orgulho. Sua luta diária é infinita e sua perseverança é inspiradora.*

*Agradeço ao meu sogro **Silvio Piotto** (“**Vovô**”) e minha sogra **Dilce** (“**Vovó - in memorian**”), minhas cunhadas **Ângela** (“**Tia Gê**”) e **Sandra** (“**Dinda**”) e minha querida sobrinha **Manoela** (“**Manô**”) por terem me aceitado nesta família tão unida e por todo o carinho ainda que a distância não nos proporcione o convívio diário. Sinto muito a sua falta Vovó, seus telefonemas e nossas conversas à mesa, desejo que Deus esteja ao seu lado e que minha memória permita que eu jamais me esqueça de você.*

*Agradeço a minha amiga querida **Ana Paula Conink Mafra** (“**Aninha**”) pela nossa trajetória na graduação e pela perseverança de manter contato apesar de estarmos distantes. Saiba que sempre me lembro de você e desejo que nossas vidas possam se aproximar novamente. Seus e-mails me trazem alegria e esperança.*

*Agradeço imensamente a minha “família paulistana” **Salvador**, **Patrícia**, **Gabriel** e **Júlia Urtado**, por terem me auxiliado profissionalmente em um momento tão decisivo da minha vida. Por nossa amizade, nossos encontros, por nossas viagens que proporcionam dias tão agradáveis com as crianças brincando juntas, por me ajudar nas dificuldades e por me incentivarem. Escolhi vocês para serem padrinhos da minha filha porque os amo como se fossem minha própria família. Obrigada mesmo por vocês existirem.*

Agradeço especialmente ao **Dr. Benedicto De Martin** por ter gentilmente feito a carta de referência para meu mestrado e por ter me aceitado no IVI (Instituto Veterinário de Imagem) e a **todos** os colegas do laboratório, sobretudo à **Dra. Tomie M. Cirillo**, a **Dra. Danielle Nobre** e a querida **Tereza**, pelo carinho e ensinamentos. Não posso deixar novamente de agradecer a **Patrícia** e ao **Salvador** e por esta porta ter se aberto para mim.

Ao meu estimado professor Universidade Federal do Paraná **Prof. Dr. Antônio Felipe Paulino de Figueiredo Wouk**, por quem tenho incalculável admiração e respeito, agradeço por ter me ajudado a conseguir minha primeira oportunidade junto à Universidade de São Paulo através de meu estágio curricular, onde conheci esta grandiosa instituição da qual faço parte agora como mestranda. Agradeço também por ter gentilmente feito a carta de referência para meu mestrado.

Agradeço ao **Prof. Dr. Paulo Ciarlini** (UNESP Jaboticabal) por ter me orientado em minha monografia para conclusão do curso de especialização em Patologia Clínica pela UNESP de Botucatu e pelo convite para orientação de mestrado naquela universidade. Apesar da distância não ter permitido que eu aceitasse o convite espero que fique feliz por eu estar realizando essa importante etapa na Universidade de São Paulo. Muito obrigada por seu apoio.

Agradeço à **Prof.^a. Dr.^a. Regina Takahira** (UNESP Botucatu) por ter gentilmente feito a carta de referência para meu mestrado e por ser essa criatura iluminada, adorável, inteligentíssima, dona de uma didática magnetizadora e sempre disposta a nos ajudar. Obrigada por tudo que você me ensinou.

À **Prof.^a. Dr.^a. Mitika Kuribayashi Hagiwara**, por sua infinita vitalidade como educadora, seu apoio, seus esclarecimentos e sua enorme contribuição para o aprendizado não só da Patologia Clínica Veterinária, mas também nos tornando críticos capazes de observar muito mais além.

Agradeço especialmente ao meu querido orientador **Prof. Dr. Wilson Roberto Fernandes**, por ter aceitado me orientar nesse projeto e por ter confiado em meu trabalho mesmo com minhas ausências. Por ter aceitado e compreendido meus momentos de trabalho árduo e madrugueiro no surto do MORMO em São Paulo, quando desapareci da Universidade. Muito obrigada Professor por essa oportunidade única, por sua compreensão e por sua amizade. Peço desculpas por qualquer inconveniente, espero não tê-lo desapontado e desejo poder sempre atender às suas expectativas.

Agradeço ao **Prof. Dr. Neimar Vanderlei Roncati**, por sua confiança em meus resultados, por sua competência na interpretação sorológica desta afecção, seu conhecimento prático desta doença e por me auxiliar nas minhas dúvidas, sempre respondendo prontamente aos meus e-mails. Muito obrigada Dr. Neimar, acho que mais que um excelente Médico Veterinário eu o considero como um amigo.

Agradeço a pós-graduanda **Valéria Marinho C. de Oliveira** por ser minha colega e companheira nas disciplinas. Sendo sempre sorridente, prestativa e paciente, me ensinou que a persistência e a humildade para aprender sempre são valores imprescindíveis para alcançar o conhecimento e o sucesso.

Agradeço a pós-graduanda **Andréa Parra** por ser tão prestativa e atenciosa, por ajudar não só a mim, mas a tantos colegas mesmo quando seu próprio tempo estava tão apertado. Você foi tão fundamental nesta caminhada que certamente, por ser tão generosa, não é capaz de mensurar. Meu projeto aconteceu graças ao seu projeto, portanto, gostaria de lhe agradecer de maneira especial por ter me proporcionado não só a oportunidade de realizar esta etapa profissional, mas também por ter conhecido a pessoa maravilhosa que é você. Espero que possamos perpetuar e fazer crescer esta amizade e saiba que pode contar comigo sempre que precisar. Muito obrigada!

Agradeço a pós-graduanda **Patricia Stocco Betiol** por ter me auxiliado nas pesquisas bibliográficas procurando os trabalhos mais "escondidos" e nas dicas sobre a dissertação.

Agradeço a todos os professores da Universidade de São Paulo e aos colegas pós-graduandos que participaram comigo das disciplinas, trabalhando em equipe, enriquecendo meus conhecimentos e tornando possível finalizar essa etapa.

Agradeço a todos os funcionários da Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São Paulo por sempre serem prestativos no auxílio minhas pesquisas bibliográficas e nas correções necessárias desta dissertação com dedicação e alegria, oferecendo sempre um sorriso amigável. Sei que poderei contar sempre com vocês!

Agradeço ao enfermeiro **José Nascimento** por ter me auxiliado com as coletas intermediando o contato com os treinadores e tornando possível a obtenção das amostras utilizadas neste projeto. Agradeço também aos Treinadores e Médicos Veterinários que autorizaram a coleta das amostras nos equinos alojados em suas cocheiras no Jockey Club de São Paulo.

Agradeço especialmente a colega Médica Veterinária **Priscilla Montoro de Freitas**, amiga, mão direita e esquerda, na qual confio cegamente, competente e ativa, entusiasmada e positiva. Pri, você é tão importante nesse projeto que o está conquistando junto comigo. Obrigada por ter me ajudado com o processamento das amostras diminuindo drasticamente o tempo que levei para realizar a técnica. Obrigada por abraçar minhas responsabilidades em meus desencontros. Obrigada por estar sempre do meu lado diariamente no laboratório ainda que muitas vezes eu não estivesse lá ao seu lado. Obrigada pelas palavras de apoio tentando sempre me mostrar o lado bom das coisas. Gostaria de parabenizar e também agradecer à sua família, seu pai e sua mãe por terem criado você de maneira tão exemplar. Gostaria que soubesse que tenho muito orgulho de sua capacidade e coragem, e que desejo que você seja muito, muito feliz mesmo. Conte comigo sempre, você mora no meu coração!

Agradeço aos meus queridos funcionários do Laboratório Equalli por cuidarem dele enquanto estive trabalhando neste projeto.

Por fim agradeço a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que esse projeto se tornasse possível.

Muito obrigada!

RESUMO

PIOTTO, M. A. **Determinação da infecção por *Theileria equi* e *Babesia caballi* em equinos alojados no Jockey Clube de São Paulo por meio da técnica de C-ELISA (Competitive Enzyme Lynked Immunosorbent Assay).** [Evaluation of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in equines housed at the Jockey Club in São Paulo city using C-ELISA test (Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)] 2009. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Com o objetivo de avaliar os equinos alojados no Jockey Clube de São Paulo, Brasil, quanto a presença de anticorpos contra *Theileria equi* e *Babesia caballi*, foram testadas 180 amostras de soro sanguíneo por meio da técnica de C-ELISA (Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), metodologia atualmente recomendada pela OIE (Organização Internacional de Epizootíases) por ter alta sensibilidade e especificidade. A frequência de animais com sorologia positiva para *Theileria equi* foi de 6,66% (12/180), para *Babesia caballi* foi de 22,3% (40/180) e para infecção concomitante foi de 6,66% (12/180). Os resultados sorológicos obtidos por este estudo revelam que 35,5% (64/180) dos animais possuem anticorpos contra a babesiose equina sendo que a maioria dos animais acometidos tem dois e três anos de idade e portanto estão há menos tempo no hipódromo. Fatores como a ausência de carrapatos vetores, o uso de terapias babesicidas repetidas e o longo tempo de permanência dos animais no Jockey após o tratamento, favorecem a diminuição dos títulos de anticorpos sem que ocorra reinfecção. Esses fatores podem justificar o menor número de animais com sorologia positiva para a doença nos cavalos com idade acima de quatro anos. Considerando-se esses resultados sugere-se que os animais sejam avaliados sorologicamente ao ingressarem no Jockey Clube de São Paulo para que o uso de medicamentos contra a doença seja feito de forma adequada e para que os sinais clínicos compatíveis com babesiose equina em animais sorologicamente negativos sejam melhor avaliados e considerados em diagnósticos diferenciais.

Palavras-chave: *Theileria equi*. *Babesia caballi*. Piroplasmose equina. Sorologia. ELISA Competitivo.

ABSTRACT

PIOTTO, M. A. **Evaluation of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in equines housed at the Jockey Club in São Paulo city using C-ELISA test (Competitive Enzyme Lynked Immunosorbent Assay).** [Determinação da infecção por *Theileria equi* e *Babesia caballi* em equinos alojados no Jóquei Clube de São Paulo por meio da técnica de C-ELISA (Competitive Enzyme Lynked Immunosorbent Assay)] 2009. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

In order to evaluate the presence of antibodies against *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses kept at the Jockey Club in São Paulo city, Brazil, a total of 180 samples of blood serum was tested using the Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (C-ELISA test). This methodology has been recommended by the International Organization of Epizooties (IOE) due to its high sensitivity and specificity. The frequency of seropositive animals for *Theileria equi*, *Babesia caballi* and for both was 6.66% (12/180), 22.3% (40/180) and 6.66% (12/180), respectively. Serological results showed that 35.5% of the animals (64/180) had antibodies against equine piroplasmosis; they were from two to three years old and were at the Jockey Club for a shorter period of time. Factors such as absence of thick vectors, repeated therapy using babesicidal drugs and the long period of time that the animals stayed in the Jockey Club after treatment favoured the lowering of antibody titers with no reinfection. These factors might be responsible for the fewer number of animals with positive serology for the disease in horses over four years of age. Based on these findings, animals should be serologically evaluated at the time of entrance into the Jockey Club so that the use of drugs against the disease be performed properly and clinical signs suggestive of equine babesiosis in serologically negative animals be better evaluated and considered for differential diagnosis.

Keywords: *Theileria equi*. *Babesia caballi*. Equine piroplasmosis. Serology. Competitive ELISA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Babesia caballi</i>	20
Figura 2 - <i>Babesia caballi</i>	20
Figura 3 - Teste de C-ELISA para <i>Theileria equi</i>	34
Figura 4 - Sequência de eventos no teste de C-ELISA em amostras positivas e negativas	36

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Gráfico das porcentagens de animais sorologicamente positivos e negativos para babesiose equina - São Paulo – 2009	38
Gráfico 2 - Gráfico dos resultados sorológicos de <i>Theileria equi</i> e/ou <i>Babesia caballi</i> - São Paulo – 2009	38
Gráfico 3 - Gráfico dos resultados sorológicos positivos para babesiose equina segundo a idade - São Paulo – 2009	39
Gráfico 4 - Gráfico dos resultados sorológicos para babesiose equina nos machos - São Paulo - 2009.....	40
Gráfico 5 - Gráfico dos resultados sorológicos para babesiose equina nas fêmeas - São Paulo – 2009.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos animais positivos para babesiose equina segundo a idade - São Paulo – 2009	39
Tabela 2 - Descrição dos animais positivos para babesiose equina segundo o sexo - São Paulo – 2009	40

LISTA DE ABREVIATURAS

C-ELISA	Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EMA-1	Equine Merozoite Antigen 1
IFI	Imunofluorescência Indireta
IFN- γ	Interferon Gama
kDa	Kilo Daltons
MAb	Monoclonal Antibody
μl	Microlitros
ml	Mililitro
μm	Micrômetros
nm	Nanômetros
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
OIE	Organização Internacional de Epizootíases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PSI	Puro Sangue Inglês
RAP-1	Rhoptry-Associated Protein
RPM	Rotações por Minuto
SCID	Severe Combined Immunodeficiency

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A - Descrição dos animais quanto ao sexo, à idade e resultados sorológicos para <i>Theileria equi</i> e para <i>Babesia caballi</i> – São Paulo – 2009	50
Apêndice B - Números das amostras na sequência de realização dos testes de C-ELISA (Placas 1a, 2a, 3a, 4a), resultados de absorbância obtidos no leitor de placa (Placas 1b, 2b, 3b, 4b) e porcentagem de inibição (Placas 1c, 2c, 3c, 4c) para <i>Theileria equi</i> – São Paulo – 2009	53
Apêndice C - Números das amostras na sequência de realização dos testes de C-ELISA (Placas 1a, 2a, 3a, 4a), resultados de absorbância obtidos no leitor de placa (Placas 1b, 2b, 3b, 4b) e porcentagem de inibição (Placas 1c, 2c, 3c, 4c) para <i>Babesia caballi</i> – São Paulo – 2009	54

LISTA DE ANEXOS

Anexo A - Instruções para a realização da técnica de C-ELISA para <i>Babesia caballi</i> - página 1	55
Anexo B - Instruções para a realização da técnica de C-ELISA para <i>Babesia caballi</i> - página 2	56
Anexo C - Instruções para a realização da técnica de C-ELISA para <i>Babesia caballi</i> - página 3	57
Anexo D - Instruções para a realização da técnica de C-ELISA para <i>Babesia caballi</i> - página 4	58
Anexo E - Instruções para a realização da técnica de C-ELISA para <i>Theileria equi</i> - página 1.....	59
Anexo F - Instruções para a realização da técnica de C-ELISA para <i>Theileria equi</i> - página 2.....	60
Anexo G - Instruções para a realização da técnica de C-ELISA para <i>Theileria equi</i> - página 3.....	61
Anexo H - Instruções para a realização da técnica de C-ELISA para <i>Theileria equi</i> - página 4.....	62
Anexo I - e-mail recebido de Dr. Scott Adams em 20/04/2006.....	63

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
3	OBJETIVOS	32
4	MATERIAL E MÉTODO	33
4.1	OBTENÇÃO E ARMAZENAGEM DAS AMOSTRAS	33
4.2	TÉCNICA DO C-ELISA	33
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
5	RESULTADOS	38
6	DISCUSSÃO	41
7	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS	46
	APÊNDICES	50
	ANEXOS	59

1 INTRODUÇÃO

Há tempos os equinos têm sido utilizados nas mais diversas atividades em todo o mundo, visando auxiliar o homem em seu contexto social, para o trabalho, lazer e atualmente, em sua grande maioria, para a prática esportiva. Para tanto, seu manejo alimentar, seu treinamento físico e sua saúde devem estar plenos.

A babesiose é considerada uma das principais doenças parasitárias em cavalos, sendo que as perdas associadas à infecção estão relacionadas aos fatores clínicos e à restrição ao trânsito internacional de animais soropositivos (FRIEDHOFF; TENTER; MULLER, 1990).

Esta enfermidade é causada pelos protozoários *Theileria equi* (anteriormente denominada *Babesia equi*) e *Babesia caballi*, hemoparasitas transmitidos por carrapatos que acometem equinos, asininos, muares e zebras sendo a única doença parasitária intraeritrocitária dos equinos (CORRÊA; CORRÊA, 1992; REED; BAYLY, 2000).

Estudos epidemiológicos em criações de equinos na América do Sul revelaram elevada infestação pelos carrapatos *Anocentor nitens*, *Boophilus microplus* e *Amblyoma cajennense* associados a altos níveis de babesiose em equinos, sendo o primeiro relacionado à transmissão da *Babesia caballi* e os dois últimos à *Theileria equi* (FORTES, 1997; OLIVEIRA; BORGES, 2005; RONCATI, 2006)

As manifestações clínicas incluem picos febris intermitentes, anorexia nos animais intensamente parasitados, anemia devido à hemólise, petéquias nas mucosas, icterícia, edema em regiões baixas do corpo e cabeça e desconforto abdominal causado pelo depósito de bilirrubina nas serosas do trato gastroentérico (THOMASSIAN, 2005). Na doença crônica a parasitemia é baixa e a principal manifestação é anemia que, ainda que discreta, leva à diminuição do desempenho atlético. Em animais submetidos à imunossupressão seja por restrição alimentar ou uso de corticosteróides, a doença pode ser reagudizada e os equinos podem apresentar diferentes graus de anemia, com agravamento dos sinais clínicos (NOGUEIRA et al., 2005).

Redução do desempenho é a principal queixa associada à babesiose equina, em especial quando se trata de animais de competição (CUNHA et al., 1996;

PEREIRA et al., 2004). Segundo Botteon et al. (2005) essa queixa antecedeu as manifestações clínicas de babesiose sendo que o quadro nem sempre é identificado como um problema que deve ser corretamente diagnosticado e tratado. Na prática corrente do meio equestre, via de regra, os animais são submetidos a tratamentos com drogas babesicidas a qualquer sinal de queda de desempenho, mesmo que o diagnóstico final não tenha sido realizado.

O diagnóstico das babesioses se baseia nos achados clínicos e, sobretudo, nos exames laboratoriais (THOMASSIAN, 2005). Muitos testes diagnósticos para as babesioses equinas estão disponíveis podendo ser diretos, como visualização dos hemopataritas em esfregaços sanguíneos corados e utilização do PCR (Polymerase Chain Reaction), ou indiretos que consistem na mensuração de anticorpos resultantes da resposta imunológica ao parasita sendo que os mais utilizados são a Imunofluorescência Indireta, a Fixação do Complemento e, atualmente, o C-ELISA (Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

O teste de C-ELISA (Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) foi desenvolvido com o objetivo de aprimorar o diagnóstico desta afecção já que as técnicas anteriormente utilizadas apresentam limitações quanto a produção dos reagentes envolvidos e resultados falso negativos em função da menor sensibilidade. Esta técnica oferece aumento da sensibilidade e especificidade necessárias ao diagnóstico desta doença quando comparada às outras técnicas sorológicas (RHALEM et al., 2001).

Utilizando a técnica de C-ELISA para diagnóstico dos animais soropositivos pode-se iniciar o tratamento e medidas de controle, evitando a continuidade da infecção, para que os cavalos possam atingir o máximo de seu potencial atlético. Ao indicar animais soronegativos, o teste auxilia o Médico Veterinário a procurar diagnósticos diferenciais em animais que apresentam sinais clínicos compatíveis com a doença, evitando tratamentos babesicidas desnecessários. Além disso, o animal estará preparado para ser exportado quando atingir o auge de sua carreira esportiva.

Assim, considerando a importância do diagnóstico das babesioses equinas em animais de alto desempenho como cavalos Puro Sangue Inglês que participam de corridas, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar sorologicamente os equinos alojado no Jockey Clube de São Paulo quanto à presença de anticorpos contra *Theileria equi* e *Babesia caballi*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A babesiose equina é uma enfermidade causada pelos protozoários *Theileria equi* (anteriormente denominada *Babesia equi*) e *Babesia caballi*, hemoparasitas intraeritrocitários transmitidos por carrapatos que acometem equinos, asininos, muares e zebras sendo a única doença parasitária intraeritrocitária dos equinos (CORRÊA; CORRÊA, 1992; REED; BAYLY, 2000). Descobertas sobre o ciclo de vida da *Babesia equi*, como a multiplicação em linfócitos para depois invadirem os eritrócitos e ausência de transmissão transovariana nos carrapatos vetores, a tornam diferente das formas clássicas das babesias e, considerando similaridades do parasito com organismos da família *Theileriidae*, este protozoário foi reclassificado como *Theileria equi* (MEHLHORN; SCHEIN, 1998).

A *Babesia caballi* (Figura 1) é uma espécie grande e nos eritrócitos tem um aspecto piriforme unidos pelas extremidades afiladas medindo de 2 a 5 µm de comprimento. A *Theileria equi* é uma espécie pequena com aspecto arredondado, amebóide ou piriforme nos eritrócitos. Quando quatro babesias piriformes estão unidas pelas extremidades afiladas apresentam-se em forma de cruz (FORTES, 1997) como demonstrado na figura 2.

Fonte: PIOTTO, M. A., 2007.
Figura 1 – *Babesia caballi*

Fonte: PIOTTO, M. A., 2007.
Figura 2 – *Theileria equi*

A infecção por esses protozoários é considerada uma das principais afecções parasitárias dos cavalos, sendo que as perdas associadas à doença estão relacionadas não só a fatores clínicos, mas também econômicos, sendo à restrição ao trânsito internacional de animais soropositivos uma delas (FRIEDHOFF; TENTER; MULLER, 1990).

A entrada de equinos em países considerados livres da babesiose, principalmente Estados Unidos e Canadá, requer um rigoroso controle sanitário, pois na maioria destes locais apesar da doença ser considerada exótica, existe o risco de tornar-se endêmica devido à existência de carrapatos vetores (KNOWLES, 1996; IKADAI et al., 2002).

No ano de 2004, a OIE (Organização Internacional de Epizootíases) definiu a utilização da técnica de C-ELISA como teste oficial para exportação de animais para países livres da doença. Essa determinação reduziu em quase 50% as exportações de cavalos brasileiros para aos Estados Unidos de 2005 para 2006, acarretando em perdas econômicas para todos os envolvidos (USA, 2006)

A distribuição destes parasitas é mundial, principalmente em áreas tropicais e subtropicais (NOGUEIRA et al., 2005). A prevalência da babesiose equina tem sido estudada em vários países onde os resultados variam enormemente de acordo com fatores epidemiológicos regionais (CUNHA et al., 1996). No Brasil, ambas as espécies são endêmicas podendo ocorrer de forma isolada ou em infecções mistas. A prevalência é bastante distinta nas diferentes regiões do país, como demonstraram, por exemplo, estudos realizados no Rio de Janeiro e Minas Gerais em que 85 a 100% dos equinos examinados pelo teste de Fixação do Complemento foram portadores de babesiose, enquanto que no Rio Grande do Sul, o percentual de soropositivos variou de 30 a 50%, predominando a *Theileria equi* (PEREIRA et al., 2005).

Pereira et al. em 2004 avaliou equinos Puro Sangue Inglês de pequenos estabelecimentos equestres das regiões sul e sudeste do país encontrando 18% de reações positivas para *Theileria equi*, 6,0% para infecções mistas e 1,5% de para *Babesia caballi* quando testadas pela técnica de fixação do complemento.

Estudos epidemiológicos em criações de equinos na América do Sul revelaram elevada infestação pelos carrapatos *Anocentor nitens*, *Boophilus microplus* e *Amblyoma cajennense* associados a altos níveis de babesiose em equinos, sendo o primeiro relacionado à transmissão da *Babesia caballi* e os dois últimos à *Theileria equi* (FORTES, 1997; OLIVEIRA; BORGES, 2005; RONCATI, 2006).

O *Boophilus microplus* (carrapato do boi) vem sendo considerado um importante transmissor da *Theileria equi* nas criações concomitantes de equinos e bovinos (GUIMARÃES et al., 1998). Esses carrapatos são capazes de se infectar

mesmo em cavalos com baixa parasitemia nos estágios crônicos da doença tendo sucesso em sua transmissão para cavalos livres da babesiose (UETI et al., 2005). Este vetor desenvolve seu ciclo em um único hospedeiro (monóxeno) onde a fase parasitária, que tem duração de 21 dias, inicia com fixação das larvas em um hospedeiro suscetível onde se transformam em ninfas após sete dias, fêmeas adultas aos 15 dias e, aos 21 dias, as fêmeas ingurgitadas caem do hospedeiro e realizam a oviposição podendo chegar a originar 3000 larvas cada. Em temperatura ao redor de 28° C e umidade relativa em torno de 85% a eclosão dos ovos ocorre em aproximadamente 18 dias (PEREIRA et al., 2008).

Em estudos de Ueti et al. (2008) a transmissão transestadial da *Theileria equi* por este carrapato foram confirmadas, entretanto, a transmissão vertical foi rejeitada visto que, apesar de ovos provenientes de fêmeas infectadas apresentarem o protozoário, as larvas eclodidas destes ovos não foram eficazes na transmissão da *Theileria equi* para cavalos susceptíveis. A transmissão transovariana requer a infecção dos ovários, passagem para os ovos na próxima geração e subsequente desenvolvimento de infectividade nas glândulas salivares da progênie e, neste estudo, mesmo com fêmeas de carrapatos alimentando-se em cavalos com alta parasitemia, a progênie foi ineficaz na transmissão da doença.

O *Anocentor nitens* (carrapato de orelha) está amplamente distribuído no Brasil parasitando equinos e outros equídeos. Seu local de preferência é o interior da orelha que frequentemente torna-se repleto de carrapatos em todas as fases, com excrementos e mudas da pele do parasito o que produz um odor desagradável e inflamação local. É também um carrapato de único hospedeiro sobre o qual passa por todas as suas mudas. No ciclo do *Anocentor nitens*, a fêmea ingurgitada destaca-se do hospedeiro e inicia a oviposição podendo gerar de 2000 a 3000 ovos. Após a eclosão as larvas sobem nas hastes das gramíneas e arbustos aguardando a passagem do hospedeiro. Já estando no hospedeiro, após alimentação, transformam-se em ninfas que, por sua vez transformam-se em machos e fêmeas onde, após copulação, a fêmea se ingurgita e desprende-se do hospedeiro, iniciando a postura e um novo ciclo (FORTES, 1997; OLIVEIRA; BORGES, 2005).

Na transmissão da *Babesia caballi*, o carrapato adulto infecta-se mas não transmite a doença, o que será feito pela geração seguinte. A transmissão ocorre de geração a geração pela passagem transovariana, ou seja, do carrapato fêmea aos

seus descendentes, podendo manter-se por até quatro gerações, fazendo deste ácaro um reservatório da doença na natureza (FORTES, 1987).

O *Amblyomma cajennense* é o carrapato do corpo dos cavalos. No Brasil é conhecido como carrapato rodoleiro ou estrela quando adulto, vermelhinho na fase de linfa e micuim na fase larvar. Vários animais domésticos e uma ampla diversidade de espécies silvestres, mamíferos e aves, podem albergar algum estágio parasitário deste carrapato, inclusive o homem. Seu ciclo de vida necessita de três hospedeiros (trioxeno) de espécies iguais ou diferentes para ser completado e todas as mudas ocorrem no solo. Inicia com a queda de uma fêmea ingurgitada que no solo ou em touceiras de capim, inicia sua postura podendo cada fêmea ovipor até 7000 ovos. Os ovos darão origem às larvas que permanecerão em jejum até o encontro de seu primeiro hospedeiro o que pode levar até seis meses. Após a fixação na pele do hospedeiro, as larvas iniciam um repasto de linfa e sangue por cinco dias quando caem novamente ao solo buscando abrigo para realizar a muda ao estágio de ninfa que ocorre em aproximadamente 25 dias. Nesta fase a ninfa procura um novo hospedeiro podendo aguardar em jejum por até um ano. Ao encontrar o segundo hospedeiro a ninfa fixa-se em sua pele e inicia o período de alimentação até tornar-se completamente ingurgitada soltando-se e caindo ao solo para realizar a muda onde emergem machos e fêmeas jovens que estarão aptos a realizar seu terceiro estágio. No ambiente podem permanecer viáveis por até dois anos aguardando o novo hospedeiro e demonstrando enorme resistência aos fatores ambientais (FORTES, 1997; OLIVEIRA; BORGES, 2005).

Neste carrapato não ocorre transmissão transovariana da *Theileria equi*, mas se um ácaro se infectar em uma fase da vida passará esta infecção para as outras fases sendo chamado de transmissão transestadial. Devido ao enorme potencial biótico e das características do ciclo biológico da espécie este carrapato tem sido considerado como uma praga de importância nos rebanhos equinos (OLIVEIRA; BORGES, 2005).

Observações de casos clínicos de babesiose em neonatos sugeriam haver transmissão transplacentária (GUIMARÃES et al., 1954) e Roncati (2006) comprovou a transmissão transplacentária da *Theileria equi* através de exames de PCR em amostras sanguíneas de potros colhidas imediatamente após o nascimento.

O ciclo biológico da *Babesia caballi* envolve apenas os eritrócitos e inicia-se com a inoculação dos esporozoítos pelo carrapato por ocasião de seu repasto nos hospedeiros vertebrados. Os esporozoítos penetram nos eritrócitos do hospedeiro onde se transformam em merozoítos. A multiplicação é por divisão binária e são formados dois merozoítos piriformes, inicialmente unidos e depois separados que, destruindo o eritrócito, ficam livres e penetram em novos eritrócitos. Quando o carrapato ingere os eritrócitos parasitados ocorre formação de esporozoítos nas glândulas salivares destes invertebrados que serão inoculados em um novo hospedeiro (FORTES, 1987; URQUHART et al., 1990).

O ciclo da *Theileria equi* foi descrito por Mehlhorn; Schein, (1998) e possui as fases de esquizogonia, gametogonia e esporogonia.

Na esquizogonia, após inoculação juntamente com a saliva do carrapato os esporozoítos penetram nos linfócitos do hospedeiro vertebrado onde ocorre a formação de macroesquizontes e microesquizontes resultando em aproximadamente 200 merozoítos por célula infectada. Estes merozoítos penetram nos eritrócitos, tornam-se globosos e iniciam a divisão por fissão binária, originando as formas piriformes, que podem agrupar-se em quatro aparecendo sob a forma de Cruz de Malta. Após ruptura do eritrócito os merozoítos entram em novos eritrócitos e iniciam novamente a fase de reprodução assexuada. Algumas destas formas tornam-se ovóides e são considerados gametas.

Na gametogonia após a ingestão dos eritrócitos pelo carrapato, os gametas multiplicam-se e crescem rapidamente e formam microgametas e macrogametas que se fundem formando os zigotos. No interior do zigoto forma-se o cineto que são transportados através da hemolinfa até as glândulas salivares dos carrapatos.

A esporogonia inicia-se com a penetração dos cinetos nas glândulas salivares dos carrapatos dando origem aos esporoblastos e, por fim, os esporozoítos que serão inoculados juntamente com a saliva quando o carrapato iniciar seu repasto MEHLHORN; SCHEIN, (1998).

O período de incubação na babesiose é de cerca de 8 a 10 dias (THOMASSIAN, 2005). A parasitemia pode chegar a 1% de hemácias parasitadas no caso da *Babesia caballi* e dificilmente o animal morre de anemia. No caso da *Theileria equi* a parasitemia é maior podendo alcançar 7% das hemácias e, em animais imunodeprimidos ou sem contato prévio que lhes garanta imunidade, pode chegar a 80% levando esses animais à morte por anemia aguda (RONCATI, 2006).

As manifestações clínicas incluem picos febris intermitentes, anorexia nos animais intensamente parasitados, anemia devido à hemólise, petéquias nas mucosas, icterícia, edema em regiões baixas do corpo e cabeça e desconforto abdominal causado pelo depósito de bilirrubina nas serosas do trato gastroentérico (THOMASSIAN, 2005).

Na doença crônica a parasitemia é baixa e a principal manifestação é anemia que, ainda que discreta leva à diminuição do desempenho atlético dos animais. Em animais submetidos à imunossupressão seja por restrição alimentar ou uso de corticosteróides, a doença pode ser reagudizada e os equinos podem apresentar diferentes graus de anemia, com agravamento dos sinais clínicos (NOGUEIRA et al., 2005).

Queda de desempenho é a principal queixa associada à babesiose equina, em especial quando se trata de animais de competição (CUNHA et al., 1996; PEREIRA et al., 2004). Em um estudo de Botteon et al. (2005) essa queixa antecedeu o quadro clínico de babesiose sendo que o quadro de queda de desempenho nem sempre é identificado como um problema que deve ser corretamente diagnosticado e tratado. Na prática corrente do meio equestre, via de regra, os animais são submetidos a tratamentos com drogas babesicidas a qualquer sinal de queda de desempenho, mesmo que o diagnóstico final não tenha sido realizado.

Os animais imunocompetentes e que sobrevivem à infecção aguda tornam-se portadores assintomáticos e serão carreadores da babesiose (RONCATI, 2006). Esses animais estarão protegidos da doença severa em função da produção de anticorpos por parte do sistema imune que está continuamente sendo estimulado pelos parasitas remanescentes (KNOWLES et al., 1994).

Animais infectados por *Theileria equi* persistem infectados por anos, provavelmente durante toda vida, enquanto que infecções por *Babesia caballi* não são persistentes e são pouco estáveis. A doença torna-se crônica devido à fraca imunidade natural do hospedeiro que se deve à adaptação do parasito às defesas naturais, ou seja, sua capacidade de evasão da resposta imune através da variação de seus antígenos de superfícies (NIZOLI, 2005). Entretanto, o retorno à fase aguda da doença pode ocorrer quando os animais são imunossuprimidos (NOGUEIRA et al., 2005).

A produção de anticorpos é idade dependente, ou seja, à medida que os equinos tornam-se mais velhos, passam a apresentar uma resposta sorológica mais rápida, com títulos mais altos e por um período de tempo maior (REHBEIN; HEIDRICH-JOSWIG, 1983).

Os protozoários estimulam tanto a imunidade inata quanto a adquirida, mas os mecanismos de imunidade inata contra estes agentes ainda não estão bem definidos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007).

As diferenças de susceptibilidade entre animais da mesma espécie podem ser explicadas em função das características celulares ou da produção de citocinas que são mais ou menos eficientes dependendo da linhagem a qual o indivíduo pertença. Diferentes protozoários variam enormemente em suas propriedades estruturais e bioquímicas, ciclos de vida e mecanismos patogênicos e, por isso, desencadeiam respostas imunológicas adquiridas distintas. Em geral, anticorpos controlam os níveis de parasitas extracelulares na circulação e fluidos teciduais, ao passo que a resposta celular é direcionada contra parasitas intracelulares (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007).

O principal mecanismo de defesa contra protozoários dentro dos macrófagos é a imunidade mediada por células, particularmente a ativação do macrófago por citocinas derivadas das células T CD4⁺ Th1, principalmente o IFN- γ que estimula a atividade microbida dos fagócitos, promovendo a destruição intracelular de organismos fagocitados (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007).

Os anticorpos séricos direcionados contra os antígenos de superfície podem opsonizar, aglutinar ou imobilizar os protozoários. Os anticorpos junto com o complemento e as células citotóxicas podem matá-los e, alguns tipos de anticorpos podem inibir sua replicação (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007).

Os mecanismos da imunidade das babesioses equinas ainda não estão completamente claros. Sabe-se que as proteínas de superfície do estágio intraeritrocitário têm importante participação na patogênese da doença devido ao seu papel no reconhecimento, ligação e penetração dos parasitas no eritrócito do hospedeiro. Na *Theileria equi* proteínas de 30 e 34 kDa são expostas na superfície das hemácias e são reconhecidos pelo sistema imune equino (KNOWLES et al., 1994).

Cavalos que possuem um sistema imune competente e que não tenham sido esplenectomizados, frequentemente, são capazes de controlar a infecção causada

pela babesiose. A ação concomitante da resposta de anticorpos e do baço foi estudada por Knowles et al., 1994. quando utilizaram potros SCID (Severe Combined Immunodeficiency) e animais esplenectomizados para avaliar as respostas imunes na patogênese e controle da doença causada por *Theileria equi*. Os potros SCID não possuem linfócitos B e T maduros e são incapazes de promover resposta específica a um antígeno. Entretanto, esses potros possuem sistema complemento, macrófagos, granulócitos, células natural killer e o baço intactos. Através destes componentes os animais fazem a lise das hemácias parasitadas na tentativa de controlar a parasitemia. A grande quantidade de hemácias lisadas torna os potros profundamente anêmicos e não capazes de resolver a infecção por não possuírem anticorpos específicos. Assim, a resposta imune adaptativa não foi necessária para lisar os eritrócitos, mas após a lise, os anticorpos e os mecanismos celulares mediados por anticorpos são necessários para controlar a infecção (CUNHA et al., 2005).

Da mesma maneira, animais esplenectomizados não foram capazes de controlar a infecção, mesmo tendo um sistema imune competente. Nesses casos podem ter 40% ou mais de eritrócitos parasitados e vir a óbito em decorrência da hemólise aguda. Sabe-se que os macrófagos esplênicos removem eritrócitos senescentes na ausência de resposta imune específica, entretanto os potros SCID, apesar de seu baço estar intacto e seus macrófagos terem fagocitado eritrócitos parasitados, esse mecanismo foi insuficiente para conter a infecção (KNOWLES et al., 1994).

Atualmente já existem estudos que comprovam que, mesmo nos eritrócitos senescentes, alterações na membrana eritrocitária como aumento da densidade, diminuição dos resíduos de ácido siálico, alteração nas concentrações de lipídeos e redução de algumas enzimas levam a acúmulo de imunoglobulinas na superfície eritrocitária e também são importantes no reconhecimento e remoção através do sistema fagocitário mononuclear (WEISS; MCCLAY, 1998).

Os mecanismos de proteção associados aos anticorpos nas babesioses equinas incluem neutralização de parasitas extracelulares, bloqueando sua entrada nas células hospedeiras, ou opsonização dos protozoários livres e de eritrócitos infectados com consecutiva lise através do complemento (CUNHA et al., 2006).

A dinâmica de anticorpos detectáveis por métodos sorológicos na infecção por *Babesia equi* começa ao redor dos 15-20 dias e os isotipos envolvidos são da

classe IgG(a), IgG(b) no início da fase aguda da doença e IgG(T) ao final desta fase (CUNHA et al., 2006).

Em animais portadores de *Babesia caballi* é verificado o declínio da produção de anticorpos sendo o animal tratado ou não com fármacos babesicidas já se observa uma eliminação espontânea do parasito com intervalo de três a 15 meses. As superdosagens para o tratamento da *Theileria equi* acarretam em diminuição da parasitemia, por um período médio de três meses, a níveis tão baixos em que a produção de anticorpos se reduziria a ponto de não ser detectado por alguns métodos sorológicos como a Fixação do Complemento sendo necessários testes mais sensíveis como o C-ELISA (PEREIRA et al., 2004).

O diagnóstico das babesioses se baseia nos achados clínicos e, sobretudo, nos exames laboratoriais (THOMASSIAN, 2005). Muitos testes diagnósticos para as babesioses equinas estão disponíveis podendo ser diretos e indiretos.

Os métodos diretos procuram o antígeno e os mais comumente utilizados incluem visualização dos protozoários em esfregaço sanguíneo corado através sangue colhido por punção de vasos periféricos ou punção esplênica (MOREIRA et al., 2007) e demonstração da presença de DNA do parasita através de amplificação pela técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction).

A pesquisa de hematozoários realizada por microscopia optica em esfregaços sanguíneos corados é a técnica mais utilizada na rotina por ser de fácil execução e baixo custo. Segundo Baldani et al. (2004) a identificação direta dos parasitas no esfregaço sanguíneo corado é confirmatório, entretanto, nos casos de animais portadores, dificilmente são encontrados. Sendo assim, apesar da alta especificidade o exame é de baixa sensibilidade, variando de 32% (BATTSETSEG et al., 2002) a 38,8% (FARAH et al., 2003). Cunha et al. (1996) encontrou um baixo percentual de positividade no exame direto (1,5%) em relação a sorologia (57,89%) utilizando a técnica de imunofluorescência indireta em animais do Jóquei Clube de Pelotas (RS) indicando a deficiência do exame em detectar baixas parasitemias, comuns durante a fase crônica da enfermidade.

A utilização da PCR é mais trabalhosa, demorada e requer equipamentos especiais, entretanto possui boa especificidade e sensibilidade que pode variar de 78% (FARAH et al., 2003) a 95,7% (BATTSETSEG et al., 2002).

Os métodos indiretos consistem na mensuração da produção de anticorpos resultantes da resposta imunológica contra o parasita. Entre os principais estão a

Imunofluorescência Indireta, a Fixação do Complemento e o C-ELISA (Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

A imunofluorescência indireta (IFI) é uma técnica de alta especificidade e sensibilidade (96,6%) (BOSE; PEYMANN, 1994) entretanto sua principal desvantagem consiste na produção dos antígenos que é realizada através de equinos esplenectomizados e infectados experimentalmente (REHBEIN; HEIDRICH-JOSWIG, 1983; CUNHA et al., 1996). Por essa razão fica limitada em termos de padronização e distribuição mundial, além disso, a diferenciação entre o fraco positivo e o negativo requer grande experiência em interpretação (OIE, 2004).

A Fixação do Complemento foi uma técnica amplamente utilizada para o diagnóstico das babesioses em equinos. Atualmente, sabe-se que os problemas associados à técnica incluem atividade anticomplementar de muitos soros e as classes de imunoglobulinas envolvidas no controle da doença, principalmente IgG(T), que não são hábeis fixadoras do complemento e que em animais portadores assintomáticos, onde a infecção é latente, ou na fase inicial da doença o teste apresenta baixa sensibilidade (KNOWLES, 1996; RHALEM et al., 2001; PEREIRA et al., 2004) sendo de 28,8% no 14º dia após infecção (BOSE; PEYMANN, 1994).

Os animais portadores não diagnosticados são de fundamental importância em função do risco de serem introduzidos em áreas não endêmicas. Países livres da piroplasmose restringem a importação de animais provenientes de áreas endêmicas até que fique constatado que sejam livres da infecção. Com base nesse fato, é fundamental existir um teste com adequada sensibilidade para identificar qualquer animal portador com segurança.

Como descrito, a fixação do complemento não tem os atributos necessários devido aos problemas associados à técnica e a imunofluorescência indireta é limitada para grandes quantidades de amostras. Com o objetivo de aprimorar o diagnóstico desta afecção foi desenvolvido o cELISA (Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Esta técnica oferece aumento da sensibilidade e especificidade necessárias ao diagnóstico desta doença quando comparada às outras técnicas sorológicas (RHALEM et al., 2001).

O teste de C-ELISA detecta anticorpos contra *Theileria equi* e *Babesia caballi* em soro de equinos utilizando antígenos recombinantes (EMA-1 para *Theileria equi* e RAP-1 para *Babesia caballi*) e anticorpos monoclonais específicos (MAb 36/133.97 para *Theileria equi* e MAb 79/17.18.5 para *Babesia caballi*), o que o difere de outros

métodos sorológicos e o torna mais sensível (95,5%) e mais específico (99,0%) (KNOWLES et al, 1991; KAPPMAYER et al., 1999; CUNHA et al., 2002).

A proteína do merozoíto da *Theileria equi* expressa durante a parasitemia foi investigada por Knowles et al (1991) sendo constatado que os anticorpos reagem a pelo menos onze proteínas diferentes sendo a de 28kDa a de maior interesse por ser geograficamente conservada e imunodominante, induzindo altos títulos de anticorpos em cavalos naturalmente e experimentalmente infectados.

O mesmo autor em 1992, através do uso de anticorpos monoclonais (Mab 36/133.97), descreveu a produção do antígeno recombinante chamado de EMA-1 (Equine Merozoite Antigen 1) através da inclusão deste epítipo dominante em *Escherichia coli*, produzindo clones que expressam essa proteína, e comprovou que o antígeno recombinante produzido era inteiramente capaz de ser reconhecido por anticorpos presentes em soros de animais infectados de várias países, incluindo o Brasil. Esse importante estudo possibilitou que não houvesse mais a necessidade de utilizar animais esplenectomizados para a produção de antígenos utilizados em provas sorológicas para essa doença. Além disso, possibilitou a produção do antígeno recombinante em larga escala para utilização em testes sorológicos para detecção de anticorpos contra *Theileria equi* com padronização adequada e distribuição mundial (OIE, 2004).

Kappmeyer et al. (1999) da mesma maneira descreveu a produção do antígeno recombinante para a *Babesia caballi* demonimado RAP-1 (Rhoptry-Associated Protein) através do anticorpo monoclonal MAb 79/17.18.5, sendo a proteína imunodominante a de 60kDa. O RAP-1 também foi produzido através de sua inclusão em *Escherichia coli* possibilitando da mesma maneira a padronização e distribuição mundial.

Anticorpos monoclonais são específicos para um antígeno e são produzidos em hibridomas de linfócitos B (linhagem celular derivada da fusão de um linfócito B isolado normal e uma linhagem tumoral imortal de linfócitos B). Esses anticorpos são amplamente usados em pesquisas e para fins diagnósticos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007). Na técnica do C-ELISA, o uso de anticorpos monoclonais eleva a especificidade da prova, pois apresenta uma solução para o problema de purificação do antígeno utilizado nos testes já que a sinalização é dependente da ligação do anticorpo monoclonal ao antígeno recombinante e, mesmo com ligações inespecíficas provenientes de anticorpos presentes no soro testado a outras

proteínas coaptadas na placa essa reação não será sinalizada, evitando a possibilidade de resultados falso-positivos (OIE, 2004).

O tratamento baseado no dipropionato de imidocarb é eficaz no sentido de diminuir a parasitemia e, em geral, erradicar a infecção por *Babesia caballi* quando administrado na dose e período apropriados. A *Theileria equi* é muito mais resistente e a terapia com o dipropionato de imidocarb tem apenas 50 a 60% de eficácia em termos de eliminar a infecção (REED; BAYLY, 2000). Corrêa; Roncati; Bonagura, (2005) demonstraram a eficácia do tratamento com dipropionato de imidocarb na dose de 4mg/kg, sendo o volume total dividido em duas aplicações com intervalo de 10 horas e repetindo este protocolo após 48 horas e 96 horas, principalmente para *Babesia caballi*, mas com significativo resultado também para *Theileria equi*.

Todas as drogas contra babesiose são potencialmente tóxicas, principalmente em terapêuticas múltiplas. Podem ocorrer principalmente lesões hepáticas, renais, salivação, fraqueza, e hipermotilidade do trato gastrointestinal. (ADAMS, 1981; McDOUGALD; ROBERSON, 1992). Grandes toxicidades relacionadas ao imidocarb não foram identificadas por Corrêa; Roncati; Bonagura (2005), mas deve-se considerar que doses repetidas da droga podem levar a formação de fibromas nos grupos musculares selecionados para a sua administração e, além disso, foram observadas reações comportamentais de irritação na maioria dos animais podendo estar relacionado ao processo inflamatório local causado pela administração intramuscular do medicamento.

3 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar equinos da raça Puro Sangue Inglês alojados no Jockey Clube de São Paulo quanto a presença de anticorpos contra *Theileria equi* e *Babesia caballi* através da técnica de C-ELISA (Competitive Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 OBTENÇÃO E ARMAZENAGEM DAS AMOSTRAS

Foram utilizadas 180 amostras de soro sanguíneo colhidas de equinos da raça Puro Sangue Inglês, machos e fêmeas, com idade entre dois e oito anos, submetidos a condições sanitárias e nutricionais semelhantes, alojados em grupos de cocheiras existentes no Jockey Clube de São Paulo. Os animais apresentavam-se aparentemente saudáveis e não houve questionamento sobre seus históricos clínicos ou qualquer tratamento prévio. As cocheiras foram selecionadas na dependência da autorização dos proprietários e treinadores para a realização do procedimento.

As amostras foram colhidas dos animais em repouso, pela manhã (6 horas), quando ainda estavam em suas cocheiras, utilizando apenas cabresto para a imobilização. Foi realizada venipunção da jugular, com anti-sepsia prévia (álcool 90%) utilizando-se adaptador para agulha e agulha 20G no sistema Vacutainer¹ em tubos plásticos de tampa vermelha sem nenhum aditivo com capacidade para 8ml de sangue.

Após coagulação e retração do coágulo as amostras foram centrifugadas a 2.500 rpm por 10 minutos e o soro sanguíneo foi separado e acondicionado em microtubos com capacidade para 2,0ml e congeladas a -20°C até a realização dos testes.

4.2 TÉCNICA DO C-ELISA

O teste utilizado neste estudo para o diagnóstico de *Theileria equi* e *Babesia caballi* foi o C-ELISA da VRMD² sendo um teste específico para cada antígeno segundo protocolo disposto nos anexos A a H.

¹ Sistema Vacutainer - BD - Becton, Dickinson and Company®

² VRMD Inc® - C-ELISA *Theileria equi* e C-ELISA *Babesia caballi* - www.vrmd.com

As amostras de soro armazenadas foram testadas em duplicata para obtenção dos resultados. Em todas as placas foram utilizados controles positivos e negativos, que acompanham os reagentes do teste, em triplicada.

Os reagentes (Figura 3) que compõe esse teste são:

- A** - Duas placas com 96 poços cada contendo antígenos de *Theileria equi* ou de *Babesia caballi* coaptados
- B** – Soro controle positivo contendo anticorpos anti *Theileria equi* ou anti *Babesia caballi*
- C** – Soro controle negativo
- D** – Anticorpo monoclonal primário
- E** – Anticorpo secundário ligado à enzima (peroxidase)
- F** – Solução tampão para diluição dos anticorpos monoclonais
- G** – Solução tampão para diluição dos soros controles e das amostras a serem testadas
- H** – Solução de lavagem concentrada
- I** – Substrato
- J** – Solução “stop”

Os equipamentos e materiais utilizados na execução do teste foram:

- A** – Micropipetas monocanal (10-100µl e 100-1000µl) e multicanal (10-100µl)
- B** – Microplacas livres de antígenos
- C** – Leitor de microplaca de ELISA
- D** – Água destilada

Fonte: PIOTTO, M. A. (2007).

Figura 3 – Teste C-ELISA para babesiose equina (PIOTTO, 2007)

A sequência de eventos do teste inicia com os antígenos recombinantes que estão aderidos em cada poço da placa (figura 4a). Os anticorpos presentes no soro equino testado ligam-se aos antígenos coaptados na placa (Figura 4b) e inibem a ligação do anticorpo monoclonal primário ao antígeno recombinante (Figura 4c). A ligação do anticorpo monoclonal primário ao antígeno coaptado na placa é detectado pela ligação do anticorpo monoclonal secundário ligado a uma enzima (Figura 4d).

Finalmente, a presença do anticorpo monoclonal secundário ligado à enzima é quantificada pela adição de um substrato e subsequente produção de cor (Figura 4e). Uma cor forte (azul escuro) indica pouca ou nenhuma inibição na ligação do anticorpo monoclonal primário e consequentemente ausência de anticorpos no soro equino testado. Uma cor fraca (azul claro) produzida devido à inibição da ligação do anticorpo monoclonal primário ao antígeno coaptado na placa indica a presença de anticorpos contra babesia sendo o animal considerado positivo para a doença (informe pessoal)¹. Portanto, o resultado do teste de C-ELISA é sinalizado pela formação de cor após a adição de um substrato e sua mensuração é feita através de leitura de absorbância em 630nm em leitor de placa.

Após a leitura a absorbância obtida é colocada na fórmula matemática:

$$\% \text{ de Inibição} = \frac{100 - (\text{Densidade Óptica do Teste} \times 100)}{(\text{Densidade Óptica do Controle Negativo})}$$

A intensidade da coloração obtida é inversamente proporcional à presença de anticorpos, ou seja, quanto mais anticorpos o soro teste tiver, menor será a absorbância produzida (informe pessoal)². A nota de corte para esta reação corresponde a uma inibição de 40% na formação de cor (Figura 4f), sendo que soros testados que produzirem uma porcentagem de inibição maior ou igual a 40% serão consideradas positivas e aqueles que produzirem porcentagem de inibição menores que 40% serão considerados negativos (Anexo C e Anexo G).

Cada amostra testada foi submetida à leitura da absorbância assim como os controles positivos e negativos. Como descrito na fórmula acima, os controles negativos participam do cálculo para definição da porcentagem de inibição e, por esse motivo, o valor utilizado na fórmula foi a média entre os três controles negativos obtidos em cada placa.

^{1,2} ADAMS, S. [Etapas do procedimento do C-ELISA]. Mensagem recebida de scott@vrmd.com em 20 abr. 2006. (Anexo I)

Os controles positivos têm a função de possibilitar a conferência na execução do teste devendo seus resultados de inibição estar acima de 40%.

Fonte: PIOTTO, M. A. (2007).

Figura 4 – Sequência de eventos no teste de C-ELISA em amostras positivas e negativas. **(a)** Antígeno coaptado à placa. **(b)** Amostra positiva com ligação dos anticorpos do soro testado ao antígeno e amostra negativa sem ligação. **(c)** Inibição da ligação do anticorpo monoclonal primário ao antígeno pelo soro teste positivo e ligação do anticorpo monoclonal primário ao antígeno coaptado na amostra negativa. **(d)** Não ocorre ligação do anticorpo monoclonal secundário ligado à enzima ao anticorpo do soro teste positivo, mas sim ao anticorpo monoclonal primário que não sofreu inibição e ligou-se ao antígeno coaptado na amostra negativa. **(e)** Adição do substrato que na amostra positiva não sofre alteração na coloração e, sua adição na amostra negativa, apresenta consumo pela enzima e sinaliza presença da ligação do anticorpo monoclonal primário e não de anticorpos do soro teste caracterizando a amostra como negativa. **(f)** Representação esquemática da escala de cor de acordo com a inibição onde os testes são submetidos a leitura de absorvância por espectrofotometria e os resultados obtidos são calculados para que se encontre a porcentagem de inibição. A porcentagem de corte definida para o teste C-ELISA da VRMD[®] Inc. é de 40%. Entre as etapas (b) e (c) e também (c) e (d) ocorrem lavagens realizadas em lavadoras automáticas de microplacas.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram demonstrados através de sua distribuição percentual entre positivos e negativos.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos nos testes de C-ELISA para *Theileria equi* e *Babesia caballi* estão demonstrados abaixo. A descrição detalhada e individual dos resultados de cada equino utilizado está descrito nos apêndices A, B e C.

Os resultados da sorologia demonstraram que 35,5% (64/180) de animais apresentaram resultados positivos e 64,5% (116/180) demonstraram resultados negativos para babesiose equina (Gráfico 1). Entre os animais positivos 6,6% (12/180) demonstraram reação positiva no C-ELISA unicamente para *Theileria equi*, 22,3% (40/180) foram positivos somente para *Babesia caballi* e 6,6% (12/180) obtiveram resultados positivos concomitantes para *Theileria equi* e *Babesia caballi* (Gráfico 2).

Gráfico 1 - Gráfico das porcentagens de animais sorologicamente positivos e negativos para babesiose equina - São Paulo - 2009

Gráfico 2 - Gráfico dos resultados sorológicos de *Theileria equi* e/ou *Babesia caballi* - São Paulo - 2009

Considerando-se a idade 18,89% (34/180) tinham dois anos e apresentaram 26,57% (17/64) de reações positivas no C-ELISA. Animais com três anos representaram 24,45% (45/180) do total e demonstraram 35,94% (23/64) de positivos. Com quatro anos 21,67% (39/180) do total de animais obtiveram 15,63% (10/64) de positivos. Os animais de cinco anos totalizaram 17,78% (33/180) e apresentaram 12,50% (08/64) de reações positivas. Animais com seis anos representaram 11,67% (19/180) do total e demonstraram 6,25% (04/64) de positivos. De um total de 2,23% (04/180) animais com sete anos nenhum (00/64) apresentou resultado positivo. Por fim, dos 3,34% (06/180) de animais com oito anos, 3,13% (02/64) revelaram reações positivas para as babesioses equinas (Tabela 1). Essas porcentagens podem ser também visualizadas no Gráfico 3.

Tabela 1 – Descrição dos animais positivos para babesiose segundo a idade – São Paulo – 2009

Idade	Número de Animais	Número de Positivos
2 anos	34	17
3 anos	45	23
4 anos	39	10
5 anos	33	08
6 anos	19	04
7 anos	04	00
8 anos	06	02
TOTAL	180	64

Gráfico 3 - Gráfico dos resultados sorológicos positivos para babesiose equina segundo a idade - São Paulo – 2009

Das 180 amostras colhidas, 71,2% (128/180) foram provenientes de machos enquanto que 28,8% (52/180) foram de fêmeas (Tabela 2). Entre os machos, 34,3% (44/128) foram positivos (Gráfico 4) e entre as fêmeas 38,46% (20/52) demonstraram reações positivas para babesiose equina (Gráfico 5).

Tabela 2 – Descrição dos animais positivos para babesiose equina segundo o sexo – São Paulo – 2009

Sexo	Número de Animais	Número de Positivos
Machos	128	44
Fêmeas	52	20
TOTAL	180	64

Gráfico 4 – Gráfico dos resultados sorológicos para babesiose equina nos machos - São Paulo - 2009

Gráfico 5 – Gráfico dos resultados sorológicos para babesiose equina nas fêmeas - São Paulo - 2009

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, utilizando-se a técnica de C-ELISA, a frequência de animais sorologicamente positivos para infecção unicamente por *Theileria equi* foi de 6,6% (12 animais), para a infecção concomitante por *Theileria equi* e *Babesia caballi* foi também de 6,6% (12 animais) e para infecção unicamente para *Babesia caballi* foi de 22,3% (40 animais). A baixa frequência de animais soropositivos em Jóquei Clubes diferiu dos achados de Cunha et al. (1996) que, utilizando a técnica de imunofluorescência indireta, observou 51,35% de animais soropositivos para *Theileria equi* em amostras provenientes de cavalos do Jóquei Clube de Pelotas onde os títulos, em sua grande maioria, foram baixos (320). Essa diferença poderia ser explicada pela diferença das metodologias já que a técnica de imunofluorescência tem especificidade menor que a do C-ELISA sendo a primeira 96,6% (BOSE; PEYMANN, 1994) e a segunda 99,5% (KNOWLES et al., 1991). Ainda, em função do rigor observado no trânsito internacional de equinos através da exigência de um teste mais sensível e específico como o C-ELISA, pode ter ocorrido, nos últimos anos, um maior cuidado no manejo dos animais nas propriedades que criam cavalos Puro Sangue Inglês para corridas, refletido na avaliação sorológica obtida.

Os resultados observados por Pereira et al. (2005), quando estudou equinos Puro Sangue Inglês de pequenos estabelecimentos equestres e que possuíam animais no Jóquei Clube Brasileiro, foram de 18,1% de reações positivas para *Theileria equi*, 6,0% de infecções mistas e 1,5% para *Babesia caballi* quando avaliadas pela técnica de fixação do complemento. Considerando o presente estudo, foi observado um número menor de reações positivas para *Theileria equi* e, em contrapartida, um número muito maior de animais sorologicamente positivos para *Babesia caballi*. Esta diferença com relação a *Babesia caballi* pode ser explicada primeiramente pela diferença na técnica utilizada já que a fixação do complemento pode falhar na detecção de animais cronicamente infectados quando os títulos de anticorpos apresentam-se mais baixos. Ainda, nas infecções por *Babesia caballi*, ocorre queda dos títulos de anticorpos mesmo em animais não tratados já que a eliminação deste parasita pode ser espontânea (FRIEDHOFF; TENTER; MULLER, 1990) e a técnica de fixação do complemento apresenta sensibilidade inferior ao teste de C-ELISA, utilizado neste estudo. Pode-se ainda sugerir que, sendo a

Babesia caballi menos patogênica em relação à *Theileria equi*, não causaria manifestações clínicas relevantes e portanto os animais portadores somente deste protozoário possivelmente não receberiam tratamento com drogas babesicidas, colaborando para um maior número de animais que apresentaram anticorpos contra este hemoparasita.

Considerando a maioria dos estudos de prevalência para esta enfermidade no Brasil, onde os animais testados encontram-se em propriedades com criação extensiva e existem carrapatos vetores, as percentagens de animais soropositivos têm grande variação e estão muito acima das demonstradas neste estudo. Cunha et al. (1996) encontrou 66,10% de soropositivos pelo teste de imunofluorescência indireta em animais provenientes do Rio Grande do Sul. Botteon et al. (1996) observou 89,6% de prevalência de babesiose equina em animais criados extensivamente e 45,2% em animais confinados no Rio de Janeiro utilizando a técnica de imunofluorescência indireta. Ainda Ribeiro (1999) utilizando a mesma técnica demonstrou 60,4% de animais soropositivos em Minas Gerais.

As diferenças referentes ao maior número de animais positivos sorologicamente observados nos sistemas extensivos de criação de equinos quando comparados aos do presente estudo poderiam ser explicadas pelo fato de que, possivelmente, não existirem vetores no Jockey Club de São Paulo. Além disso, os cavalos são manejados cuidadosamente diariamente, sendo improvável a permanência de carrapatos nestes animais.

Outra explicação seria a de que tratamentos babesicidas repetidos diminuem consideravelmente a carga parasitária dos animais, quando não eliminam totalmente a infecção, fazendo com que os títulos de anticorpos tornem-se indetectáveis com o passar do tempo. Esses tratamentos são amplamente utilizados em Jockey Clubs e Centros de Treinamento, onde a queda de desempenho é a principal queixa relacionada a esta enfermidade.

Segundo Botteon et al. (2005) essa queixa antecedeu o quadro clínico de babesiose sendo que a queda de desempenho nem sempre é identificada como um problema que deve ser corretamente diagnosticado e tratado. Possivelmente animais sorologicamente negativos para as babesioses equinas e que apresentam diminuição em seu potencial atlético como resultado de outras enfermidades podem ser tratados desnecessariamente. No presente estudo 64,5% dos animais foram soronegativos e dificilmente serão novamente infectados enquanto estiverem

confinados ao hipódromo, portanto qualquer sintomatologia similar àquelas causadas por babesiose deve ser cuidadosamente considerada em diagnósticos diferenciais.

Estudos de Rehbein; Heidrich-Joswig, (1983) indicam que a produção de anticorpos é idade dependente, ou seja, à medida que os animais tornam-se mais velhos apresentam uma resposta sorológica mais rápida, com títulos mais altos e por um período maior de tempo. No presente estudo, a maior porcentagem de animais sorologicamente positivos foi naqueles de dois e três anos de idade, decaindo nos animais mais velhos. Os achados apresentados não contradizem àqueles descritos pelo referido autor, entretanto, esta observação pode ser explicada pelo fato de que os animais tornam-se infectados em suas propriedades de origem quando ainda são muito jovens. Ao iniciarem suas atividades de treinamento no Jóquei Clube não tem mais contato com carrapatos vetores e são submetidos a tratamentos babesicidas repetidos, tendo resultados sorológicos negativos à medida que se tornam mais velhos.

A pesquisa de hematozoários em esfregaços sanguíneos corados é a técnica mais utilizada na rotina para o diagnóstico das babesioses por ser de fácil execução e baixo custo. Entretanto, como sua sensibilidade é baixa, muitos animais apresentam resultados falso negativos. O teste mais sensível na detecção de antígenos é o PCR, porém esta técnica é trabalhosa e de alto custo (BASHIRUDDIN; CAMMÀ; REBELO, 1999). Apesar da PCR possuir alta sensibilidade, o teste pode apresentar resultados falso negativos em infecções onde a parasitemia é muito baixa (RONCATI, 2006). Baseado nas limitações dos métodos diretos na detecção de animais portadores, as técnicas indiretas, baseadas na pesquisa por anticorpos específicos, têm sido a principal escolha para o diagnóstico desta enfermidade. Por ter alta especificidade e sensibilidade, apresentando reagentes padronizados e com ampla capacidade de distribuição mundial, o C-ELISA foi o teste de escolha pela OIE para trânsito internacional de cavalos para países livres da babesiose equina. Apesar de resultados positivos não diferirem animais portadores daqueles que apresentam apenas anticorpos de memória, as provas sorológicas de grande sensibilidade confirmam os resultados negativos, diminuindo os riscos de se introduzir animais portadores em áreas onde a doença não é endêmica e os carrapatos vetores estão presentes.

Estudos observando o tempo para que os títulos tornem-se indetectáveis e os animais sejam considerados sorologicamente negativos quando testados pelo C-ELISA não foram encontrados na literatura pesquisada. Entretanto, esta observação parece ser de grande relevância já que o diagnóstico sorológico precoce em cavalos Puro Sangue Inglês, que representam animais de alto desempenho e curto tempo de vida atlética, seria fundamental para que exista tempo hábil para a queda nos títulos de anticorpos e, assim, estes animais possam ser exportados no auge de sua carreira esportiva.

7 CONCLUSÃO

Através deste estudo pode-se concluir que os animais que apresentaram sorologia positiva para *Theileria equi*, *Babesia caballi* ou infecção concomitante de *Theileria equi* e *Babesia caballi* representaram um numero menor de animais quando comparados aos que apresentaram resultados negativos e, através destes achados, pode-se sugerir que estes animais são portadores da infecção ou apresentam anticorpos remanescentes após eliminação dos protozoários.

Conclui-se também que a maioria dos animais testados apresentou resultados negativos sorologicamente e que, sendo o C-ELISA um teste de alta sensibilidade e especificidade, estes animais podem ser considerados livres da babesiose equina.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, 2008.
- ADAMS, L. G. Clinicopathological aspects of imidocarb dipropionate toxicity in horses. **Research in Veterinary Science**, v. 31, n. 1, p. 54-61, 1981.
- BALDANI, C. D.; MACHADO, R. Z.; BOTTEON, P. T. L.; TAKAKURA, F. S.; MASSARD, C. L. Um ensaio imunoenzimático para a detecção de anticorpos IgG contra *Babesia equi* em equinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 5, p. 1525-1529, 2004.
- BASHIRUDDIN, J. B.; CAMMÀ, 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, n. 1/2, p. 75-83, 1999.
- BATTSETSEG, B.; LUCERO, S.; XUAN, X.; CLAVERIA, F. G.; IVONE, N. Detection of natural infection of *Boophilus microplus* with *Babesia equi* and *Babesia caballi* in Brazilian horses using nested polymerase chain reaction, **Veterinary Parasitology**, v. 107, n. 4, p. 351-357, 2002.
- BOSE, R.; PEYMANN, B. Diagnosis of *Babesia caballi* infections in horses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and western blot. **International Journal of Parasitology**, v. 24, n. 3, p. 347-356, 1994.
- BOTTEON, P. T. L.; BOTTEON, R. C. C. M.; REIS, T. P. R.; MASSARD, C. L. Babesiose em cavalos atletas portadores. **Ciência Rural**, v. 35, n. 5, p. 1136-1140, 2005.
- CORRÊA, R. R.; RONCATI, N. V.; BONAGURA, G. Estudo da eficácia terapêutica do dipropionato de imidocarb no tratamento da piroplasmose equina. **A Hora Veterinária**, v. 24, n. 144, p. 53-58, 2005.
- CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos**. 2. ed, Rio de Janeiro: Medsi, 1992.
- CUNHA, C. W.; DA SILVA, S. S.; PIMENTEL, C. A.; DAPPER, E. Avaliação da frequência de equinos soropositivos a *Babesia equi* no Jockey Club de Pelotas em dois haras da zona sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 5, n. 2, p. 119-122, 1996.
- CUNHA, C. W.; KAPPMAYER, L. S.; McGUIRE, T. C.; DELLAGOSTIN, O. A.; KNOWLES, D. P. Conformational dependence and conservation of an immunodominant epitope within the *Babesia equi* erythrocyte-stage surface protein equi merozoite antigen 1. **Clinical and Diagnostic Laboratory immunology**, v. 9, p. 1301-1306, 2002.

CUNHA, C. W.; MCGUIRE, T. C.; KAPPMAYER, L. S.; HINES, S. A.; LOPEZ, M.; DELLAGOSTIN, O. A.; KNOWLES, D. P. Development of Specific Immunoglobulin G α IgG α and IgG β Antibodies Correlates with Control of Parasitemia in *Babesia equi* infection. **Clinical and vaccine immunology**, v. 2, p. 297-300, 2006.

FARAH, A. W.; HEGAZY, N. A.; ROMANY, M. M.; SOLIMAN, Y. A.; DAOUD, A. M. Molecular detection of *Babesia equi* in infection and carrier horses by polymerase chain reaction. **Journal Article**, v. 10, n. 2, p.73-79, 2003.

FORTES, E. **Parasitologia veterinária**. 1. ed. Rio Grande do Sul: Sulina, 1987, p.68-72.

FORTES, E. **Parasitologia veterinária**. 3. ed. Rio Grande do Sul: Sulina, 1997, p.102-111.

FRIEDHOFF, K. T.; TENTER, A. M.; MULLER, I. Haemoparasites of equines: impact in international trade of horses. **Revue Scintifique et Technique**, v. 9, p. 1187-1194, 1990.

GUIMARÃES, A. M.; LIMA, J. D.; RIBEIRO, M. F. B. Sporogony and experimental transmission of *Babesia equi* by Boophilus microplus ticks. **Parasitology Research**, v. 84, p. 69-74,1998.

IKADAI, H.; NAGAI, A.; XUAN, X.; IGARASHI, I.; KAMIO, T.; TSUJI, N.; OYOMADA, T.; SUZUKI, N.; FUJISAKI, K. Seroepidemiologic studies on *Babesia caballi* and *Babesia equi* infections in Japan **Journal of Veterinary Medical Science**, v.64, p.325-328, 2002.

KAPPMAYER, L. S. ; PERRYMAN, L. E.; HINES, S. A.; BASZLER, T. V.; KATZ, J. B.; HENNAGER, S. G.; KNOWLES, O. P. Detection of equine antibodies to *Babesia caballi* by recombinant *B. caballi* rhoptry-associated protein 1 in a competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 2285–2290, 1999.

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

KNOWLES, D. P.; KAPPMAYER, L. S.; PERRYMAN, L. E. Specific immune responses are required to control parasitemia in *Babesia equi* infection. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 1909-1913, 1994.

KNOWLES, D. P.; KAPPMAYER, L. S.; STILLER, D.; HENNAGER, S. G.; PERRYMAN, L. E. Antibody to a recombinant merozoite protein epitope identifies horses infected with *Babesia equi*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, n. 12, p. 3122-3126, 1992.

KNOWLES, D. P.; PERRYMAN, L. E.; GOFF, W. L.; MILLER, C. D.; HARRINGTON, R. D.; GORHAM, J. R. A monoclonal antibody defines a geographically conserved surface protein epitope of *Babesia equi* merozoites. **Infection and Immunity**, v. 59, n.7, p. 2412-2417, 1991.

KNOWLES, D. P.; PERRYMAN, L. E.; KAPPMAYER, L. S.; HENNAGER, S. G. Detection of equine antibody to *Babesia equi* merozoite proteins by a monoclonal antibody-based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Microbiology**, v. 29, n. 9, p. 2056-2058, 1991.

MCDONALD, L. R.; ROBERSON, E. L. Drogas antiprotozoários. In: BOOTH, N. H. MCDONALD, L. E. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, cap. 57, p. 768-782, 1992.

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

MOREIRA, M. A. B.; RONCATI, N. V.; CORREA, R. R.; SOUZA, M. V. M. Diagnóstico de babesiose equina por punção esplênica. In: CONFERÊNCIA ANUAL DA ABRAVEQ, 7., São Paulo, 2006.

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

NOGUEIRA, C. E. W.; SILVA, S. S.; NIZOLI, L. Q.; RIBAS, L. M.; ALBUQUERQUE, L. P. A. N. Efeito quimioprolático do dipropionato de imidocarb na prevenção da agudização de babesiose equina em cavalos portadores da infecção. **A Hora Veterinária**, v. 25, n. 146, 2005.

OIE - Office International des Epizooties. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Chapter 2.5.6. Equine Piroplasmosis.; 5th ed. 2004. Disponível em: http://www.oie.int/eng/normes/manual/A_00084.htm Acesso em: abr, 2006.

OLIVEIRA, R. A.; BORGES, L. M. F. **Biologia e controle de carrapatos em equinos no Brasil**. Disponível em: <http://www.etecjbento.com.br/downloads/antonio/bcceb.pdf> Acesso em: jun, 2007.

PEREIRA, M. A. V. C., MASSARD, C. L., FACCINI, J. L. H., SIQUEIRA, L. F. G. Ocorrência de *Babesia equi* (Laveran, 1901) e *Babesia caballi* (Nuttall&Strickland, 1912) em equinos da raça puro sangue inglês de pequenos estabelecimentos equestres. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 4, p. 405-409, 2004.

PEREIRA, M. C.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P. J.; KLAFKE, G. M. **Rhipicephalus (Boophilus) microplus. Biologia, controle e resistência**. São Paulo: MedVet, 2008.

RHALEM, A.; SAHIBI, H.; LASRI, S.; JOHNSON, W. C.; KAPPMAYER, L. S.; HAMIDOUCH, A.; KNOWLES, D. P.; GOFF, W. L. Validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosing *Babesia equi* infections of Moroccan origin and its use in determining the seroprevalence of *B. equi* in Morocco. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, n.13, p. 249-251, 2001.

REED, S. M.; BAYLY, W. M. **Medicina interna equina**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 490-491, 2000.

REHBEIN, G.; HEIDRICH-JOSWIG, S. Use of schizont and piroplasm antigens of *Babesia equi* in the indirect fluorescent antibody and complement fixation tests. **Veterinary Parasitology**, v. 12, p. 135-144, 1983.

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

THOMASSIAN, A. **Enfermidade dos cavalos**. 4. ed., São Paulo: Varela, 2005.

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

UETI, M. W.; PALMER, G. H.; SCOLES, G. A.; KAPPMAYER, L. S.; KNOWLES, D. P. Persistently infected horses are reservoirs for intraestadial tick-born transmission of the apicomplexan parasite *Babesia equi*. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 8, p. 3525-3529, 2008.

USA - United States Department of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service (USDA), Veterinary Services. Competitive ELISA for serodiagnosis of Equine Piroplasmosis (*Babesia equi* and *Babesia caballi*) and production of recombinant *Babesia equi* and *Babesia caballi* cELISA antigens. Ames: National Veterinary Services Laboratories, 1997. 27pp.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M. JENNINGS, F. W. **Parasitologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990.

WEISS, D. J.; MCCLAY, C. B. Studies on the pathogenesis of the erythrocyte destruction associated with the anemia of inflammatory disease. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 17, n. 4, p. 90 - 93, 1998.

APENDICE A – Descrição dos animais quanto a sexo e idade e resultados do teste de C-ELISA para *Theileria equi* e para *Babesia caballi* – São Paulo - 2009

Número da Amostra*	Sexo	Idade		C-ELISA	C-ELISA
		Anos	Meses	<i>Theileria equi</i>	<i>Babesia caballi</i>
1	M	2	4	NEGATIVO	NEGATIVO
2	M	2	4	NEGATIVO	POSITIVO
3	M	2	1	NEGATIVO	POSITIVO
4	M	2	3	NEGATIVO	NEGATIVO
5	F	2	4	NEGATIVO	POSITIVO
6	F	2	1	NEGATIVO	POSITIVO
7	M	2	5	NEGATIVO	POSITIVO
8	F	3	5	NEGATIVO	NEGATIVO
9	M	4	4	NEGATIVO	NEGATIVO
10	M	3	2	NEGATIVO	POSITIVO
11	F	3	2	POSITIVO	NEGATIVO
12	F	2	4	NEGATIVO	POSITIVO
13	M	2	2	NEGATIVO	POSITIVO
14	M	3	3	NEGATIVO	POSITIVO
15	F	2	3	NEGATIVO	POSITIVO
16	F	2	1	NEGATIVO	POSITIVO
17	M	2	3	NEGATIVO	POSITIVO
18	M	2	2	NEGATIVO	POSITIVO
19	M	2	5	NEGATIVO	POSITIVO
20	F	3	4	NEGATIVO	NEGATIVO
21	F	3	4	NEGATIVO	NEGATIVO
22	M	3	5	NEGATIVO	NEGATIVO
23	F	4	3	NEGATIVO	POSITIVO
25	F	2	5	NEGATIVO	NEGATIVO
26	M	2	2	NEGATIVO	NEGATIVO
27	F	2	4	NEGATIVO	NEGATIVO
28	F	2	3	NEGATIVO	NEGATIVO
29	M	2	5	NEGATIVO	NEGATIVO
30	M	2	5	NEGATIVO	NEGATIVO
31	M	2	4	NEGATIVO	NEGATIVO
32	M	2	5	NEGATIVO	NEGATIVO
33	F	2	5	NEGATIVO	NEGATIVO
34	F	2	1	NEGATIVO	NEGATIVO
35	F	2	4	NEGATIVO	NEGATIVO
36	M	3	2	NEGATIVO	POSITIVO
37	M	3	3	NEGATIVO	NEGATIVO
38	M	3	4	NEGATIVO	NEGATIVO
39	F	3	3	NEGATIVO	NEGATIVO
40	M	2	2	NEGATIVO	POSITIVO
41	F	3	2	POSITIVO	POSITIVO
42	F	2	5	NEGATIVO	NEGATIVO
43	M	2	2	NEGATIVO	POSITIVO
44	M	2	2	NEGATIVO	POSITIVO
45	F	3	3	NEGATIVO	NEGATIVO
46	F	2	3	NEGATIVO	NEGATIVO
47	M	3	4	POSITIVO	POSITIVO
48	M	3	5	NEGATIVO	POSITIVO
49	M	2	3	NEGATIVO	NEGATIVO
50	M	3	2	NEGATIVO	NEGATIVO
51	M	2	3	POSITIVO	POSITIVO
52	M	3	5	NEGATIVO	POSITIVO
53	M	3	3	NEGATIVO	NEGATIVO
54	F	4	4	POSITIVO	NEGATIVO
55	M	0	1	NEGATIVO	NEGATIVO
56	M	4	2	POSITIVO	NEGATIVO
57	M	2	2	NEGATIVO	POSITIVO
58	M	5	5	NEGATIVO	NEGATIVO
59	M	3	3	POSITIVO	POSITIVO
60	M	4	4	NEGATIVO	NEGATIVO
61	M	3	2	NEGATIVO	NEGATIVO
62	M	4	2	NEGATIVO	NEGATIVO
63	M	3	2	NEGATIVO	POSITIVO
64	M	3	4	POSITIVO	POSITIVO

65	M	3	4	NEGATIVO	POSITIVO
66	M	3	7	NEGATIVO	POSITIVO
67	M	6	7	NEGATIVO	POSITIVO
68	M	3	7	NEGATIVO	POSITIVO
69	M	6	6	NEGATIVO	NEGATIVO
70	F	4	5	NEGATIVO	POSITIVO
71	M	6	5	NEGATIVO	NEGATIVO
72	M	8	7	NEGATIVO	NEGATIVO
73	F	4	7	NEGATIVO	NEGATIVO
74	M	5	4	NEGATIVO	NEGATIVO
75	M	4	4	NEGATIVO	NEGATIVO
76	M	4	6	NEGATIVO	NEGATIVO
77	M	5	7	NEGATIVO	POSITIVO
78	F	3	6	POSITIVO	POSITIVO
79	M	4	8	NEGATIVO	NEGATIVO
80	M	4	9	NEGATIVO	NEGATIVO
81	M	3	5	NEGATIVO	NEGATIVO
82	M	4	8	NEGATIVO	POSITIVO
83	M	5	6	NEGATIVO	NEGATIVO
84	M	3	8	POSITIVO	POSITIVO
85	M	5	9	NEGATIVO	NEGATIVO
86	M	7	6	NEGATIVO	NEGATIVO
87	F	5	5	NEGATIVO	POSITIVO
88	M	3	7	NEGATIVO	NEGATIVO
89	M	4	6	NEGATIVO	POSITIVO
91	F	4	6	NEGATIVO	NEGATIVO
92	M	3	6	POSITIVO	POSITIVO
93	M	5	4	NEGATIVO	NEGATIVO
94	F	3	3	NEGATIVO	NEGATIVO
96	M	6	7	NEGATIVO	NEGATIVO
97	F	3	5	NEGATIVO	POSITIVO
98	M	5	8	NEGATIVO	POSITIVO
99	M	6	6	NEGATIVO	NEGATIVO
100	M	3	6	NEGATIVO	POSITIVO
101	M	3	8	NEGATIVO	NEGATIVO
102	M	4	8	NEGATIVO	NEGATIVO
103	M	7	7	NEGATIVO	NEGATIVO
104	M	3	3	NEGATIVO	NEGATIVO
105	M	3	8	NEGATIVO	NEGATIVO
106	M	5	4	NEGATIVO	NEGATIVO
107	F	5	6	NEGATIVO	NEGATIVO
108	F	3	3	NEGATIVO	NEGATIVO
109	F	3	5	NEGATIVO	POSITIVO
110	M	4	5	NEGATIVO	NEGATIVO
111	M	4	7	NEGATIVO	NEGATIVO
112	F	3	4	NEGATIVO	POSITIVO
113	F	5	6	NEGATIVO	NEGATIVO
114	F	4	6	NEGATIVO	NEGATIVO
115	M	4	7	POSITIVO	POSITIVO
116	M	7	4	NEGATIVO	NEGATIVO
117	M	5	6	NEGATIVO	NEGATIVO
118	M	6	7	NEGATIVO	POSITIVO
119	F	4	8	NEGATIVO	NEGATIVO
120	M	8	6	POSITIVO	POSITIVO
121	M	6	5	POSITIVO	NEGATIVO
122	M	6	5	NEGATIVO	NEGATIVO
123	M	6	4	NEGATIVO	NEGATIVO
124	M	4	5	NEGATIVO	NEGATIVO
125	M	6	8	NEGATIVO	NEGATIVO
126	M	6	7	NEGATIVO	NEGATIVO
127	F	4	5	POSITIVO	NEGATIVO
128	M	4	7	NEGATIVO	NEGATIVO
129	M	4	5	NEGATIVO	NEGATIVO
130	M	4	5	POSITIVO	POSITIVO
131	M	5	6	NEGATIVO	NEGATIVO
132	M	5	5	POSITIVO	NEGATIVO
133	F	7	5	NEGATIVO	NEGATIVO
134	F	5	7	NEGATIVO	NEGATIVO
135	M	4	5	NEGATIVO	NEGATIVO
136	M	6	8	NEGATIVO	NEGATIVO

137	F	3	8	NEGATIVO	NEGATIVO
138	M	5	7	NEGATIVO	NEGATIVO
139	M	5	12	NEGATIVO	NEGATIVO
140	M	5	7	NEGATIVO	NEGATIVO
141	M	3	5	NEGATIVO	NEGATIVO
142	F	6	5	NEGATIVO	NEGATIVO
143	F	3	8	NEGATIVO	NEGATIVO
144	M	4	8	NEGATIVO	NEGATIVO
145	F	5	7	POSITIVO	NEGATIVO
146	M	8	8	NEGATIVO	NEGATIVO
147	M	4	12	NEGATIVO	NEGATIVO
148	M	5	8	NEGATIVO	NEGATIVO
149	M	5	6	NEGATIVO	NEGATIVO
150	F	5	7	NEGATIVO	POSITIVO
151	M	5	8	POSITIVO	NEGATIVO
152	F	4	7	NEGATIVO	NEGATIVO
153	M	5	4	NEGATIVO	NEGATIVO
154	M	4	10	NEGATIVO	NEGATIVO
155	M	4	7	NEGATIVO	NEGATIVO
156	F	5	7	NEGATIVO	NEGATIVO
157	M	6	7	NEGATIVO	NEGATIVO
158	M	5	7	NEGATIVO	NEGATIVO
159	M	4	8	NEGATIVO	POSITIVO
160	M	5	6	NEGATIVO	NEGATIVO
161	M	5	8	NEGATIVO	NEGATIVO
162	M	3	9	POSITIVO	NEGATIVO
163	M	6	6	NEGATIVO	NEGATIVO
164	M	5	6	NEGATIVO	NEGATIVO
165	M	5	8	NEGATIVO	NEGATIVO
166	M	3	6	NEGATIVO	NEGATIVO
167	M	4	7	NEGATIVO	NEGATIVO
168	F	4	8	NEGATIVO	NEGATIVO
169	M	5	7	NEGATIVO	NEGATIVO
170	F	6	8	NEGATIVO	NEGATIVO
171	M	8	8	POSITIVO (42%)	NEGATIVO
172	F	4	8	NEGATIVO	NEGATIVO
173	M	8	7	NEGATIVO	NEGATIVO
174	M	4	7	NEGATIVO	NEGATIVO
175	M	6	8	NEGATIVO	NEGATIVO
176	F	2	9	NEGATIVO	NEGATIVO
177	M	8	9	NEGATIVO	NEGATIVO
178	M	3	8	POSITIVO	POSITIVO
179	F	5	8	POSITIVO	NEGATIVO
180	M	6	7	NEGATIVO	NEGATIVO
181	M	4	8	NEGATIVO	NEGATIVO
182	M	4	8	NEGATIVO	NEGATIVO
183	F	6	8	POSITIVO	NEGATIVO

* Amostras de número 24, 90 e 95 não foram utilizadas por apresentarem-se hemolisadas.

APENDICE B – Números das amostras na sequência de realização dos testes de C-ELISA (Placas 1a, 2a, 3a, 4a), resultados de absorbância obtidos no leitor de placa (Placas 1b, 2b, 3b, 4b) e porcentagem de inibição (Placas 1c, 2c, 3c, 4c) para *Theileria equi* – São Paulo - 2009

PLACA 1a - *Theileria equi*

Média dos Controles Negativos = 0,827

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C+	C-	96	96	97	97	98	98	99	99	100	100
B	101	101	102	102	103	103	104	104	105	105	106	106
C	107	107	108	108	109	109	110	110	111	111	112	112
D	113	113	114	114	115	115	116	116	117	117	C+	C-
E	118	118	119	119	120	120	121	121	122	122	123	123
F	124	124	125	125	126	126	127	127	128	128	129	129
G	130	130	131	131	132	132	133	133	134	134	135	135
H	136	136	137	137	138	138	139	139	140	140	C+	C-

PLACA 1b - *Theileria equi*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,243	0,878	0,893	0,792	0,788	0,804	0,806	0,821	0,796	0,764	0,811	0,86
B	0,762	0,776	0,799	0,762	0,793	0,836	0,789	0,783	0,797	0,791	0,792	0,825
C	0,757	0,783	0,78	0,801	0,804	0,793	0,801	0,79	0,796	0,803	0,772	0,776
D	0,739	0,735	0,775	0,756	0,238	0,243	0,789	0,802	0,781	0,789	0,244	0,803
E	0,76	0,768	0,768	0,77	0,241	0,248	0,202	0,196	0,802	0,798	0,797	0,811
F	0,757	0,744	0,730	0,783	0,79	0,791	0,162	0,159	0,811	0,808	0,805	0,802
G	0,185	0,175	0,766	0,753	0,352	0,349	0,798	0,801	0,784	0,821	0,816	0,806
H	0,789	0,817	0,846	0,762	0,753	0,774	0,771	0,791	0,822	0,801	0,275	0,799

PLACA 1c - *Theileria equi*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	70,62	C-	-7,98	4,23	4,72	2,78	2,54	0,73	3,75	7,62	1,93	-3,99
B	7,86	6,17	3,39	7,86	4,11	-1,09	4,59	5,32	3,63	4,35	4,23	0,24
C	8,46	5,32	5,68	3,14	2,78	4,11	3,14	4,47	3,75	2,90	6,65	6,17
D	10,64	11,12	6,29	8,59	21,22	70,62	4,59	3,02	5,56	4,59	70,50	C-
E	8,10	7,13	7,13	6,89	74,49	73,64	75,57	76,30	3,02	3,51	3,63	1,93
F	8,46	10,04	11,73	5,32	4,47	4,35	80,41	80,77	1,93	2,30	2,66	3,02
G	77,63	78,84	7,38	8,95	57,44	57,80	3,51	3,14	5,20	0,73	1,33	2,54
H	4,59	1,21	-2,30	7,86	8,95	6,41	6,77	4,35	0,60	3,14	66,75	C-

PLACA 2a - *Theileria equi*

Média dos Controles Negativos = 0,740

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C+	C-	141	141	142	142	143	144	144	145	145	
B	146	146	147	147	148	148	149	149	150	150	151	151
C	152	152	153	153	154	154	155	155	156	156	157	157
D	158	158	159	159	160	160	161	161	162	162	C+	C-
E	163	163	164	164	165	165	166	166	167	167	168	168
F	169	169	170	170	171	171	172	172	173	173	174	174
G	175	175	176	176	177	177	178	178	179	179	180	180
H	181	181	182	182	183	183	184	184	94	94	C+	C-

PLACA 2b - *Theileria equi*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,277	0,680	0,697	0,673	0,703	0,717	0,733	0,765	0,767	0,801	0,329	0,326
B	0,716	0,685	0,663	0,676	0,712	0,735	0,770	0,802	0,786	0,812	0,147	0,146
C	0,663	0,655	0,669	0,695	0,687	0,691	0,761	0,774	0,759	0,771	0,779	0,722
D	0,65	0,636	0,669	0,685	0,684	0,681	0,739	0,783	0,303	0,303	0,274	0,744
E	0,633	0,660	0,668	0,654	0,684	0,709	0,733	0,770	0,720	0,731	0,747	0,724
F	0,644	0,640	0,659	0,674	0,429	0,432	0,749	0,745	0,746	0,751	0,729	0,749
G	0,683	0,635	0,650	0,658	0,646	0,702	0,245	0,260	0,306	0,308	0,726	0,756
H	0,763	0,679	0,634	0,671	0,235	0,237	0,747	0,725	0,705	0,758	0,291	0,795

PLACA 2c - *Theileria equi*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	62,57	C-	5,81	9,05	5,00	3,11	0,95	-3,38	-3,65	-8,24	55,54	55,95
B	3,24	7,43	10,41	8,65	3,78	0,68	-4,05	-8,38	-6,22	-9,73	80,14	80,27
C	10,41	11,49	9,59	6,08	7,16	6,62	-2,84	-4,59	-2,57	-4,19	-5,27	2,43
D	12,16	14,05	9,59	11,49	7,57	7,97	0,14	-5,81	59,05	59,05	62,97	C-
E	14,46	10,81	9,73	11,62	7,57	4,19	0,95	-4,05	2,70	1,22	-0,95	2,16
F	12,97	13,51	10,95	8,92	42,03	41,62	-1,22	-0,68	-0,81	-1,49	1,49	-1,22
G	7,70	14,19	12,16	11,08	12,70	5,14	66,89	64,86	58,65	58,65	1,89	-2,16
H	-3,11	8,24	14,32	9,32	68,24	67,97	-0,95	2,03	4,73	-2,43	60,68	C-

PLACA 3a - *Theileria equi*

Média dos Controles Negativos = 0,769

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C+	C-	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5
B	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10	11	11
C	12	12	13	13	14	14	15	15	16	16	17	17
D	18	18	19	19	20	20	21	21	22	22	C+	C-
E	23	23	25	25	26	26	27	27	28	28	29	29
F	30	30	31	31	32	32	33	33	34	34	35	35
G	36	36	37	37	38	38	39	39	40	40	41	41
H	42	42	43	43	44	44	45	45	46	46	C+	C-

PLACA 3b - *Theileria equi*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,265	0,732	0,706	0,699	0,705	0,678	0,714	0,718	0,736	0,726	0,731	0,76
B	0,717	0,706	0,707	0,712	0,702	0,724	0,759	0,772	0,769	0,795	0,210	0,233
C	0,710	0,674	0,689	0,708	0,686	0,723	0,721	0,723	0,768	0,739	0,733	0,735
D	0,705	0,666	0,717	0,695	0,699	0,731	0,747	0,734	0,744	0,758	0,258	0,759
E	0,679	0,707	0,689	0,683	0,676	0,719	0,726	0,710	0,731	0,736	0,75	0,734
F	0,712	0,704	0,691	0,689	0,674	0,713	0,725	0,761	0,748	0,733	0,724	0,771
G	0,702	0,687	0,589	0,624	0,682	0,707	0,723	0,707	0,726	0,728	0,295	0,315
H	0,798	0,842	0,736	0,764	0,798	0,711	0,734	0,741	0,733	0,747	0,273	0,816

PLACA 3c - *Theileria equi*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	65,54	C-	8,19	9,10	8,32	11,83	7,15	6,63	4,29	5,59	4,94	1,17
B	6,76	8,19	8,06	7,41	8,71	5,85	1,30	-0,39	0,00	-3,38	72,69	69,70
C	7,67	12,35	10,40	7,93	10,79	5,98	6,24	5,98	0,13	3,90	4,68	4,42
D	8,32	13,39	6,76	9,62	9,10	4,94	2,86	4,55	3,25	1,43	66,45	C-
E	11,70	8,06	10,40	11,18	12,09	6,50	5,59	7,67	4,94	4,29	2,47	4,55
F	7,41	8,45	10,14	10,40	12,35	7,28	5,72	1,04	2,73	4,68	5,85	-0,26
G	8,71	10,66	23,41	18,86	11,31	8,06	5,98	8,06	5,59	5,33	61,64	59,04
H	-3,77	-9,49	4,29	0,65	-3,77	7,54	4,55	3,64	4,68	2,86	64,50	C-

PLACA 4a - *Theileria equi*

Média dos Controles Negativos = 0,684

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C+	C-	47	47	48	48	49	49	50	50	51	51
B	52	52	53	53	54	54	55	55	56	56	57	57
C	58	58	59	59	60	60	61	61	62	62	63	63
D	64	64	65	65	66	66	67	67	68	68	C+	C-
E	69	69	70	70	71	71	72	72	73	73	74	74
F	77	77	78	78	79	79	80	80	81	81	82	82
G	83	83	84	84	85	85	86	86	87	87	88	88
H	89	89	91	91	92	92	93	93			C+	C-

PLACA 4b - *Theileria equi*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,249	0,697	0,175	0,167	0,636	0,645	0,636	0,681	0,708	0,68	0,151	0,139
B	0,593	0,607	0,603	0,632	0,231	0,224	0,612	0,672	0,211	0,202	0,679	0,721
C	0,612	0,633	0,284	0,276	0,612	0,649	0,612	0,619	0,644	0,631	0,638	0,662
D	0,225	0,221	0,616	0,598	0,582	0,576	0,601	0,611	0,619	0,641	0,220	0,628
E	0,603	0,591	0,611	0,623	0,603	0,601	0,611	0,617	0,621	0,621	0,573	0,611
F	0,592	0,613	0,134	0,142	0,572	0,601	0,612	0,629	0,624	0,617	0,624	0,637
G	0,533	0,534	0,226	0,205	0,583	0,612	0,583	0,585	0,606	0,615	0,607	0,632
H	0,644	0,626	0,701	0,633	0,135	0,109	0,596	0,602			0,228	0

APENDICE C – Números das amostras na sequência de realização dos testes de C-ELISA (Placas 1a, 2a, 3a, 4a), resultados de absorbância obtidos no leitor de placa (Placas 1b, 2b, 3b, 4b) e porcentagem de inibição (Placas 1c, 2c, 3c, 4c) para *Babesia caballi* – São Paulo - 2009

PLACA 1a - *Babesia caballi* Média dos Controles Negativos = 0,845

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C+	C-	96	96	97	97	98	98	99	99	100	100
B	101	101	102	102	103	103	104	104	105	105	106	106
C	107	107	108	108	109	109	110	110	111	111	112	112
D	113	113	114	114	115	115	116	116	117	117	C+	C-
E	118	118	119	119	120	120	121	121	122	122	123	123
F	124	124	125	125	126	126	127	127	128	128	129	129
G	130	130	131	131	132	132	133	133	134	134	135	135
H	136	136	137	137	138	138	139	139	140	140	C+	C-

PLACA 2a - *Babesia caballi* Média dos Controles Negativos = 0,683

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C+	C-	141	141	142	142	143	143	144	144	145	145
B	146	146	147	147	148	148	149	149	150	150	151	151
C	152	152	153	153	154	154	155	155	156	156	157	157
D	158	158	159	159	160	160	161	161	162	162	C+	C-
E	163	163	164	164	165	165	166	166	167	167	168	168
F	169	169	170	170	171	171	172	172	173	173	174	174
G	175	175	176	176	177	177	178	178	179	179	180	180
H	181	181	182	182	183	183	184	184	94	94	C+	C-

PLACA 3a - *Babesia caballi* Média dos Controles Negativos = 0,640

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C+	C-	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5
B	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10	11	11
C	12	12	13	13	14	14	15	15	16	16	17	17
D	18	18	19	19	20	20	21	21	22	22	C+	C-
E	23	23	25	25	26	26	27	27	28	28	29	29
F	30	30	31	31	32	32	33	33	34	34	35	35
G	36	36	37	37	38	38	39	39	40	40	41	41
H	42	42	43	43	44	44	45	45	46	46	C+	C-

PLACA 4a - *Babesia caballi* Média dos Controles Negativos = 0,597

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C+	C-	47	47	48	48	49	49	50	50	51	51
B	52	52	53	53	54	54	55	55	56	56	57	57
C	58	58	59	59	60	60	61	61	62	62	63	63
D	64	64	65	65	66	66	67	67	68	68	C+	C-
E	69	69	70	70	71	71	72	72	73	73	74	74
F	77	77	78	78	79	79	80	80	81	81	82	82
G	83	83	84	84	85	85	86	86	87	87	88	88
H	89	89	91	91	92	92	93	93			C+	C-

PLACA 1b - *Babesia caballi*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,126	0,801	0,835	0,837	0,174	0,172	0,305	0,298	0,889	0,888	0,165	0,164
B	0,792	0,901	0,945	0,936	0,921	0,906	0,938	0,94	0,986	0,992	0,998	1,048
C	0,782	0,835	0,839	0,856	0,182	0,182	0,875	0,869	0,686	0,658	0,103	0,115
D	0,611	0,65	0,523	0,514	0,094	0,099	0,897	0,842	0,877	0,893	0,153	0,919
E	0,357	0,351	0,772	0,777	0,374	0,356	0,883	0,852	0,889	0,874	0,913	0,921
F	0,789	0,814	0,862	0,842	0,888	0,879	0,882	0,863	0,9	0,901	0,906	0,923
G	0,098	0,101	0,879	0,927	0,885	0,885	0,821	0,832	0,829	0,838	0,855	0,845
H	0,577	0,691	0,777	0,79	0,785	0,789	0,894	0,826	0,807	0,817	0,143	0,819

PLACA 2b - *Babesia caballi*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,101	0,693	0,706	0,69	0,653	0,676	0,611	0,6	0,699	0,69	0,716	0,745
B	0,776	0,787	0,722	0,725	0,726	0,728	0,697	0,701	0,252	0,241	0,768	0,798
C	0,732	0,719	0,65	0,656	0,675	0,684	0,638	0,636	0,685	0,696	0,641	0,647
D	0,691	0,701	0,393	0,378	0,698	0,689	0,662	0,67	0,68	0,672	0,123	0,699
E	0,695	0,709	0,69	0,675	0,633	0,629	0,662	0,67	0,679	0,695	0,655	0,678
F	0,721	0,713	0,699	0,694	0,682	0,719	0,648	0,683	0,674	0,667	0,66	0,639
G	0,667	0,664	0,656	0,645	0,649	0,662	0,121	0,112	0,656	0,653	0,618	0,581
H	0,72	0,684	0,682	0,68	0,691	0,71	0,665	0,74	0,716	0,674	0,100	0,657

PLACA 3b - *Babesia caballi*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,120	0,686	0,409	0,375	0,090	0,089	0,198	0,148	0,445	0,419	0,195	0,149
B	0,100	0,095	0,122	0,127	0,488	0,456	0,506	0,491	0,377	0,363	0,531	0,512
C	0,169	0,124	0,216	0,205	0,146	0,164	0,122	0,135	0,134	0,128	0,128	0,107
D	0,184	0,158	0,106	0,103	0,569	0,531	0,456	0,461	0,492	0,453	0,093	0,466
E	0,462	0,383	0,648	0,608	0,581	0,555	0,597	0,581	0,528	0,528	0,495	0,455
F	0,714	0,646	0,715	0,729	0,759	0,467	0,697	0,629	0,596	0,470	0,506	0,535
G	0,118	0,113	0,634	0,623	0,622	0,605	0,591	0,575	0,116	0,137	0,357	0,336
H	0,893	0,786	0,104	0,097	0,075	0,078	0,570	0,590	0,576	0,581	0,102	0,768

PLACA 4b - *Babesia caballi*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,108	0,589	0,109	0,11	0,144	0,144	0,615	0,589	0,586	0,544	0,091	0,088
B	0,268	0,24	0,573	0,59	0,514	0,521	0,585	0,547	0,564	0,16	0,089	
C	0,389	0,379	0,093	0,101	0,557	0,559	0,655	0,582	0,548	0,483	0,109	0,116
D	0,103	0,084	0,074	0,073	0,093	0,078	0,36	0,339	0,083	0,069	0,09	0,492
E	0,656	0,617	0,173	0,166	0,572	0,574	0,574	0,525	0,472	0,465	0,484	0,526
F	0,209	0,175	0,091	0,072	0,563	0,555	0,371	0,410	0,541	0,549	0,336	0,37
G	0,618	0,601	0,121	0,092	0,578	0,577	0,599	0,579	0,181	0,099	0,539	0,555
H	0,091	0,081	0,745	0,602	0,079	0,084	0,583	0,61			0,123	0,656

PLACA 1c - *Babesia caballi*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	85,09	C-	1,18	0,95	79,41	79,64	63,91	64,73	-5,21	-5,09	80,47	80,59
B	6,27	-6,63	-11,83	-10,77	-8,99	-7,22	-11,01	-11,24	-16,69	-17,40	-18,11	-24,02
C	7,46	1,18	0,71	-1,30	78,46	78,46	-3,55	-2,84	18,82	22,13	87,81	86,39
D	27,69	23,08	38,11	39,17	88,88	88,28	-6,15	0,36	-3,79	-5,68	81,89	C-
E	57,75	58,46	8,64	8,05	55,74	57,87	-4,50	-0,83	-5,21	-3,43	-8,05	-8,99
F	6,63	3,67	-2,01	0,36	-5,09	-4,02	-4,38	-2,13	-6,51	-6,63	-7,22	-9,23
G	88,40	88,05	-4,02	-9,70	-4,73	-4,73	2,84	1,54	1,89	0,83	-1,18	0,00
H	31,72	18,22	8,05	6,51	7,10	6,63	-5,80	2,25	4,50	3,31	83,08	C-

PLACA 2c - *Babesia caballi*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	85,21	C-	-3,37	-1,02	4,39	1,02	10,54	12,15	-2,34	-1,02	-4,83	-9,08
B	-13,62	-15,23	-5,71	-6,15	-6,30	-6,59	-2,05	-2,64	63,10	64,71	-12,45	-16,84
C	-7,17	-5,27	-4,83	3,95	1,17	-0,15	6,59	6,88	-0,29	-1,90	6,15	5,27
D	-1,17	-2,64	-2,46	44,65	-2,20	-0,88	3,07	1,90	0,44	1,61	81,99	C-
E	-1,76	-3,81	-1,02	1,17	7,32	7,91	3,07	1,90	0,59	-1,76	4,10	0,73
F	-5,56	-4,39	-2,34	-1,61	0,15	-5,27	5,12	0,00	1,32	2,34	3,37	6,44
G	2,34	4,25	3,95	5,56	4,98	3,07	82,28	83,60	3,95	4,39	9,52	14,93
H	-5,42	-0,15	0,15	0,44	-1,17	-3,95	2,64	-8,35	-4,83	1,32	85,36	C-

PLACA 3c - *Babesia caballi*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	81,25	C-	36,09	41,41	85,94	86,09	75,31	76,88	30,47	34,53	75,78	76,72
B	84,38	85,16	80,94	80,16	23,75	28,75	20,94	23,28	41,09	42,34	17,03	20,00
C	73,59	80,63	66,25	67,97	77,19	74,38	80,94	78,91	79,06	80,31	80,00	83,28
D	71,25	75,31	83,44	83,91	11,09	17,03	28,75	27,97	23,13	29,22	85,47	C-
E	27,81	40,16	-1,25	5,00	9,22	13,28	6,72	9,22	17,50	17,50	22,66	28,91
F	-11,56	-0,94	-11,72	-13,91	-18,59	27,03	-8,91	1,72	6,88	26,56	20,94	16,41
G	81,56	82,34	0,94	2,66	2,81	5,47	7,66	10,16	81,88	78,59	44,22	47,50
H	-39,53	-22,81	83,75	84,84	88,28	87,81	10,94	7,81	10,00	9,22	84,06	C-</

ANEXO A – Instruções para a técnica de C-ELISA para *Babesia caballi* - página 1

USDA Product Code 501A.20 • For veterinary use only

General Description

This competitive enzyme-linked immunosorbent assay (cELISA) detects *B. caballi* antibodies in equine sera. Sample serum *B. caballi* antibody inhibits binding of primary monoclonal antibody. The binding of primary monoclonal antibody to the antigen-coated plate is detected with HRP-labeled secondary antibody. Finally, the presence of HRP-labeled secondary antibody is quantified by the addition of enzyme substrate and subsequent color product development. Strong color development indicates little or no inhibition of primary monoclonal antibody binding and therefore the absence of *B. caballi* antibody in sample sera. Weak color development due to inhibition of the primary monoclonal antibody binding to the antigen on the solid phase indicates the presence of *B. caballi* antibodies in sample sera.

Kit Contents

Component	273-2	273-5
A Antigen-Coated Plates	2 plates	5 plates
B Positive Control	2 ml	4 ml
C Negative Control	2 ml	4 ml
D 100X Primary Antibody	300 µl	500 µl
E 100X Secondary Antibody-Peroxidase Conjugate	300 µl	500 µl
F Antibody Diluting Buffer	60 ml	120 ml
G Serum Diluting Buffer	9 ml	25 ml
H 10X Wash Solution Concentrate	120 ml	2 x 120 ml
I Substrate Solution	30 ml	60 ml
J Stop Solution	30 ml	60 ml

This insert with Setup Record for recording sample identifications and results.

Materials Required But Not Included in the Test Kit

Single and multichannel adjustable-volume pipettors and disposable plastic tips. Test tubes or non-antigen-coated transfer plate(s). ELISA microplate reader or spectrophotometer with 620, 630 or 650 nm filter. Deionized or distilled water. Paper towels. Multichannel pipettor reservoirs. Graduated cylinder. Wash bottle, manual multichannel washing device or automatic plate washer. Timer.

Storage and Stability

Store all reagents at 2-7°C (35-45°F). **Do not freeze.** Reagents will remain stable until the expiration date when stored as instructed. **Do not use test kit past the expiration date printed on the box.**

Precautions

Do not eat, drink or smoke where serum samples and kit reagents are handled. Do not pipette by mouth. Some reagents contain ProClin®300 or sodium fluoride. These chemicals may be harmful if ingested. If ingested, seek medical attention. Do not use expired or contaminated reagents, or reagents from other kits. Do not mix reagents from different lots of this same product.

ANEXO B – Instruções para a técnica de C-ELISA para *Babesia caballi* - página 2

Preparation

- a. **Warm up reagents:** Bring the serum samples, reagents and plate(s) to room temperature prior to starting the test.
- b. **Prepare controls and samples:** The Positive and Negative Controls (**B & C**) and test serum samples must be diluted 1:2 with Serum Diluting Buffer (**G**) for use in the test. It is recommended that these dilutions be made in a non-antigen-coated transfer plate. Run Positive Control (**B**) in duplicate and Negative Control (**C**) in triplicate, regardless of the number of serum samples to be tested. When whole plates are used, it is best to put the controls in wells on different parts of the plate. Controls must be run on every plate. Enter the control and serum sample IDs on a photocopy of the attached Setup Record.
- c. **Prepare plates:** Remove the plate(s) from the foil pouch(es) (**A**). *If applicable:* Return any unused strips to the pouch and securely seal it. Call VMRD for extra pouches and sealer. Place strips to be used in the frame and number the top of each strip to maintain orientation with the Setup Record. Always mark the strips in case they fall out of the frame during washing.
- d. **Prepare primary antibody:** Prepare 1X Primary Antibody by diluting 1 part of the 100X Primary Antibody (**D**) with 99 parts of Antibody Diluting Buffer (**F**). Example: For 96 wells, mix 60 µl of 100X Primary Antibody (**D**) with 5.940 ml of Antibody Diluting Buffer (**F**) to yield 6 ml of 1X Primary Antibody. Fifty microliters (50 µl) are needed per well.
- e. **Prepare secondary antibody-peroxidase conjugate:** Prepare 1X Secondary Antibody-Peroxidase Conjugate by diluting 1 part of the 100X Secondary Antibody-Peroxidase Conjugate (**E**) with 99 parts of Antibody Diluting Buffer (**F**). Example: For 96 wells, mix 60 µl of 100X Secondary Antibody-Peroxidase Conjugate (**E**) with 5.940 ml of Antibody Diluting Buffer (**F**) to yield 6 ml of 1X Secondary Antibody-Peroxidase Conjugate. Fifty microliters (50 µl) are needed per well.
- f. **Prepare wash solution:** Prepare 1X Wash Solution by diluting 1 part of the 10X Wash Solution Concentrate (**H**) with 9 parts of deionized or distilled water. Approximately 1.8 ml are needed per well. Allow extra quantity for reservoirs, tubing, pipetting, etc.

Test Procedure

1. **Load controls and serum samples:** Using a pipettor set at 50 µl, transfer diluted controls and serum samples to the Antigen-Coated Plate (**A**) according to the Setup Record. Tap the side of the loaded assay plate several times to make sure the samples coat the bottom of the wells. Use care not to spill samples from well to well. Incubate the plate 30 minutes at room temperature (21-25°C, 70-77°F).
2. **Wash wells:** After the 30-minute incubation, wash the plate 3 times:
If an automatic washer is used, place the plate on the washing apparatus and wash plate 3 times, filling the wells each time with 1X Wash Solution.
If manual washing is used, dump contents of the wells into a sink and remove the remaining sera and controls by sharply striking the inverted plate 4 times on a clean paper towel, striking a clean area each time. Immediately fill each

ANEXO C – Instruções para a técnica de C-ELISA para *Babesia caballi* - página 3

well with 1X Wash Solution using repeating syringe with a manifold, wash bottle or multichannel pipettor. Dump out the Wash Solution and strike the inverted plate sharply on a clean paper towel as above. Repeat the washing procedure 2 more times (3 washes total).

3. **Add primary antibody:** Add 50 µl of diluted (1X) Primary Antibody to each well. Tap the side of the loaded assay plate several times to make sure the primary antibody coats the bottom of the wells. Incubate for an additional 30 minutes at room temperature (21-25°C, 70-77°F).
4. **Wash wells:** After the second 30-minute incubation, wash the plate 3 times as in Step 2.
5. **Add secondary antibody-peroxidase conjugate:** Add 50 µl of diluted (1X) Secondary Antibody-Peroxidase Conjugate to each well. Tap the side of the loaded assay plate several times to make sure the conjugate coats the bottom of the wells. Incubate for an additional 30 minutes at room temperature (21-25°C, 70-77°F).
6. **Wash wells:** After the third 30-minute incubation, wash the plate 3 times as in Step 2.
7. **Add substrate solution:** Add 50 µl of Substrate Solution (I) to each well. Tap the side of the loaded assay plate several times to make sure the substrate coats the bottom of the wells. Incubate 15 minutes at room temperature (21-25°C; 70-77°F). Avoid leaving the plate in direct sunlight. *Do not empty wells.*
8. **Add stop solution:** Add 50 µl of Stop Solution (J) to each well. Tap the side of the loaded assay plate several times to mix the Substrate Solution and the Stop Solution. *Do not empty wells.*
9. **Read and record the test results:** Immediately after adding the Stop Solution, the plate should be read on a plate reader. Set the optical density (O.D.) reading wavelength to 620, 630 or 650 nm. Blank the reader on air and read plate(s). Some readers require an empty well on the plate for blanking. In this case, no reagents should be added to this well.
10. Return all remaining kit reagents to 2-7°C (35-45°F) for storage.

Test Validation

- The mean of the **Negative Controls** must produce an optical density >0.300 and <2.000.
- The mean of the **Positive Controls** must produce an inhibition of ≥ 40%.

Calculation of percent inhibition (% I):

$$\% I = 100 - [(Sample\ O.D. \times 100) \div (Mean\ Negative\ Control\ O.D.)]$$

Interpreting the Results

- If a test sample produces ≥ 40% inhibition, it is positive.
- If a test sample produces <40% inhibition, it is negative.

ANEXO D – Instruções para a técnica de C-ELISA para *Babesia caballi* - página 4

SETUP RECORD

	12							
	11							
	10							
	9							
	8							
	7							
	6							
	5							
	4							
	3							
	2							
	1							
A								
B								
C								
D								
E								
F								
G								
H								

Date: _____ Case ID: _____ Kit Serial: _____ Catalog Nos.: 273-2 and 273-5

ANEXO E – Instruções para a técnica de C-ELISA para *Theileria equi* - página 1
**BABESIA EQUI ANTIBODY TEST KIT,
cELISA**
Assay instructions for catalog numbers: 274-2 and 274-5

USDA Product Code 501B.20 • For veterinary use only

General Description

This competitive enzyme-linked immunosorbent assay (cELISA) detects *B. equi* antibodies in equine sera. Sample serum *B. equi* antibody inhibits binding of primary monoclonal antibody. The binding of primary monoclonal antibody to the antigen-coated plate is detected with HRP-labeled secondary antibody. Finally, the presence of HRP-labeled secondary antibody is quantified by the addition of enzyme substrate and subsequent color product development. Strong color development indicates little or no inhibition of primary monoclonal antibody binding and therefore the absence of *B. equi* antibody in sample sera. Weak color development due to inhibition of the primary monoclonal antibody binding to the antigen on the solid phase indicates the presence of *B. equi* antibodies in sample sera.

Kit Contents

Component	274-2	274-5
A Antigen-Coated Plates	2 plates	5 plates
B Positive Control	2 ml	4 ml
C Negative Control	2 ml	4 ml
D 100X Primary Antibody	300 µl	500 µl
E 100X Secondary Antibody-Peroxidase Conjugate	300 µl	500 µl
F Antibody Diluting Buffer	60 ml	120 ml
G Serum Diluting Buffer	9 ml	25 ml
H 10X Wash Solution Concentrate	120 ml	2 x 120 ml
I Substrate Solution	30 ml	60 ml
J Stop Solution	30 ml	60 ml

This insert with Setup Record for recording sample identifications and results.

Materials Required But Not Included in the Test Kit

Single and multichannel adjustable-volume pipettors and disposable plastic tips. Test tubes or non-antigen-coated transfer plate(s). ELISA microplate reader or spectrophotometer with 620, 630 or 650 nm filter. Deionized or distilled water. Paper towels. Multichannel pipettor reservoirs. Graduated cylinder. Wash bottle, manual multichannel washing device or automatic plate washer. Timer.

Storage and Stability

Store all reagents at 2-7°C (35-45°F). **Do not freeze.** Reagents will remain stable until the expiration date when stored as instructed. **Do not use test kit past the expiration date printed on the box.**

Precautions

Do not eat, drink or smoke where serum samples and kit reagents are handled. Do not pipette by mouth. Some reagents contain ProClin® 300 or sodium fluoride. These chemicals may be harmful if ingested. If ingested, seek medical attention. Do not use expired or contaminated reagents, or reagents from other kits. Do not mix reagents from different lots of this same product.

ANEXO F – Instruções para a técnica de C-ELISA para *Theileria equi* - página 2

Preparation

- a. **Warm up reagents:** Bring the serum samples, reagents and plate(s) to room temperature prior to starting the test.
- b. **Prepare controls and samples:** The Positive and Negative Controls (**B & C**) and test serum samples must be diluted 1:2 with Serum Diluting Buffer (**G**) for use in the test. It is recommended that these dilutions be made in a non-antigen-coated transfer plate. Run Positive Control (**B**) in duplicate and Negative Control (**C**) in triplicate, regardless of the number of serum samples to be tested. When whole plates are used, it is best to put the controls in wells on different parts of the plate. Controls must be run on every plate. Enter the control and serum sample IDs on a photocopy of the attached Setup Record.
- c. **Prepare plates:** Remove the plate(s) from the foil pouch(es) (**A**). *If applicable:* Return any unused strips to the pouch and securely seal it. Call VMRD for extra pouches and sealer. Place strips to be used in the frame and number the top of each strip to maintain orientation with the Setup Record. Always mark the strips in case they fall out of the frame during washing.
- d. **Prepare primary antibody:** Prepare 1X Primary Antibody by diluting 1 part of the 100X Primary Antibody (**D**) with 99 parts of Antibody Diluting Buffer (**F**). Example: For 96 wells, mix 60 µl of 100X Primary Antibody (**D**) with 5.940 ml of Antibody Diluting Buffer (**F**) to yield 6 ml of 1X Primary Antibody. Fifty microliters (50 µl) are needed per well.
- e. **Prepare secondary antibody-peroxidase conjugate:** Prepare 1X Secondary Antibody-Peroxidase Conjugate by diluting 1 part of the 100X Secondary Antibody-Peroxidase Conjugate (**E**) with 99 parts of Antibody Diluting Buffer (**F**). Example: For 96 wells, mix 60 µl of 100X Secondary Antibody-Peroxidase Conjugate (**E**) with 5.940 ml of Antibody Diluting Buffer (**F**) to yield 6 ml of 1X Secondary Antibody-Peroxidase Conjugate. Fifty microliters (50 µl) are needed per well.
- f. **Prepare wash solution:** Prepare 1X Wash Solution by diluting 1 part of the 10X Wash Solution Concentrate (**H**) with 9 parts of deionized or distilled water. Approximately 1.8 ml are needed per well. Allow extra quantity for reservoirs, tubing, pipetting, etc.

Test Procedure

1. **Load controls and serum samples:** Using a pipettor set at 50 µl, transfer diluted controls and serum samples to the Antigen-Coated Plate (**A**) according to the Setup Record. Tap the side of the loaded assay plate several times to make sure the samples coat the bottom of the wells. Use care not to spill samples from well to well. Incubate the plate 30 minutes at room temperature (21-25°C, 70-77°F).
2. **Wash wells:** After the 30-minute incubation, wash the plate 3 times:
If an automatic washer is used, place the plate on the washing apparatus and wash plate 3 times, filling the wells each time with 1X Wash Solution.
If manual washing is used, dump contents of the wells into a sink and remove the remaining sera and controls by sharply striking the inverted plate 4 times on a clean paper towel, striking a clean area each time. Immediately fill each

ANEXO G – Instruções para a técnica de C-ELISA para *Theileria equi* - página 3

well with 1X Wash Solution using repeating syringe with a manifold, wash bottle or multichannel pipettor. Dump out the Wash Solution and strike the inverted plate sharply on a clean paper towel as above. Repeat the washing procedure 2 more times (3 washes total).

3. **Add primary antibody:** Add 50 µl of diluted (1X) Primary Antibody to each well. Tap the side of the loaded assay plate several times to make sure the primary antibody coats the bottom of the wells. Incubate for an additional 30 minutes at room temperature (21-25°C, 70-77°F).
4. **Wash wells:** After the second 30-minute incubation, wash the plate 3 times as in Step 2.
5. **Add secondary antibody-peroxidase conjugate:** Add 50 µl of diluted (1X) Secondary Antibody-Peroxidase Conjugate to each well. Tap the side of the loaded assay plate several times to make sure the conjugate coats the bottom of the wells. Incubate for an additional 30 minutes at room temperature (21-25°C, 70-77°F).
6. **Wash wells:** After the third 30-minute incubation, wash the plate 3 times as in Step 2.
7. **Add substrate solution:** Add 50 µl of Substrate Solution (I) to each well. Tap the side of the loaded assay plate several times to make sure the substrate coats the bottom of the wells. Incubate 15 minutes at room temperature (21-25°C; 70-77°F). Avoid leaving the plate in direct sunlight. *Do not empty wells.*
8. **Add stop solution:** Add 50 µl of Stop Solution (J) to each well. Tap the side of the loaded assay plate several times to mix the Substrate Solution and the Stop Solution. *Do not empty wells.*
9. **Read and record the test results:** Immediately after adding the Stop Solution, the plate should be read on a plate reader. Set the optical density (O.D.) reading wavelength to 620, 630 or 650 nm. Blank the reader on air and read plate(s). Some readers require an empty well on the plate for blanking. In this case, no reagents should be added to this well.
10. Return all remaining kit reagents to 2-7°C (35-45°F) for storage.

Test Validation

- The mean of the **Negative Controls** must produce an optical density >0.300 and <2.000.
- The mean of the **Positive Controls** must produce an inhibition of ≥ 40%.

Calculation of percent inhibition (% I):

$$\% I = 100 - [(Sample\ O.D. \times 100) \div (Mean\ Negative\ Control\ O.D.)]$$

Interpreting the Results

- If a test sample produces ≥ 40% inhibition, it is positive.
- If a test sample produces <40% inhibition, it is negative.

ANEXO H – Instruções para a técnica de C-ELISA para *Theileria equi* - página 4

SETUP RECORD

12							
11							
10							
9							
8							
7							
6							
5							
4							
3							
2							
1							
A	B	C	D	E	F	G	H

Date: _____ Case ID: _____ Kit Serial: _____ Catalog Nos.: 273-2 and 273-5