



JOANA RAQUEL NOGUEIRA PAULINO

**DISTRIBUIÇÃO DE PIROPLASMOSE EM EQUINOS LUSITANOS EM
TERRITÓRIO NACIONAL AVALIADOS PARA EXPORTAÇÃO**

Orientadora: Professora Doutora Clárisse Coelho

Coorientadora: Professora Doutora Joana Simões

Universidade Lusófona

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2023

JOANA RAQUEL NOGUEIRA PAULINO

**DISTRIBUIÇÃO DE PIROPLASMOSE EM CAVALOS LUSITANOS EM
TERRITÓRIO NACIONAL AVALIADOS PARA EXPORTAÇÃO**

Dissertação defendida em provas públicas para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona, no dia 29 de Setembro de 2023, com o Despacho de Nomeação de Júri nº 329/2023, mediante a seguinte composição de júri:

Presidente: Prof.^a Doutora Mariana Baptista

Arguente: Prof.^a Doutora Ana Maria Munhoz

Orientadora: Prof.^a Doutora Clarisse Coelho

Coorientadora: Prof.^a Doutora Joana Simões

Universidade Lusófona

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2023

Agradecimentos

Agradeço, em primeiro lugar, à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona, à Diretora, Professora Doutora Laurentina Pedroso e a todo o corpo docente que integra esta instituição, por estes 6 anos de exigência e profissionalismo que contribuíram para a minha formação.

À minha orientadora, Professora Doutora Clarisse Coelho e à minha Coorientadora, Professora Doutora Joana Simões, por toda a ajuda prestada não só na elaboração desta dissertação, como por todo o apoio demonstrado ao longo do curso.

Aos meus pais, por me apoiarem incondicionalmente, por incentivarem desde sempre a seguir o meu sonho e me proporcionarem esta oportunidade, por estarem sempre a meu lado, a vocês devo-vos tudo.

À minha irmã Beatriz, por todo o apoio e ajuda prestada, por fazeres a minha vida muito mais feliz e seres a minha fã número um, és a pessoa que mais desejei ter na minha vida.

A ti, Miguel, nunca haveram palavras para agradecer o apoio que és na minha vida, obrigada por apoiares todas as minhas escolhas, por estares sempre de braços abertos para me receber e seres um porto seguro sempre que preciso, por todos os momentos que compartilhámos, que assim continue, para sempre.

Aos meus amigos que acompanharam de perto esta aventura assim como os que a partilharam comigo, por me mostrarem que sem vocês fazer o curso teria sido muito mais aborrecido, obrigada por todas as lágrimas e gargalhadas partilhadas e por todo o apoio demonstrado ao longo destes anos. Um agradecimento em especial à Celeste, Joana, Mariana e Sofia por todos os momentos vividos, por serem a minha segunda família durante estes 6 anos, com certeza levo esta amizade para o resto da minha vida.

Agradeço também ao Doutor Bruno Miranda e à restante equipa da BJCM-VET por todo o conhecimento e profissionalismo transmitido e por todo o carinho que me passaram durante o meu período de estágio. Assim como, um agradecimento enorme pelo fornecimento de toda a informação necessária à realização desta dissertação.

Um agradecimento também ao Hospital de Referência La Equina, por me terem recebido tão bem, fora do meu país, por todos os conhecimentos transmitidos e por contribuírem para o melhoramento do meu “Portunhol”.

Agradeço a todos os profissionais com que me cruzei e trabalhei ao longo de todos os estágios extracurriculares realizados, com certeza levo comigo a amizade e todos os ensinamentos para o futuro.

Por fim, não menos importante, um agradecimento geral a todos os que de alguma forma se cruzaram no meu caminho ao longo destes anos, contribuindo não só para minha formação, como para o meu crescimento pessoal.

Resumo

A Piroplasmose Equina (PE) resulta da infeção por *Babesia caballi* e *Theileria equi* e é atualmente responsável por grandes perdas económicas mundiais. Quando um equino é exportado de Portugal para os EUA, deve fazer-se acompanhar da sua identificação, testes serológicos negativos e um certificado sanitário assinado pelo veterinário. Esta doença é endémica em regiões com climas tropicais, subtropicais e temperados. A maioria dos sinais clínicos derivam da anemia hemolítica associada a febre. O diagnóstico pode ser realizado através de exame microscópico de esfregaços sanguíneos, testes serológicos ou pelo teste de cadeia de polimerase em tempo real. Atualmente, o fármaco que apresenta uma maior eficácia no tratamento destas infeções é o dipropionato de imidocarb, no entanto, existem outros fármacos disponíveis.

Este estudo teve como objetivo obter informação relevante sobre a incidência de piroplasmose em Portugal através da análise de testes serológicos realizados a 139 equinos entre 2020 e 2022, com o intuito de observar a distribuição de Piroplasmose em equinos Lusitanos em território nacional avaliados para exportação.

O presente estudo constatou que apesar da obrigatoriedade de realizar o teste serológico de ELISA, a grande maioria dos casos positivos foram ao teste serológico de IFAT, nomeadamente 24,5%, existindo uma crescente incidência de *Theileria equi* em comparação com *Babesia caballi*, 68% e 20% respetivamente. Sendo o Alto Alentejo a zona com maior positividade de entre as nove regiões, nomeadamente 68,2%.

São necessárias mais pesquisas sobre piroplasmose em Portugal, de forma a reduzir o número de casos positivos, reduzir os entraves à expansão do mercado do cavalo lusitano, educar a comunidade sobre os fatores de risco e alertar os veterinários sobre a epidemiologia da PE.

Palavras chave: piroplasmose, exportação, testes sorológicos, epidemiologia, Puro Sangue Lusitano.

Abstract

Equine Piroplasmosis (EP) results from infection by *Babesia caballi* and *Theileria equi* and is currently responsible for major economic losses at a worldwide level associated with commercial exchanges. When a horse is exported from Portugal to the USA, it must be accompanied by its identification, negative serological tests, health certificate signed by the veterinarian. This disease is endemic in regions with tropical, subtropical and temperate climates. Most clinical signs derive from hemolytic anemia associated with fever. Diagnosis can be made by microscopic examination of blood smears, serological tests, or by real-time polymerase chain testing. Currently, the drug that is most effective in the treatment of these infections is imidocarb dipropionate, however, there are other drugs available.

This study aimed to obtain relevant information on the incidence of piroplasmosis in Portugal through the analysis of serological tests carried out on 139 horses between 2020 and 2022, with the aim of observing the distribution of piroplasmosis in Lusitanian horses in the national territory evaluated for export.

The present study found that despite the obligation to perform the ELISA serological test, the vast majority of positive cases were submitted to the IFAT serological test, namely 24.5%, with an increasing incidence of *Theileria equi* compared to *Babesia caballi*, 68%. and 20% respectively. Alto Alentejo being the area with the highest positivity among the nine regions, namely 68.2%.

More research is needed on piroplasmosis in Portugal, in order to reduce the number of positive cases, reduce obstacles to the expansion of the Lusitano horse market, educate the community about risk factors and alert veterinarians about the epidemiology of Piroplasmosis.

Keywords: piroplasmosis, export, serological tests, epidemiology, Puro Sangue Lusitano.

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

PE- Piroplasmose Equina

WOAH- World Organisation for Animal Health

OIE- Organização Internacional das Epizootias

PCV- Hematócrito

RBC- Contagem de Eritrócitos

CK- Creatinina Quinase

LDH- Lactato Desidrogenase

ALP- Alcalina Fosfatase

AST- Aspartato aminotransferase

GGT- γ -Glutamilttransferase

ON- Oxido Nítrico

MDA- Malondialdeído

EMAs- Antígeno Equi Merozoitos

RAP 1- Proteína 1 associada à Roptria

cELISA- Teste Imunoenzimático por Competição

CFT- Teste de Fixação do Complemento

IFAT- Teste de Imunofluorescência Indireta

UV- Ultravioleta

RT-PCR- Teste de Cadeia de Polimerase em Tempo Real

DI- Dipropionato de Imidiocarb

EUA- Estados Unidos da América

USDA- United States Department of Agriculture

Joana Raquel Nogueria Paulino

Distribuição de Piroplasmose em equinos Lusitanos em território nacional avaliados para exportação

NVSL- Nacional Veterinary Services Laboratories

PCAS- Serviços de Química e Analítica de Parasitologia

APSL- Associação Portuguesa Criadores Cavalo Puro Sangue Lusitano

Índice

I. Casuística de estágio.....	13
1.1 Clínica Veterinária BJCM-VET	13
1.2 Hospital de Referência La Equina.....	16
II. Revisão Bibliográfica.....	18
1. Introdução	18
1.1 Etiologia.....	19
1.2 Ciclo de vida.....	20
1.2.1 Ciclo de vida de <i>Theileria equi</i>	21
1.2.2 Ciclo de vida de <i>Babesia caballi</i>	22
1.3 Transmissão.....	22
1.4 Epidemiologia	23
1.5 Fisiopatologia	24
1.6 Sinais clínicos	25
1.7 Lesões <i>Post-mortem</i>	27
1.8 Imunidade	27
1.9 Diagnóstico	29
1.10 Tratamento	31
1.11 Profilaxia	33
1.12 Impacto económico.....	34
1.13 Exportação de Equinos para os EUA	34
III. Objetivos do estudo	36
IV. Materiais e Métodos.....	37
1. Caracterização do estudo	37
2. Análise Estatística	37
V. Resultados.....	38
VI. Discussão	50
VII. Conclusão.....	54
VIII. Referências Bibliográficas	55

Índice de Tabelas

Tabela 1 Distribuição Mundial de Carraças vetores da Piroplasmose Equina.....**21**

Tabela 2- Resultados positivos à piroplasmose, ao parasita *Theileria equi* e *Babesia caballi* por testes (IFAT, ELISA e CFT) realizados.....**45**

Tabela 3- Parasitas detetados por teste, nos equinos positivos para *Theileria equi* e *Babesia caballi***46**

Índice de Gráficos

Gráfico 1 Frequência relativa de casos observado em cada sistema.....	12
Gráfico 2- Frequência relativa de casos observados em regime de ambulatorio e em clínica.....	13
Gráfico 3- Frequência absoluta de casos observado em cada sistema.....	14
Gráfico 4- Frequência relativa de animais negativos e positivos de cada género, para piroplasmose.....	36
Gráfico 5- Frequência relativa de cada género do total da amostra estudada.....	36
Gráfico 6- Frequência relativa do género da amostra positiva para piroplasmose.....	37
Gráfico 7- Frequência relativa de animais negativos e positivos à piroplasmose em função do género.....	38
Gráfico 8- Frequência relativa de animais jovens e adultos, no total da amostra em estudo.....	39
Gráfico 9- Frequência relativa de animais positivos e negativos por escalão etário, no total da amostra em estudo.....	39
Gráfico 10- Frequência relativa de cada hemoparasita detetados no total da amostra de animais positivos.....	40
Gráfico 11- Frequência relativa dos testes de diagnóstico usados no na presente pesquisa	42

Gráfico 12- Frequência relativas da detecção do parasita *Theileria equi* (12.1) e de *Babesia caballi* (12.2) em função dos testes de diagnóstico usados.....43

Índice de Figuras

Figura 1 Visualização microscópica de corpos de inclusão compatíveis com (A) <i>Babesia caballi</i> e (B) <i>Theileria equi</i> no interior dos eritrócitos.....	18
Figura 2- Esquema ilustrativo do ciclo de vida de <i>Theileria equi</i> (A) e de <i>Babesia caballi</i> (B), no hospedeiro vertebrado e no hospedeiro invertebrado.....	19
Figura 3- Frequência relativa de animais por região, no total da amostra em estudo.....	41
Figura 4- Distribuição de equinos positivos à PE, por região de origem.....	42

I. Casuística de estágio

O estágio curricular realizado pela autora para conclusão do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária e, conseqüentemente, culminando na origem desta dissertação, foi repartido por duas partes, em locais distintos. Os primeiros quatro meses foram realizados no período de 12 de setembro a 31 de dezembro de 2022, dando em média 810 horas totais de estágio, na Clínica Veterinária BJCM-VET, localizada em Folgados, Arruda dos Vinhos, sob a orientação do Médico Veterinário Bruno Miranda e da restante equipa.

Os outros dois meses, foram realizados no período de 1 de janeiro a 28 de fevereiro de 2023, dando em média 530 horas totais de estágio, no Hospital de Referência La Equina, localizado em Manilva província de Málaga, Espanha, tendo sido orientado pelo Médico Veterinário Emílio Sáez Rodriguez.

1.1 Clínica Veterinária BJCM-VET

Os quatro meses passados na Clínica Veterinária BJCM-VET ao encargo do Médico Veterinário Bruno Miranda e da restante equipa, foram realizados maioritariamente no âmbito de medicina desportiva de equinos. A maioria dos casos observados pela autora situaram-se na região da Extremadura, Ribatejo e Alentejo.

Durante o período de estágio foi possível observar casos de diferentes sistemas, tais como: sistema respiratório (doença pulmonar obstrutiva crónica, pneumonia e hemiplegia laríngea); sistema gastrointestinal (gastroscoopia, úlceras gástricas); sistema nervoso (Mielopatia estenótica cervical (Síndrome de *Wobbler*)); sistema oftalmológico (úlceras, cegueira, uveíte) e sistema locomotor (laminites, osteoartrites, fraturas).

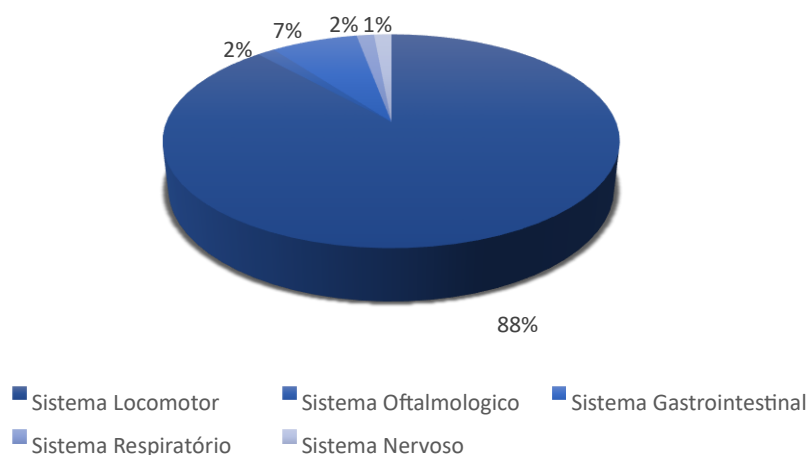


Gráfico 1- Frequência relativa de casos observado em cada sistema.

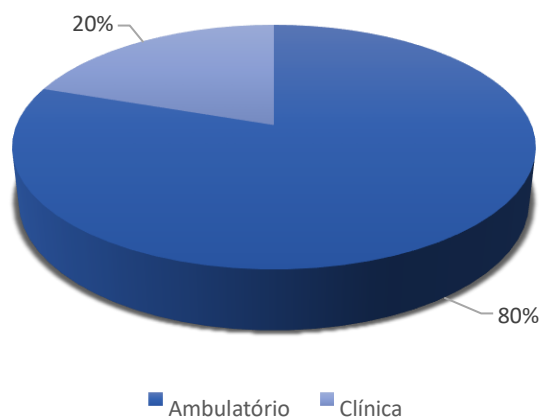


Gráfico 2- Frequência relativa de casos observados em regime de ambulatório e em clínica.

Como se pode observar no Gráfico 2, grande parte da casuística foi realizada em regime de ambulatório, sendo que o maior número de casos acompanhados foram relacionados com a área de medicina desportiva, principalmente, doenças músculoesqueléticas. Foram vários os procedimentos acompanhados com destaque para diagnósticos de claudicação (exame estático, exame dinâmico e consequentes flexões, exame radiológico e ecográfico), bloqueios perineurais, infiltrações (articulação interfalângica distal, articulação metacarpo falângica, articulações intertarsianas, articulação tarsometatársica, articulação fémur-tíbio-patelar, articulação sacroilíaca, intervertebrais, intercervicais, entre outras), diagnóstico e tratamento de patologias de tecidos moles e tratamentos complementares recorrendo a terapias integrativas (radiofrequência, *shock-wave* e laser terapia).

Ainda dentro do atendimento em regime de ambulatório foram realizadas vacinações, desparasitações, exames ato de compra, procedimentos de odontologia, orquiectomias (técnica aberta), identificação e registo de equinos, eutanásias e acompanhamento de cólicas de resolução médica.

Relativamente ao atendimento realizado na clínica, este restringiu-se maioritariamente à área de cirurgia, onde foi possível assistir a artroscopias, orquiectomias (técnica fechada), herniorrafia, extrações dentárias, extração de um ducto salivar, lavagem articular, resolução de uma fratura da maxila, extração de um carcinoma da 3ª pálpebra e desmotomias do ligamento infra espinhoso para correção da sobreposição dos processos espinhosos dorsais (“*Kissing spine*”). A autora teve diversas vezes o papel de circulante, ajudando também na preparação pré-cirúrgica e indução, assim como no recobro dos equinos e cuidados pós-operatórios. Durante a cirurgia participou na desinfeção do campo cirúrgico, como instrumentista, segundo cirurgião e anestesista.

De uma forma geral, a autora participou na preparação de medicações e administrações (intravenosas e intramusculares), quando possível. Teve a oportunidade também de auxiliar em recolhas sanguíneas e em exames complementares que incluiu análises laboratoriais e endoscopias para despiste de hemiplegia laríngea e doenças gástricas.

Assim, a autora concluiu que estes quatro meses foram bastante proveitosos, conseguindo tirar o melhor partido de cada caso e do apoio dado por toda a equipa da clínica veterinária BJCM-VET. Conseguiu consolidar os conhecimentos adquiridos ao longo do curso, assim como, melhorar as suas capacidades de interpretação de imagens radiológicas e ecográficas, a sua destreza no desempenho de muitos procedimentos e a sua capacidade de pensamento crítico e resposta rápida às situações.

1.2 Hospital de Referência La Equina

No Hospital de Referência La Equina, foi possível acompanhar consultas e urgências de medicina interna e consultas de medicina desportiva em equinos.

O Hospital de Referência La Equina, recebe a grande maioria dos casos referenciados provenientes da Andaluzia, e durante o período de estágio foram observados 76 casos. A grande maioria dos casos referenciados eram casos de síndrome de abdómen agudo e claudicações inconclusivas, assim como, casos de difícil resolução ou com necessidade de acompanhamento diário.

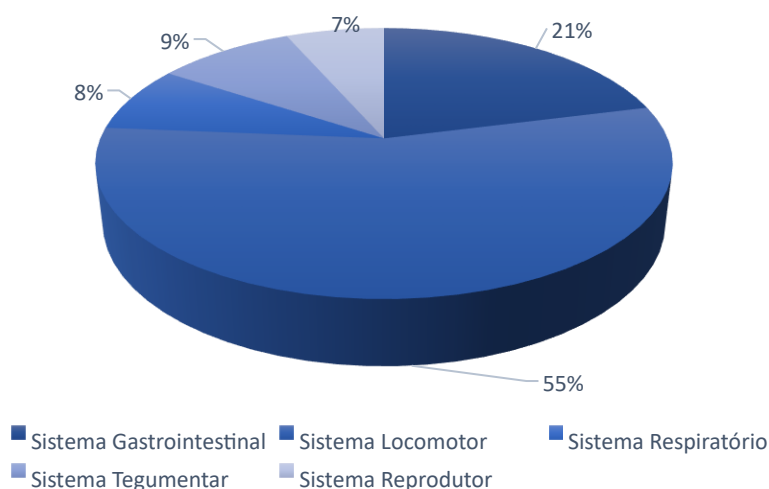


Gráfico 3- Frequência absoluta de casos observado em cada sistema.

Em relação ao sistema locomotor, a grande maioria dos casos eram referenciados para diagnóstico de claudicações, através de exame estático e dinâmico, em piso mole e piso duro, com uso de bloqueios perineurais, diagnóstico de imagem (radiológico, ecográfico, tomográfico e através de ressonância magnética) e, quando necessário, infiltrações articulares e mesoterapia. Também associado a este sistema foram realizadas diversas cirurgias, mais especificamente artroscopias, das articulações: interfalângica distal, metacarpo-falângicas, metatarso-falângicas, fêmur-tíbio-patelar e tarsometatársicas. Ainda, foi possível acompanhar uma elevação do perióstio num poldro com defeitos angulares, remoção de um queratoma, uma cirurgia num caso de fratura do olecrano e a recuperação de uma osteomielite da mandíbula e um caso de miosite.

Relativamente ao sistema gastrointestinal, todos os casos seguidos, foram casos de síndrome de abdómen agudo referenciados, representando a grande maioria das urgências

atendidas pelo hospital. A maioria teve resolução cirúrgica, como foi o caso de quadros de doenças isquémicas de intestino delgado (torções), impactações de intestino grosso e hérnias inguinais.

A grande maioria dos casos referentes ao sistema respiratório, foi o diagnóstico estático e dinâmico de hemiplegia laríngea; no entanto, também se realizou trepanações dos seios nasais e desobstruções de canais lacrimais devido ao acúmulo de secreções respiratórias.

Foram acompanhados ainda casos de habronemose, remoção de abscesso auricular, desobstrução de canais lacrimais e uma lipoaspiração para remoção de excesso de gordura localizada na zona dorsal do pescoço, comumente conhecida como pescoço de gato.

Por fim, dentro do sistema reprodutor, os casos que surgiram foram maioritariamente orquiectomias (técnica fechada), tendo sido realizado uma orquiectomia de um criptorquideo unilateral, duas orquiectomias bilaterais e um criptorquideo inguinal unilateral, assim como resolução cirúrgica de uma fístula retovaginal.

Para além de todas as atividades desenvolvidas, a autora atuou como circulante e segundo cirurgião na sala de cirurgia, auxiliando nos procedimentos pré e pós cirúrgicos e anestésicos. Juntamente com os restantes estagiários, estava responsável pela monitorização diária de todos os equinos internados, administrações medicamentosas necessárias, análises laboratoriais e troca de pensos.

Em suma, a aluna no decorrer destes dois meses, adquiriu conhecimentos na área de medicina interna de equinos, mais especificamente em cuidados de urgência, cuidados intensivos, análises laboratoriais, anestesia e cirurgia, assim como, procedimentos diários de um hospital equino, como troca de pensos, administrações medicamentosas, diagnóstico e tratamento de claudicações. Para além de toda a parte académica a aluna conseguiu desenvolver a parte linguística, visto que este estágio foi realizado no âmbito do programa Erasmus +, assim como, a sua capacidade de integração e trabalho em equipa.

II. Revisão Bibliográfica

1. Introdução

A Piroplasmose Equina (PE) é uma doença transmitida por vetores, carrças da família Ixodidae, dos géneros *Hyalomma*, *Rhipicephalus* e *Dermacentor*, sendo causada por uma única ou co-infecção dos parasitas intraeritrocíticos *Babesia caballi* e *Theileria equi* (Onyiche *et al.*, 2019). Estes são parasitas protozoários apicomplexos intracelulares (Camino *et al.*, 2020). Para além de PE, esta hemoparasitose está descrita na literatura como Malária Equina, Febre Biliar Equina e Febre da Carraça Equina (Sellon & Long, 2007).

Apresenta distribuição mundial e é responsável por perdas económicas associadas a espécies equídeas, tais como, cavalos, pôneis, burros, mulas e zebras, sendo atualmente um dos maiores entraves na comercialização internacional de equinos (Onyiche *et al.*, 2019). Tais perdas económicas estão associadas a custos médico-veterinários, quedas de performance, abortos, restrições internacionais associadas à exportação e participação em eventos equestres, principalmente em países não endémicos e em casos mais graves da doença, a morte dos animais (Rothschild, 2013; Díaz-Sánchez *et al.*, 2020).

Esta doença é endémica em regiões com climas tropicais, subtropicais e temperados, como é o caso de Portugal (Díaz-Sánchez *et al.*, 2020). Assim sendo, a PE continua a ser um problema, pois em muitos casos é um entrave à exportação de equinos da raça Puro Sangue Lusitano, que estão em constante expansão no mercado internacional.

A doença pode apresentar-se de três grandes formas: aguda, subaguda ou crónica. A forma aguda é talvez a mais comum e é caracterizada por anemia hemolítica e febre com diferentes estágios e sinais clínicos inespecíficos. Também é bastante comum animais infetados tornarem-se portadores assintomáticos e consequentemente uma fonte de transmissão para animais saudáveis (Rothschild, 2013).

1.1 Etiologia

Babesia caballi e *Theileria equi* são protozoários apicomplexos intraeritrocitários obrigatórios, que infetam equídeos (Wise *et al.*, 2014). *Babesia caballi* pertence à família Babesiidae e *Theileria equi* pertence à família Theileriidae, ambos pertencem à classe Aconoidasida, ao filo Apicomplexa e à ordem Piroplasmida (Taylor *et al.*, 2016).

É comum os trofozoítos do género *Babesia* apresentarem uma forma de pêra dentro dos eritrócitos, em pares e unidos pelas extremidades posteriores. Já os merozoítos do género *Theileria* costumam ser arredondados ou até piriformes, formando quatro organismos, comumente chamados de “cruz de Malta” (Figura 1). *Theileria* também apresenta uma fase inicial em que se multiplica nos linfócitos e só de seguida invade os eritrócitos (Rothschild, 2013).

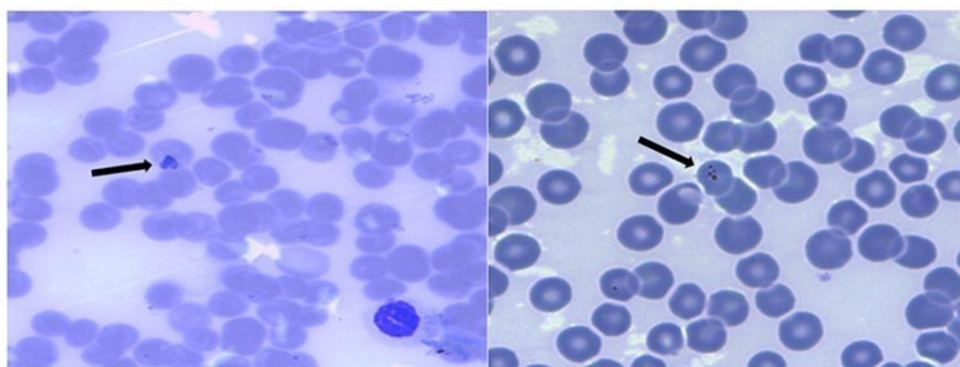


Figura 1- Visualização microscópica de corpos de inclusão compatíveis com (A) *Babesia caballi* e (B) *Theileria equi* no interior dos eritrócitos. Microscopia ótica com lente de imersão x100 (Díaz-Sánchez *et al.*, 2020).

Foram identificadas e descritas inúmeras espécies de carraças ixodídeas como vetores de PE (Tabela 1). No caso de *Babesia caballi*, este pode ser transmitido por 15 espécies (sete *Dermacentor spp.*, seis *Hyalomma spp.*, e dois *Rhipicephalus spp.*), *Theileria equi* pode ser transmitida por 14 espécies distintas (quatro *Dermacentor spp.*, quatro *Hyalomma spp.*, cinco *Rhipicephalus spp.* e *Amblyomma cajennense*) (Sellon & Long, 2007).

Tabela 1- Distribuição Mundial de Carraças vetores da Piroplasmose Equina. (Díaz-Sánchez *et al.*, 2020).

Continente	vetores de carrapatos	piroplasmose equina
África	<i>D. marginatus</i> ^{a,b} , <i>H. anatolicum</i> ^{a,b} , <i>H. detritum</i> ^{a,b} , <i>H. dromedarii</i> ^a , <i>H. excavatum</i> ^a , <i>H. lusitanicum</i> ^a , <i>H. marginatum</i> ^{a,b} , <i>H. truncatum</i> ^b , <i>R. annulatus</i> ^a , <i>R. bursa</i> ^{a,b} , <i>R. evertsi</i> ^{a,b} , <i>R. microplus</i> ^a , <i>R. sanguineus</i> ^{a,b}	Endêmica
Austrália	<i>R. australis</i>	Não presente
Ásia	<i>H. anatolicum</i> ^{a,b} , <i>H. detritum</i> ^{a,b} , <i>H. dromedarii</i> ^a , <i>H. arginatum</i> ^{a,b} , <i>H. uralense</i> ^a , <i>R. microplus</i> ^a	Endêmica, exceto Japão
Europa	<i>D. marginatus</i> ^{a,b} , <i>D. nuttalli</i> ^b , <i>D. silvarum</i> ^b , <i>D. reticulatus</i> ^{a,b} , <i>H. anatolicum</i> ^{a,b} , <i>H. detritum</i> ^{a,b} , <i>H. dromedarii</i> ^a , <i>H. lusitanicum</i> ^a , <i>H. marginatum</i> ^{a,b} , <i>R. bursa</i> ^{a,b}	Endêmica, exceto norte da Europa
América do Norte	<i>A. mixtum</i> ^a , <i>D. albipictus</i> ^b , <i>D. nitens</i> ^b , <i>D. variabilis</i> ^{a,b} , <i>R. annulatus</i> ^a , <i>R. microplus</i> ^a	Endêmica, exceto Estados Unidos e Canadá
América do Sul	<i>A. mixtum</i> ^a , <i>D. nitens</i> ^b , <i>R. annulatus</i> ^a , <i>R. microplus</i> ^a	Endêmica

(A) *Amblyomma*, (D) *Dermacentor*, (H) *Hyalomma*, (R) *Rhipicephalus*, (a) *Theileria equi* e (b) *Babesia caballi*.

1.2 Ciclo de vida

Tanto o ciclo de vida de *Babesia caballi* como de *Theileria equi* apresentam três estágios distintos de vida (Figura 2), o estágio de transmissão assexuada (esporozoíto), o estágio de transmissão assexuada no sangue do hospedeiro (merozoíto) e o estágio sexuado no sangue do vetor (gametócito) (Tirosh-Levy *et al.*, 2020; Onyiche *et al.*, 2019). Além disso, *T. equi* apresenta um quarto estágio ao sofrer esquizogonia nas células mononucleares do sangue periférico (PBMS) (Sellon & Long, 2007).

O desenvolvimento do parasita dentro do vetor, depende da espécie da carraça envolvida, no entanto, independentemente da espécie ambos os parasitas são transmitidos através da saliva da carraça ao picar o hospedeiro (Tirosh-Levy *et al.*, 2020). O período de incubação varia consoante a espécie, sendo para *B. caballi* de aproximadamente 1030 dias e para *T. equi* de 12-19 dias (Van der Kolk, 2023).

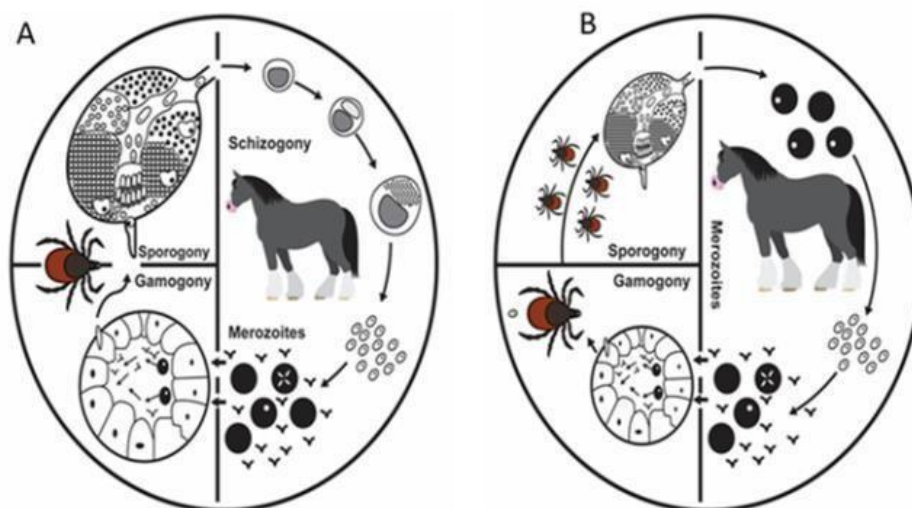


Figura 2- Esquema ilustrativo do ciclo de vida de *Theileria equi* (A) e de *Babesia caballi* (B), no hospedeiro vertebrado e no hospedeiro invertebrado (Onyiche *et al.*, 2019).

1.2.1 Ciclo de vida de *Theileria equi*

Os esporozoítos de *Theileria equi* são transmitidos pela saliva da carraça durante a alimentação, a um equino não infectado (Sellon & Long, 2007). Ao entrar no hospedeiro, os esporozoítos invadem os linfócitos, passam pelo processo de esquizogonia e formam microesquizontes e macroesquizontes (Onyiche *et al.*, 2019). Estes posteriormente transformam-se em merozoítos que, de seguida, são libertados dos esquizontes e invadem os eritrócitos passando pelo processo de merogonia (Onyiche *et al.*, 2019) dando origem a dois corpos em forma de pêra ou quatro corpos piriformes em forma de “cruz de Malta” (Tamzali, 2013).

Após a hemólise dos eritrócitos infectados, os merozoítos são libertados e entram em novos eritrócitos e o processo replica-se. Depois da alimentação da carraça, começa a transformação dos gametócitos em zigotos no intestino médio da carraça, originando cinetos na saliva da mesma (Tamzali, 2013). Nas glândulas salivares são formados esporontes, esporoblastos e esporozoítos e o ciclo de transmissão termina com a alimentação da carraça em animais saudáveis (Onyiche *et al.*, 2019).

1.2.2 Ciclo de vida de *Babesia caballi*

O ciclo inicia-se quando uma carraça infetada se alimenta de um hospedeiro (equino) não infetado. Os esporozoítos que entram no hospedeiro através da alimentação invadem os eritrócitos, onde desenvolvem os trofozoítos (Jalovecka *et al.*, 2019). Através do processo de merogonia ou fissão binária, os trofozoítos dividem-se em merozoítos e infetam consequentemente outros eritrócitos e assim sucessivamente (Onyiche *et al.*, 2019). A reprodução sexual inicia-se quando há a junção dos merozoítos aos gametócitos intraeritrocitários, mais tarde, no intestino da carraça (hospedeiro definitivo) após a alimentação, surgem os gametas, denominados de corpos de raios, que ao se fundirem, através de divisão meiótica, formam os oocinetos (Onyiche *et al.*, 2019).

Os oocinetos passam por dois ciclos assexuados de multiplicação. O primeiro começa com a invasão de fibras musculares, túbulos de Malpighi e células ovárias da carraça. Os ovos são infetados e, posteriormente, as larvas, através de transmissão transovárica. No segundo ciclo, os oocinetos invadem as glândulas salivares, através de esquizogonia (fissão múltipla), onde ocorre a esporogonia e se formam os esporozoítos, por fim estes são continuamente produzidos e libertados na corrente sanguínea do hospedeiro e, consequentemente, continua o ciclo de infeção em outros estágios da carraça (larva, ninfa ou adulto) ou noutro hospedeiro equino (Onyiche *et al.*, 2019; Jalovecka *et al.*, 2019).

1.3 Transmissão

A transmissão de *Babesia caballi* é transtadial e transovárica, assim tanto equinos como vetores são considerados reservatórios da hemoparasitose. No caso de infeções causadas por *Theileria equi* apenas os equídeos infetados constituem um reservatório da doença pois a transmissão é maioritariamente transtadial, não existindo transmissão entre gerações de carraças (Scoles & Ueti, 2015).

A transmissão de *Babesia caballi* e *Theileria equi* aos hospedeiros vertebrados (equídeos) ocorre após a fixação da carraça fêmea adulta e infetada, que ao se alimentar de forma hematófaga, inocula através da saliva a forma infetante dos hemoparasitas na circulação do hospedeiro.

A transmissão pode ainda ocorrer de forma iatrogénica, através da utilização de equipamentos contaminados com sangue, como agulhas, sondas nasogástricas e instrumentos de odontologia ou durante a realização de transfusões sanguíneas utilizando dadores portadores assintomáticos da doença, que transmitiram os merozoítos (Wise *et al.*, 2013; Tamzali, 2013).

Também está descrita a transmissão de *T. equi* por via transplacentária, que pode ocorrer em qualquer altura da gestação devido a infeções intra-uterinas recorrentes, no entanto, é mais comum entre os 40 e os 150 dias de gestação, altura em que as hemácias maternas atravessam a placenta para fornecer ferro ao feto em desenvolvimento. Após o quinto mês de gestação é pouco provável que haja transmissão de piroplasmose ao feto, uma vez, que este já apresenta uma capacidade hemotrófica e a placenta já está completamente formada (Sant *et al.*, 2016). Os sinais mais comumente observados incluem abortos, partos prematuros, nascimento de poldros vivos com piroplasmose neonatal ou poldros portadores assintomáticos (Chhabra *et al.*, 2012).

1.4 Epidemiologia

A PE é uma doença de declaração obrigatória, segundo a *World Organisation for Animal Health* (WOAH), pois os tratamentos não são totalmente eficazes e os animais infetados podem permanecer como portadores assintomáticos (World Organisation for Animal Health, 2021).

Apesar da PE ter uma distribuição mundial, *B. caballi*, *T. equi* e os seus vetores são endémicos em regiões com clima tropical e subtropical, nomeadamente, no Sul da Europa, África, Médio Oriente, Ásia e América do Sul e Central, assim como, algumas zonas dos Estados Unidos da América (EUA) (Onyiche *et al.*, 2019). Atualmente, as consideradas áreas não endémicas, incluem o Reino Unido, Irlanda, EUA, Austrália e Japão, estima-se que apenas um décimo da população mundial equina habite essas zonas livres (Coulthous *et al.*, 2022).

A maioria destas áreas, apresentam características climáticas cada vez mais adequadas à propagação dos vetores, levando à possibilidade de introduzir *B. caballi* e *T. equi* em regiões livres da doença, seja por meio de equinos infetados ou aparecimento de carraças

infetadas. A infeção por *T. equi* é mais comum que a infeção por *B. caballi* (Sellon & Long, 2007).

Em regiões endémicas, a grande maioria dos equinos fica exposto à doença desde o primeiro ano de vida, havendo relatos de taxas de letalidade entre os 5 e os 10% (Spickler, 2018). Em contrapartida, a introdução ou importação de equinos infetados para zonas não endémicas, onde existam vetores competentes, surgem taxas de mortalidade superiores a 50% (Rothschild, 2013).

As mudanças climáticas e a atual tendência à globalização equestre, assim como, a distribuição dos vetores, torna o controlo e a expansão geográfica da PE, uma das principais preocupações das regiões não endémicas (Wise *et al.*, 2013).

1.5 Fisiopatologia

As infeções causadas pelos hemoparasitas *B. caballi* e *T. equi* provocam quadros com gravidades variáveis de anemia hemolítica. Com a acumulação de merozoítos nos eritrócitos, há rotura dos mesmos dentro dos vasos sanguíneo (hemólise intravascular) e o sequestro de eritrócitos infetados por macrófagos esplénicos (hemólise extravascular) (Wise *et al.*, 2013).

A hemólise promove a libertação de hemoglobina em circulação e consequentemente, os aumentos dos níveis séricos de bilirrubina não conjugada, depositando-se nas mucosas conferindo uma coloração amarela, frequentemente observada (Rothschild, 2013).

Em infeções provocadas por *T. equi* é comum ocorrer hemólise grave, uma vez que o aumento da absorção de fósforo por parte das hemácias infetadas, causa hipofosfatémia e desencadeia a depleção da adenosina trifosfato (ATP) predispondo à hemólise o que, consequentemente, surge hemoglobinúria e bilirrubinúria. O aumento exorbitante da concentração plasmática destes pode levar ao desenvolvimento de insuficiência hepática e insuficiência renal aguda, uma vez que estes pigmentos apresentam propriedades hépato e nefrotóxicas (De Waal, 1992; Singla & Deepak Sumbria, 2019).

No caso da infeção causada por *B. caballi* o hospedeiro desenvolve uma aglomeração de hemácias, formando microtrombos em vasos sanguíneos de menor calibre, levando a estase venosa e vasculite (de Wall *et al.*, 1987). Pode ainda diminuir o hematócrito (PCV),

causar trombocitopenia, alterações da contagem de eritrócitos (RBC) levando à diminuição do fluxo microvascular sanguíneo. Outro fator relevante para a destruição das hemácias é a acumulação de iões oxidativos (Singla & Deepak Sumbria, 2019).

1.6 Sinais clínicos

A maioria dos sinais clínicos derivam da anemia hemolítica e da febre sendo bastante inespecíficos, incluindo icterícia, inapetência, diminuição da performance, mucosas pálidas, taquicardia e taquipneia. Em casos mais graves pode surgir edema e hemorragia generalizados levando à falência de órgãos e, consequentemente, morte. Também já foram descritos casos em que surgiu trombocitopenia (Tirosh-Levy *et al.*, 2020).

Esta hemoparasitose pode ser classificada de uma forma minuciosa em superaguda, aguda, subaguda ou crónica (Rothschild & Knowles, 2007).

Na fase superaguda provocada por *T. equi* surgem sinais inesperados que levam a colapso e morte súbita dos equinos infetados, surgindo primeiro hemólise e consequentemente, anemia. No caso de *B. caballi*, os animais por norma são menos anémicos, mas pode ocorrer falha múltipla de órgãos devido à coagulação intravascular disseminada (Singla & Deepak Sumbria, 2019).

Em casos agudos, surge pirexia (caracteristicamente superior a 40° C), que em caso de infeções provocadas por *B. caballi* é intermitente. Quando indevidamente tratada, a mortalidade é de moderada a alta e pode surgir, anorexia moderada, desidratação, mucosas congestionadas, decúbito e mal-estar, sudorese, taquicardia e taquipneia, edema dos membros e da terceira pálpebra juntamente com lacrimejamento, petéquias e, por fim, anemia que, em casos mais graves, levará a icterícia (bilirrubinúria, sendo estes raros em infeções por *B. caballi*) e morte. Consequentemente, podem surgir patologias secundárias como sinais de cólica como, obstipação, diarreia e enterite catarral. Casos mais graves podem levar a insuficiência renal e/ou hepática e sinais nervosos como, ataxia, convulsões e mialgia, provocadas pela inflamação das membranas mucosas e vasos sanguíneos (Rothschild & Knowles, 2007; Singla & Deepak Sumbria, 2019).

Éguas gestantes portadoras podem abortar ou transmitir a infeção ao poldro provocando infeção neonatal. É comum éguas infetadas abortarem nos últimos três meses

de gestação, após infecções intra-uterinas recorrentes, normalmente a placenta é expulsa juntamente com o feto em simultâneo (De Waal & Van Heerden, 2004). Normalmente os sinais clínicos são graves em poldros recém-nascidos infetados in útero pelo hemoparasita *T. equi* (Chhabra *et al.*, 2012; Georges *et al.*, 2011). Poldros infetados podem nascer aparentemente saudáveis e desenvolver sinais clínicos ao fim de 2 a 3 dias, os sinais clínicos são inespecíficos, tais como fraqueza e diminuição do reflexo de sucção. Com o passar do tempo assemelham-se à infecção aguda em equinos adultos, incluindo pirexia, icterícia e anemia (Sellon & Long, 2007).

Equinos que apresentam infecção crónica geralmente exibem sinais inespecíficos de inflamação, como má condição corporal, anorexia, letargia e diminuição de performance, anemia leve e esplenomegália, provocada pelo aumento da hemólise extravascular que ocorre no interior do baço (Sellon & Long, 2007; Singla & Deepak Sumbria, 2019).

As alterações hematológicas e bioquímicas incluem a redução do valor do hematócrito e, em alguns casos, surge trombocitopénia. Equinos infetados por *T. equi* apresentam níveis aumentados de bilirrubina sérica total, ureia, creatinina quinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH) (De Waal, 1992). É frequente observar-se hiperbilirrubinémia, assim como, o aumento das atividades das enzimas hepáticas como fosfatase alcalina (ALP), aspartato aminotransferase (AST) e γ -glutamilttransferase (GGT) devido à redução do fluxo sanguíneo hepático. A hipofosfatemia e a diminuição dos valores do ferro são comuns, devido ao metabolismo alterado de hemácias e ao uso do fósforo presente nos eritrócitos, por parte do género *Babesia* para obter energia, assim como, associado possivelmente a processos inflamatórios.

Por fim, existem os portadores assintomáticos, que representam uma grande parte dos animais positivos à PE. Depois de infetados estes animais apresentam uma maior produção de imunoglobulinas (IgG2, IgG4 e IgGT), baixa carga parasitária e normalmente não apresentam sinais clínicos. Estes representam um reservatório para *B. caballi* e para *T. equi* e servem de transmissores, uma vez que apresentam uma persistência de 10^3 a 10^6 eritrócitos infetados por mililitro de sangue, parasitémia essa que é suficiente para que os vetores ao se alimentares adquiram a infecção e transmitam a outros equinos, também ocorre transmissão via iatrogénica (Pereira *et al.*, 2004). Uma vez

que não apresentam sinais da doença estes equinos são uma ameaça à introdução da doença em zonas não endémicas, por isso, são realizados testes regulares para a entrada em países não endémicos na tentativa de controlar a parasitose. Normalmente estes equinos apresentam sinais clínicos quando são submetidos a períodos de grande stress, apresentam-se imunocomprometidos ou estão sob o efeito de corticoesteroides (Sellon & Long, 2007).

1.7 Lesões *Post-mortem*

As lesões macroscópicas resultantes de doença aguda podem incluir icterícia dos órgãos, ascite, hidrotórax, hidropericárdio, lesões hemorrágicas (petéquias nos rins, equimoses e hemorragias do epicárdio e endocárdio) e esplenomegália. Também é possível observar hepatomegália, o fígado pode apresentar uma coloração escura (alaranjada) ou pálida devido à anemia. Todos estes achados são bastante comuns em infeções crónicas (American Association of Equine Practitioners (AAEP), 2021). Os achados histopatológicos incluem edema e congestão pulmonar, necrose tubular renal com cilindros de hemoglobina, necrose centrolobular hepática, assim como, necrose dos hepatócitos e microtrombos (De Waal & Van Heerden, 2004).

Quando os abortos ocorrem precocemente, os fetos apresentam-se, por norma, muito autolisados. Estes apresentam-se ictericos, anémicos, com petéquias na superfície visceral e serosa, apresentam também hidrotórax, congestão e edema pulmonar, esplenomegália e hepatomegália. A placenta normalmente apresenta-se edematosa e hemorrágica, sendo que a maioria dos eritrócitos apresentam-se parasitados (De Waal & Van Heerden, 2004).

1.8 Imunidade

A resposta imunitária que surge após a infeção por *B. caballi* e *T. equi* tem um papel fundamental no controlo da doença e da condição do equino portador assintomático, principalmente nas regiões endémicas. Os baixos níveis de parasitémia nestes animais permitem uma continua estimulação do sistema imunitário conferindo-lhes uma maior resistência ao desenvolvimento da doença. A imunidade inata formada por neutrófilos,

macrófagos e células *natural killer* constituem o mecanismo de defesa inicial contra a infecção parasitária (Tamzali, 2013).

O baço surge com um papel fundamental na resposta imunitária, numa primeira abordagem, uma vez que as células de Kupffer fagocitam os eritrócitos infetados (Rothschild, 2013). No entanto, o baço é incapaz de controlar a infecção por *T. equi* na ausência de uma resposta imune específica (Deger *et al.*, 2009).

Equinos parasitados por *T. equi* desenvolvem anticorpos em resposta às proteínas de superfície dos merozoitos, apelidados de antigénio equi merozoitos (EMAs): Desenvolvem também anticorpos para a proteína 1 associada à roptria (RAP 1), que é utilizada na deteção serológica da infecção (Sellon & Long, 2007).

A transferência de imunidade passiva através do colostro a poldros, ocorre nas primeiras horas de vida e pode persistir por 4 a 5 meses; no entanto, não está completamente esclarecido se esta imunidade se deve à baixa carga parasitária ou a anticorpos provenientes de mães portadoras de PE (Sellon & Long, 2007).

Segundo um estudo de Deger *et al.* (2009), equinos infetados por *B. caballi* e *T. equi* apresentaram níveis aumentados de malondialdeído (MDA) e óxido nítrico (ON) e os níveis de vitamina E e glutatona sérica diminuídos. Os sistemas antioxidantes apresentam uma ação protetora contra o *stress* oxidativo das células, tecidos e órgãos resultantes da parasitose; assim, os níveis de MDA e de enzimas antioxidantes atuam sobre a peroxidação que ocorre na membrana celular. As vitaminas E, C e A apresentam uma ação protetora contra os danos dos radicais livre provocados pela parasitose.

Segundo um estudo realizado para determinar uma estratégia de imunização, ainda não existe nenhuma vacina eficaz contra a doença (Tamzali, 2013).

1.9 Diagnóstico

Não é possível obter um diagnóstico definitivo somente a partir dos sinais clínicos, uma vez que são bastante inespecíficos. Quando se realiza o diagnóstico de PE deve-se ter em conta alguns diagnósticos diferenciais, como, Borreliose (Doença de Lyme), Leptospirose, Erliquiose, Anemia Hemolítica Imunomediada, Doença Equina Africana, Purpura Hemorrágica, Artrite Viral Equina, infecção causada por *Trypanosoma*, Isoeritrólise Neonatal em poldros e infecção por ingestão de plantas ou químicos tóxicos, estes diagnósticos devem ser levados em consideração dependendo da zona geográfica (Departamento Científico e Técnico da OIE, 2009; De Waal, 1992).

Existem variados testes de diagnóstico que podem ser usados isoladamente ou em combinação. A utilização de múltiplos testes de diagnóstico justifica-se, principalmente, em regiões não endémicas, uma vez que, facilita a obtenção de informação mais precisa e necessária ao controlo da doença (Wise *et al.*, 2013).

O diagnóstico realizado através de exame microscópico de esfregaços sanguíneos é possível apenas nas fases agudas da PE, utilizando as colorações de Romanovsky, tal como o método Giemsa, por exemplo quando surgem picos febris ou em animais mais jovens e éguas que vivem a campo como forma de controlo, no entanto, esta técnica torna-se pouco precisa em animais que não apresentam sinais clínicos, assim, um resultado negativo não pode excluir a presença da infecção (Navarrete & Serrano, 1999). Em caso de alta carga parasitária em circulação é possível observar os eritrócitos parasitados. Em equinos portadores assintomáticos ou em casos de infeções crónicas, a baixa carga parasitária diminui a sensibilidade desta técnica, levando a falsos negativos. No caso de *B. caballi* é possível observar trofozoitos intraeritrocitários e no caso de *T. equi* observam-se micromerozoitos ou formas esquizogónicas dentro dos linfócitos e dentro dos eritrócitos é possível observar merozoítos com a típica forma de “Cruz de Malta”, sendo esta uma importante característica do agente, facilitando a sua identificação microscópica (Friedhoff & Soulé, 1996; Navarrete & Serrano, 1999; Sellon & Long, 2007).

A PE pode ser diagnosticada através de testes serológicos que detetam anticorpos séricos contra piroplasmas, ou por testes moleculares que detetam os piroplasmas no sangue circulante.

Ao recorrer a testes serológicos para pesquisa de anticorpos, pode analisar-se a exposição ou não do hospedeiro aos parasitas, independentemente da manifestação de sinais clínicos. Estes apresentam uma maior sensibilidade comparativamente à microscopia feita em esfregaços sanguíneos (Tamzali, 2013). Entretanto, a utilidade destes testes serológicos tornou-se incerta em regiões endémicas, uma vez que grande parte dos equinos já esteve exposto aos agentes mesmo não demonstrando sinais clínicos. Os testes de diagnóstico mais comumente usados são o teste imunoenzimático por competição (cELISA), o teste de fixação do complemento (CFT) e o teste de imunofluorescência indireta (IFAT) (Tamzali, 2013).

O teste de cELISA é, atualmente, considerado um dos meios de diagnóstico mais sensíveis para deteção de equinos infetados cronicamente ou portadores assintomáticos, sendo um teste exigido pela OIE para exportação de equinos. Este teste utiliza, no caso de *T. equi* um antígeno imunodominante exclusivo, EMA-1 recombinantes e anticorpos monoclonais específicos e, no caso de *B. caballi* utiliza a forma recombinante da proteína RAP1 (Sellon & Long, 2007).

Na técnica utilizada no teste de CFT ocorre a fixação do complemento durante a reação entre o antígeno específico do hemoparasita e o anticorpo de equinos infetados, sendo consideradas positivas se reagirem em diluições 1:5. Este teste é muito específico, mas pouco sensível, principalmente em casos crónicos ou pós tratamento (Sellon & Long, 2007).

Ainda dentro dos testes serológicos, o teste de IFAT é bastante específico, mas de baixa sensibilidade, no entanto, é mais sensível que o teste de CFT. É realizado em laboratório para confirmação e interpretação de resultados quando resultados do teste de fixação do complemento são inconclusivos, pois por vezes a quantidade de resultados falsos negativos é muito elevada. Durante este teste, o antígeno do parasita é colocado numa lamina de vidro a reagir com uma amostra de soro do equino, os anticorpos reativos são marcados e o soro é considerado positivo se for observada fluorescência sob luz ultravioleta (UV) em diluições superiores a 1:80 (Sellon & Long, 2007; Spickler, 2018).

Algumas das desvantagens em utilizar testes serológicos, prende-se com a impossibilidade de diagnosticar infeções pré-patentes, presença de anticorpos após a

recuperação ou administrações medicamentosas, assim como, a dificuldade existente em interpretar baixos títulos (Ali *et al.*, 1996).

Também é possível realizar o teste de cadeia de polimerase em tempo real (rt-PCR) quantitativo, sendo este atualmente o teste que apresenta maior sensibilidade e especificidade, tanto em infeções agudas ou crónicas (Lempereur *et al.*, 2017). *T. equi* é geneticamente variável, assim os testes de PCR poderão não ser os mais precisos. Nesses casos poderá realizar-se o teste de *Blot* em linha reversa, testes de PCR multiplex e o teste amplificação isotérmica mediada por *loop* (Spickler, 2018). Em contrapartida, após tratamento o equino pode ser negativo ao PCR, mas positivo a ELISA por 24 meses após a eliminação do hemoparasita. Apesar do teste de rt-PCR ser atualmente o teste com maior sensibilidade e especificidade, uma das desvantagens que persiste é o facto de ser um teste bastante dispendioso.

Cada um dos testes apresentados anteriormente, tem as suas vantagens e desvantagens dependendo da fase de infeção, assim de forma afirmar a ausência de infeção, a OIE recomenda a realização do teste de c-ELISA e PCR.

1.10 Tratamento

O objetivo do tratamento é eliminar os hemoparasitas dos animais infetados e diminuir, assim, o risco de transmissão da doença em zonas não endémicas. Consiste, numa combinação entre o tratamento de suporte e sintomático (Tamzali, 2013). Em contrapartida, em zonas não endémicas, o tratamento médico apresenta a função de controlar os sinais clínicos e não a eliminação da infeção na totalidade, pois, a constante estimulação do sistema imunitário de animais persistentemente infetados serve como medida de proteção destes, além de que a total eliminação das carraças mostra-se inviável (Wise *et al.*, 2013). Ao manter níveis baixos de parasitémia em animais infetados, juntando à ausência de *stress*, imunossupressão e doenças concomitantes, é possível manter imunidade suficiente para que não se desenvolvam quadros de doença aguda (Tamzali, 2013).

Atualmente, o fármaco que apresenta uma maior eficácia no tratamento de infeções causadas por *T. equi* e *B. caballi* é o dipropionato de imidocarb (DI), uma vez que atua nos estágios intraeritrocitários de ambos os parasitas, provocando alterações no núcleo e

formando vacúolos no citoplasma dos mesmos (Tamzali, 2013; Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), 2019). O protocolo de tratamento consiste em duas administrações intramusculares na dose de 2mg/kg com um intervalo de 24 horas contra a infeção de *B. caballi*. Já contra a infeção por *T. equi* recomenda-se a administração de quatro doses de 4mg/kg em intervalos de 72 horas, apesar deste protocolo nem sempre eliminar o parasita (Belloli *et al.*, 2002).

Após a administração do fármaco dipropionato de imidiocarb dentro dos efeitos secundários que podem surgir, destacam-se sinais de irritação no local da administração, desconforto abdominal, tremores, agitação e sudação (Irby, 2002). Sinais de cólica são bastante comuns, uma vez que o dipropionato de imidiocarb aumenta o peristaltismo, de forma a aliviar este desconforto pode recorrer-se à administração de anti-inflamatórios não esteroides, por exemplo, fluxina meglumina na dose de 1,1 mg/kg podendo ser administrado quando surgem sinais de dor, também, pode recorrer-se à administração de espasmolíticos, por exemplo, a atropina numa dose de 0,01-0,1 mg/kg podendo ser administrada tanto por via intramuscular, endovenosa ou subcutânea, é importante que haja uma monitorização de forma a controlar o possível aparecimento de impactações devido à diminuição de motilidade (Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), 2010, 2019, 2023).

Devido à sua metabolização hepática e renal, às suas propriedades tóxicas e à bioacumulação do DI, pode ocorrer lesões e necrose nestes órgãos, sendo imprescindível a monitorização destes animais, esta deveria ser realizada antes do início do tratamento, de forma a avaliar o estado destes órgãos e depois do tratamento de forma a verificar as possíveis sequelas deixadas pelo fármaco (Belloli *et al.*, 2002; Rothschild, 2013).

Apesar da pouca literatura existente, há relato de que éguas lactantes infetadas, ao receber uma dose única intramuscular de 2,4 mg/kg, o DI foi detetado no leite duas horas após a administração, no entanto, não é claro se esta apresenta toxicidade para o lactente (Wise *et al.*, 2013).

Outro fármaco que pode ser usado no tratamento de PE é o aceturato de diminazeno, numa dose de 5-12mg/kg, em duas administrações com intervalos de 24-48 horas. Existem evidências da eficácia na eliminação total dos parasitas recorrendo a esta terapêutica (Rothschild, 2013; Taylor *et al.*, 2016). No entanto, as administrações

intramusculares deste fármaco estão ligadas ao aparecimento de lesões musculares, letargia e dificuldade respiratória (Rothschild, 2013; Wise *et al.*, 2013).

Como complemento ao tratamento contra a infeção causada por *T. equi* pode recorrer-se a tetraciclinas, por exemplo a oxitetraciclina numa dose de 5 a 6 mg/kg numa única dose diária, por via endovenosa durante 5 a 7 dias (Zobba *et al.*, 2008).

Existem ainda outros protocolos de tratamento para a PE, nomeadamente o uso da amidocarbalida, buparvaquona e a euflavina. No entanto, devido aos seus efeitos secundários e limitações na eliminação dos agentes, estes já não são comumente usados na prática clínica (Wise *et al.*, 2013).

O tratamento de suporte passa por uma boa nutrição e hidratação ao longo da terapia, principalmente em caso de uso do dipropionato de imidiocarb. Quando necessário, faz-se uso de anti-inflamatórios não esteroides, fluidoterapia, transfusões sanguíneas e suplementação vitamínica (Mike A. *et al.*, 2007; Wise *et al.*, 2013).

1.11 Profilaxia

A profilaxia da PE requer a adoção de medidas de controlo dos vetores ixodídeos, restrições à movimentação de animais positivos e aplicação de protocolos terapêuticos adequados (Tamzali, 2013).

Em zonas endémicas, animais infetados apresentam uma imunidade adquirida que se torna um mecanismo de defesa contra o desenvolvimento da doença clínica, assim não se deve implementar qualquer medida, apenas o tratamento de animais que exibiam sinais da doença ou banhos acaricidas, prevenindo que a doença se propague, usando por exemplo: piretróides e formamidinas (Broning, 1996; Onyiche *et al.*, 2019).

Em zonas não endémicas, a legislação e as restrições diferem de país para país, mas a maioria dos animais infetados estão sujeitos a um período de quarentena, até que haja a confirmação da infeção, normalmente realizada através de testes serológicos. A prevenção da introdução de agentes ixodídeos em zonas não endémicas que fazem fronteira com regiões endémicas é bastante complicada, assim a desparasitação dos equinos usando nomeadamente ivermectinas é um processo bastante comum, assim como a diminuição da vegetação e vigilância de zonas de maior risco de contágio (Wise *et al.*, 2013).

Atualmente não existe nenhuma vacina eficaz contra *B. caballi* e *T. equi* (Spickler, 2018).

Em situações específicas, como competições internacionais, animais positivos podem entrar em zonas não endémicas. Em contrapartida, nos Estados Unidos da América (EUA), já decorrem alguns eventos equestres em que exigem um teste negativo à PE, mesmo que o animal resida no país. Procedimentos que possam expor equinos ao sangue de outros equinos, como partilha de agulhas, transfusões em regime hospitalar, devem ser negativos à piroplasmose (Spickler, 2018).

1.12 Impacto económico

A PE representa um grande problema económico uma vez que restringe o movimento de equinos, a participação em eventos equestres e é um entrave a muitos negócios de compra e venda de equinos. Vários países exigem testes serológicos negativos para assegurar que os animais não são positivos à PE antes de serem transportados, como é o caso dos EUA. Nesses países, quando surgem casos de equinos positivos para *B. caballi* ou *T. equi*, estes podem ser sujeitos a quarentena, eutanásia, retorno para o país de origem ou inscrição num programa de pesquisa de tratamento do *United States Department of Agriculture* (USDA) (American Association of Equine Practitioners (AAEP), 2021).

Em Portugal, tendo em conta a crescente expansão da exportação do cavalo Puro Sangue Lusitano, o facto de sermos um país endémico, a PE representa um grande impedimento à exportação de equinos para países não endémicos, comprometendo oportunidades de negócio e divulgação da raça.

1.13 Exportação de Equinos para os EUA

A exportação de equinos da raça Puro Sangue Lusitano está em crescente expansão, sendo os EUA os maiores importadores. Associada às mudanças climáticas e ao aumento da comercialização de equinos a nível mundial, há uma atual tendência para o aumento do aparecimento de casos de PE nos EUA. Assim, de forma a tentar reduzir o risco de importação de equinos positivos à PE nos EUA, desde 1970 os EUA exigem testes serológicos para a entrada temporária ou permanente de equinos, regulados pelo *Nacional Veterinary Services Laboratories* (NVSL) (Traub-Dargatz *et al.*, 2010).

Para um equino entrar oficialmente nos Estados Unidos, tem que realizar um período de quarentena mínimo de 72 horas à chegada, para além de testarem negativo para durina, mormo, tripanossomose, peste equina, linfangite epizoótica, linfangite ulcerosa, estomatite vesicular, piroplasmose equina, anemia infecciosa equina e metrite contagiosa equina, assim como, apresentar um certificado sanitário oficial fornecido pelo país exportador, uma licença de importação emitida pelos serviços Nacionais de Importação e Exportação e, se aplicável, uma reserva num centro de importação de animais e numa instalação de quarentena aprovada para metrite contagiosa equina (Serviço de Inspeção Sanitária Animal e Vegetal (USDA), 2023).

A OIE recomenda aquando de uma importação de um equino, que autoridades veterinárias do país importador exija um certificado veterinário internacional, provando que o animal não apresentou nenhum sinal clínico no dia do embarque, que foi submetido a testes serológicos com resultados negativos durante 30 dias antes do embarque e que foram mantidos sem contacto com vetores (carraças) também no prazo de 30 dias antecedentes ao embarque (World Organisation for Animal Health (OIE), 2011).

À chegada os equinos são testados pelos Serviços de Química e Analítica de Parasitologia (PCAS) na secção de serologia de forma a comprovar que o teste feito anteriormente não é fraudulento e garantindo a integridade do programa de vigilância de doenças de importação e exportação (Serviço de Inspeção Sanitária Animal e Vegetal (USDA), 2023).

Qualquer equino nascido em território nacional português, deve ser identificado legalmente, através da aplicação do microchip e registo, sendo emitido o “livro azul” a equinos inscritos em livros genealógicos e “livro verde” aos restantes, legalmente equinos inscritos em livros genealógicos são identificados como “equinos registados” e os restantes como “equinos de criação e rendimento” (Decreto-Lei n.º 123/2013, de 28 de agosto; FEP, 2018).

O transporte de equinos para os EUA é realizado maioritariamente por via aérea, existindo variadas transportadoras disponíveis, sendo o proprietário responsável por realizar essa escolha consoante o local de destino do equino, por toda a logística e valor monetário associado ao transporte.

A pedido dos Estados Unidos quando um equino é importado, este deve ser testado contra a piroplasmose através do teste serológico ELISA, no entanto, é comum realizar-se também o teste de CFT (Traub-Dargatz *et al.*, 2010). O teste de eleição é o teste de ELISA uma vez que apresenta uma maior sensibilidade para detetar equinos com infeções crónicas comparando ao teste de CFT que apresenta uma maior especificidade em casos de infeções agudas (Traub-Dargatz *et al.*, 2010).

Assim quando um equino é exportado de Portugal para os EUA, deve fazer-se acompanhar da sua identificação (microchip e livro de identificação), passaporte, testes serológicos negativos, o certificado sanitário assinado pelo veterinário (verificando que não surgiu nenhum caso de PE nas instalações nos 60 dias adjacentes à exportação) (Traub-Dargatz *et al.*, 2010), assim como, de toda a burocracia associada ao transporte que fica ao encargo do proprietário e da transportadora.

III. Objetivos do estudo

- Estabelecer a prevalência de piroplasmose equina numa população de equinos da raça Puro Sangue Lusitano criados em Portugal continental e destinados a exportação, através da análise de testes serológicos realizados (cELISA, CFT e IFAT).
- Identificar qual a espécie parasitária mais prevalente dentro do grupo estudado, bem como a idade e género mais afetados.
- Comparar os testes serológicos usados quanto à positividade dos resultados.
- Estabelecer a distribuição geográfica dos animais positivos para a PE.
- Destacar os principais fatores de risco.

IV. Materiais e Métodos

1. Caracterização do estudo

O presente estudo retrospectivo foi realizado com base no registo de testes serológicos realizados a 201 equinos entre 2020 e 2022, por parte da BJCM-VET. A recolha de dados foi realizada pela autora durante o período de estágio curricular através dos registos arquivados pela clínica. Por fim estes resultados foram colocados numa base de dados no programa informático Microsoft Excel, de forma a posteriormente ser realizada uma análise descritiva e estatística.

As informações obtidas de cada ficha, basearam-se na recolha da raça de cada equino, assim como, o local de nascimento, do género, da idade, testes serológicos realizados, positividade ou negatividade dos mesmos, assim como, a qual dos hemoparasitas (*Babesia caballi* e *Theileria equi*) e por fim a sua aptidão e país de exportação.

2. Análise Estatística

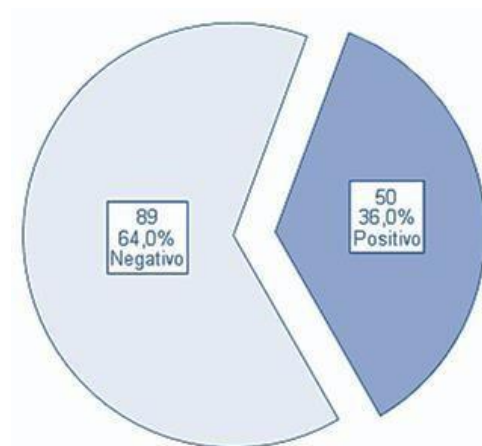
Foi realizada a análise estatística descritiva dos resultados obtidos, utilizando o programa Microsoft Excel® 2019, a partir da recolha de dados.

As variáveis foram também, analisadas estatisticamente, utilizando o programa SPSS® Statistics 25 Software, recorrendo ao teste do Qui-quadrado. Este teste é descrito por Marôco (2011), como uma forma de investigar a relação entre duas variáveis qualitativas. Existindo duas hipóteses, quando duas variáveis são independentes, ou seja, não existe relação entre elas, ou duas variáveis que apresentam relação entre si, ou seja, existe uma relação entre as variáveis, isto ocorre quando o nível de significância (p) é inferior a 5%. Assim, quando este valor é superior a 5% pode-se concluir que as variáveis não estão relacionadas entre si.

V. Resultados

Da amostra total de 201 animais, o estudo foi restringido a 139 equinos, uma vez que foram selecionados apenas equinos da raça Puro-Sangue Lusitano, nascidos em Portugal continental, destinados à modalidade de ensino e com destino, como país importador, os EUA. Os restantes 62 equinos excluídos da amostra em estudo, resumem-se a equinos que não foram possíveis localizar por motivos de confidencialidade ou falta de informação, até mesmo por não estarem registados na Associação Portuguesa de Criadores Cavalos Puro-Sangue Lusitano (APSL) e equinos de outras raças, maioritariamente *Warmblood*.

Dos equinos incluídos na presente pesquisa (139), 64,0% (89) testaram negativo para a piroplasmose e 36,0% (50) positivo (Gráfico 4).



$$X^2_{(1)} = 10,942; p = 0,001$$
$$Res_{Ajust} = 2,34 \text{ Negativo}$$

Gráfico 4- Frequência relativa de animais negativos e positivos para piroplasmose.

Considerando que o total da amostra foram os 139 (100%) equinos, 11 (7,9%) foram fêmeas e 128 (92,1%) foram machos (Gráfico 5).

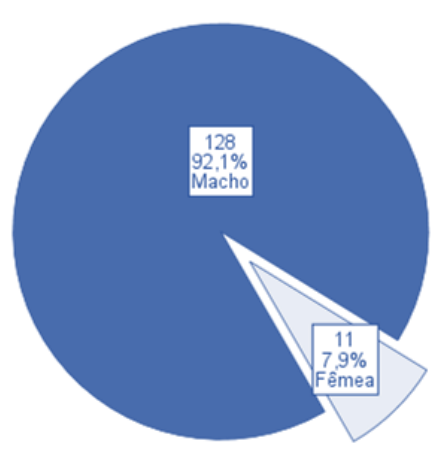


Gráfico 5- Frequência Relativa de cada género do total da amostra estudada.

Considerando apenas os animais que testaram positivos, 45 (90%) foram machos e 5 (10%) foram fêmeas (Gráfico 6).

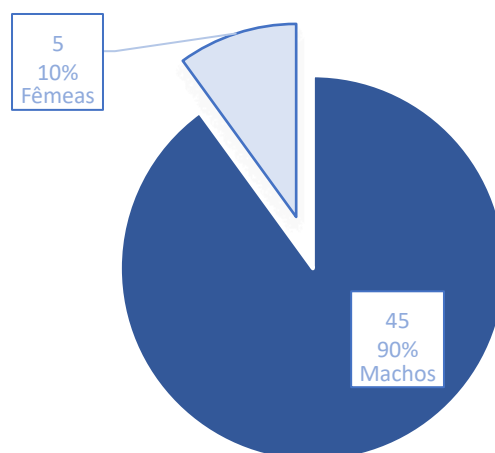
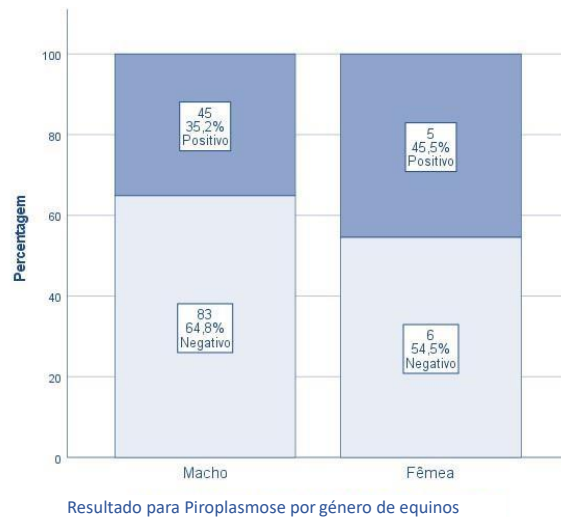


Gráfico 6- Frequência relativa do género na amostra positiva para Piroplasmose.

A distribuição de positivos e negativos quanto ao género está ilustrado no Gráfico 7. Observa-se que 35,2% dos equinos machos apresentaram resultado positivo à piroplasmose, contra 64,8% negativos e nas fêmeas 45,5% testaram positivos, contra

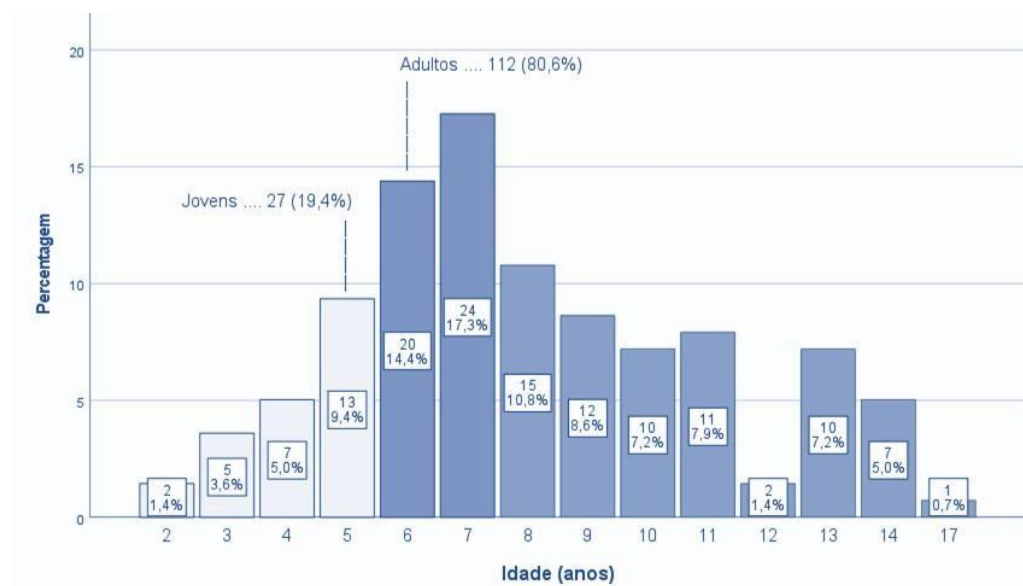
54,5% negativos. Apesar da maior proporção de casos positivos observada nos animais do género feminino, estes resultados não revelaram a existência de uma relação significativa entre o género do equino e a presença de piroplasmose, não havendo assim evidências de uma maior tendência para positividade nos animais do género feminino.



$$X^2_{(1)}=0,466; p=0,524$$

Gráfico 7- Frequência relativa de animais negativos e positivos à piroplasmose em função do género.

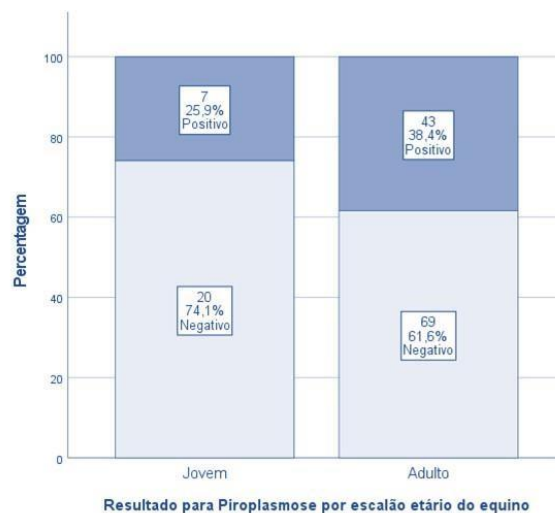
Considerando a distribuição etária (Gráfico 8), os equinos apresentaram entre 2 e 17 anos, sendo, a maioria, 80,6% adultos (> 5 anos) e, uma menor proporção, 19,4% jovens (2-5 anos). Os equinos com 6 e 7 anos de idade foram os mais representados na amostra, correspondendo respetivamente a 14,4% e 17,3%, num total de 31,7%. Teve-se ainda 34,5% dos equinos com idades entre os 8 e os 11 anos. Em média apresentam 8,0 +/- 3,06 (Desvio Padrão) anos, tendo 25% até 6 anos, 50% até 7 anos e 75% até 10 anos.



Média= 8,0 anos Desvio Padrão=3,06 $P_{25}=6,0$ Mediana=7,0 $P_{75}=10,0$

Gráfico 8- Frequência relativa de animais jovens e animais adultos, no total da amostra em estudo.

Ainda quanto ao escalão etário, a distribuição dos positivos e negativos está apresentado no Gráfico 9. Observou-se que 25,9% dos equinos jovens (2-5 anos) apresentaram resultados positivos e 74,1% negativos, enquanto que nos adultos (>5 anos), 38,4% apresentaram resultados positivos e 61,6% negativos. Apesar da maior proporção de casos positivos observada nos animais adultos, não existiu uma associação significativa entre o escalão etário do equino e o resultado à piroplasmose, não havendo assim evidências de uma maior tendência à positividade nos equinos adultos.



$$X^2_{(1)} = 1,468; p = 0,269$$

Gráfico 9- Frequência relativa de animais positivos e negativos por escalão etário, no total da amostra em estudo.

Relativamente à origem dos equinos (Figura 3), um total de 33,8% eram oriundos do Ribatejo, sendo esta a região com maior representação na amostra. Depois, 20,9% eram oriundos da Extremadura, 15,8% do Alto Alentejo, 12,2% da Baixo Alentejo e, igualmente, 12,2% do Beira Litoral. As zonas mais a Norte de Portugal (Douro Litoral, Beira Alta e Minho) foram as que têm menos representação de equinos na amostra, nomeadamente entre 0,7 e 2,2%. Não existindo equinos provenientes das regiões de Trás-os-Montes e Algarve.

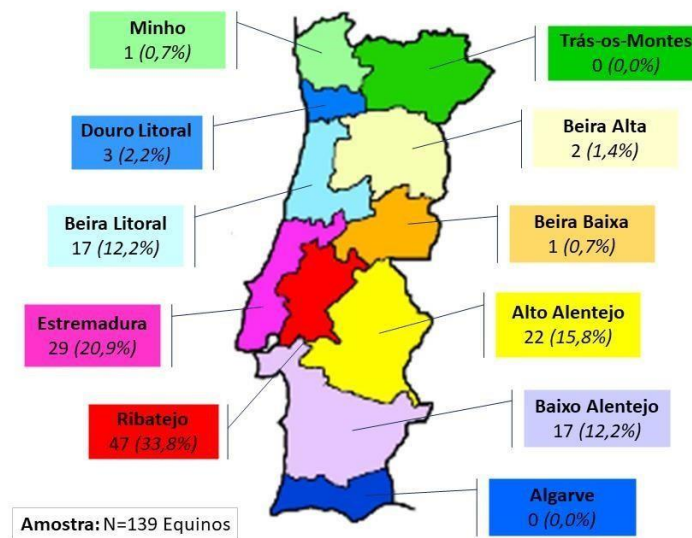
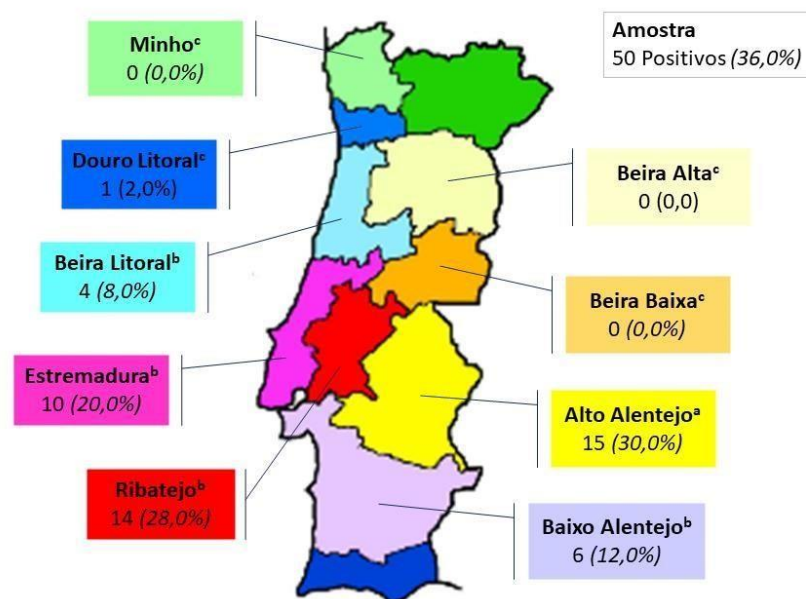


Figura 3- Frequência relativa de animais por região, no total da amostra em estudo.

Na Figura 4 é apresentada a distribuição dos equinos positivos, por região de origem. Observou-se que o Alto Alentejo é a região que conta com mais casos (30,0%), seguida do Ribatejo, com 28,0% e da Estremadura, com 20,0%. No Baixo Alentejo estão 12,0% dos casos positivos da amostra, na Beira Litoral 8,0% e no Douro Litoral 2,0%. Nas regiões da Beira Baixa, Beira Alta e Minho não se regista nenhum caso positivo para a piroplasmose.

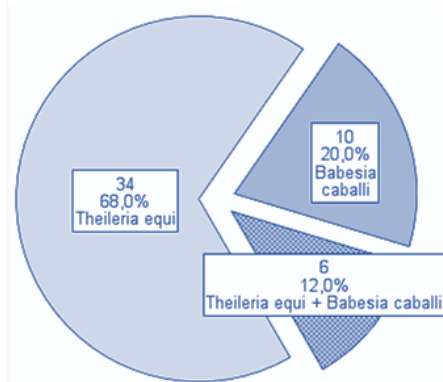
Dos 22 equinos oriundos do Alto Alentejo, 68,2% apresentaram-se positivos, a maior frequência registada de entre as 9 regiões. Estes resultados revelam que nos equinos oriundos do Alto Alentejo, a proporção de equinos positivos é significativamente superior a proporção de equinos negativos. Nas restantes regiões a proporção de equinos positivos à PE não se apresentam significativamente diferente da proporção de negativos.



a,b,c- Regiões assinaladas com letras diferentes, diferem em proporção de casos positivos para $p < 0,05$.

Figura 4- Distribuição dos equinos positivos à PE, por região de origem.

Quanto aos agentes etiológicos envolvidos, dos 50 animais que testaram positivo, a maioria (68,0%) revelaram unicamente a presença do parasita *Theileria equi* e 20,0% unicamente a de *Babesia caballi*. Um total de 12,0% (6 equinos) revelaram a presença de ambos os parasitas. Estes resultados revelam que existe uma tendência significativa para os equinos positivos da amostra apresentarem em exclusivo o parasita *Theileria equi* e a não apresentarem os 2 parasitas em simultâneo (Gráfico 10).



$$X^2_{(2)} = 27,520 \text{ } p < 0,001$$

$$Res_{Ajust} = 4,23 \text{ } Theileria \text{ equi}$$

$$Res_{Ajust} = -2,62 \text{ } Theileria \text{ equi} + Babesia \text{ caballi}$$

Gráfico 10- Frequência relativa de cada hemoparasita, detetados no total da amostra de animais positivos.

Para a avaliação dos casos positivos à piroplasmose e deteção dos parasitas *Theileria equi* e *Babesia caballi*, foram utilizados 3 testes diagnóstico, nomeadamente o IFAT, cELISA e CFT.

Como é possível observar no Gráfico 11, o teste IFAT foi o mais usado nos testes diagnósticos, nomeadamente 34 (24,5%), já o teste de cELISA detetou 17 infeções (12,2%) e, por fim, o teste de CFT detetou 4 (2,9%) equinos infetados. Houve diferenças significativas na proporção de casos positivos para diferentes testes ($X^2 = 28,442$ $p < 0,001$), com o IFAT apresentando uma taxa maior de deteção de positivos do que o cELISA, que por sua vez, foi superior ao CFT (% positivos IFAT > cELISA > CFT).

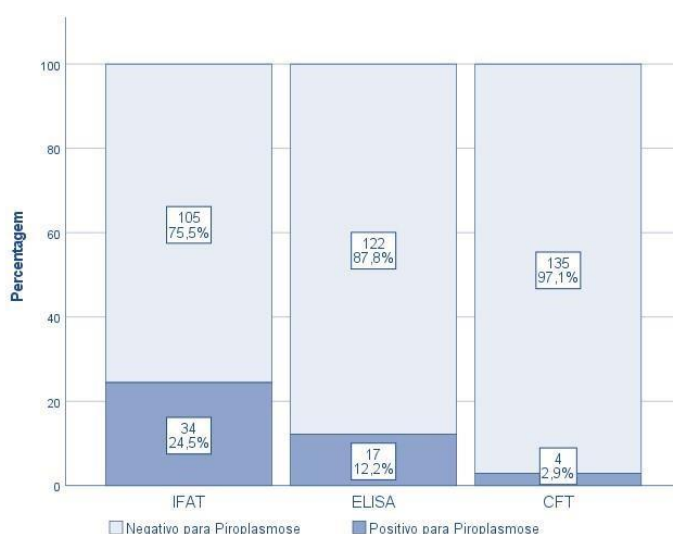


Gráfico 11- Frequências relativas dos testes de diagnóstico usados na presente pesquisa.

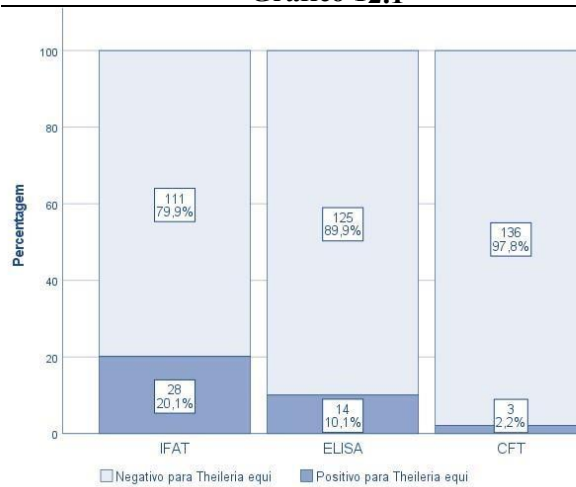
Em seguida, analisou-se a relação entre os testes usados em relação a cada hemoparasita. Semelhante a análise global, o IFAT detetou um número maior de positivos para *Theileria equi*, nomeadamente 28 (20,1%). Já o teste cELISA detetou 14 casos, ou seja 10,1% dos equinos com resultados positivo para *Theileria equi*. Por fim, o teste CFT detetou 3 casos, ou seja 2,2% de casos positivos para *Theileria equi* (Gráfico 12.1 e Tabela 2). Na análise dos casos, houveram diferenças significativas na deteção de casos positivos para *Theileria equi* entre os diferentes testes ($X^2_{(2)}=23,466$ $p<0,001$), sendo a eficácia dos testes IFAT e cELISA significativamente superior à do teste CFT. Entre os testes IFAT e cELISA não se observam diferenças estatisticamente significativas de resultados na deteção do parasita.

Dos 40 casos que apresentaram resultado positivo ao parasita *Theileria equi*, o teste IFAT detetou a presença em 70,0% (28/40 casos), o teste de cELISA em 35,0% (14/40 casos) e o teste de CFT em 7,5% (3/40 casos). No conjunto os 3 testes tiveram 45 resultados positivos para *Theileria equi* (Tabela 3).

Na deteção do parasita *Babesia caballi*, o teste IFAT foi o que mais uma vez revelou detetar o maior número de casos, nomeadamente 11, correspondendo a 7,9% de resultados positivos para *Babesia caballi*. Já o teste cELISA detetou 4 casos, ou seja 2,9% dos resultados positivo para *Babesia caballi*. Por fim, o teste CFT detetou somente 1 caso positivo para *Babesia caballi*, representando 2,2% da amostra (Gráfico 12.2 e Tabela 2). Houve diferenças significativas na deteção de casos positivos do parasita *Babesia caballi* entre os diferentes testes ($X^2_{(2)}=10,269$ $p=0,006$), sendo a eficácia do teste IFAT significativamente superior à do teste CFT. O teste cELISA não apresenta resultados significativamente diferentes do teste IFAT e CFT.

Dos 16 casos com *Babesia caballi*, o teste IFAT detetou a presença em 68,8% (11/16 casos), o teste de cELISA em 25,0% (4/16 casos) e o teste de CFT em 6,3% (1/16 casos). No conjunto os 3 testes tiveram 16 resultados positivos para *Babesia caballi* (Tabela 3).

Gráfico 12.1



$$X^2_{(2)}=23,466 \text{ } p<0,001$$

% positivos IFAT e ELISA > CFT

Gráfico 12.2



$$X^2_{(2)}=10,269 \text{ } p=0,006$$

% positivos IFAT > CFT

Gráfico 12- Frequências relativas da deteção do parasita *Theileria equi* (12.1) e de *Babesia caballi* (12.2) em função do teste diagnóstico usado.

Tabela 2- Resultados positivos ao parasita *Theileria equi* e *Babesia caballi* por testes IFAT, cELISA e CFT realizados.

Deteção	Resultados positivos						X ² ₍₂₎	p	% positivos
	IFAT		ELISA		CFT				
	n	%	n	%	n	%			
Piroplasmose	34	24,5 ^a	17	12,2 ^b	4	2,9 ^c	28,442	<0,001	IFAT > ELISA > CFT
<i>Theileria equi</i>	28	20,1 ^a	14	10,1 ^a	3	2,2 ^b	23,466	<0,001	IFAT e ELISA > CFT
<i>Babesia caballi</i>	11	7,9 ^a	4	2,9	1	0,7 ^b	10,269	0,006	IFAT > CFT
Abc- Testes com letras diferentes indicam proporções significativamente diferentes para p<0,05									

Abc- Testes com letras diferentes indicam proporções significativamente diferentes para $p<0,05$

Tabela 3- Parasitas detetados por teste, nos equinos positivos para *Theileria equi* e *Babesia caballi*.

	Teste								Total
			IFAT		ELISA		CFT		Deteções
	N	% PE	n	%	n	%	n	%	n
<i>Theileria equi</i>	40	80,0	28	70,0	14	35,0	3	7,5	45
<i>Babesia caballi</i>	16	32,0	11	68,8	4	25,0	1	6,3	16
Total	50	100,0	5 ^a		1 ^a		0 ^a		6 ^a

a- Número de equinos detetados com ambos os parasitas

VI. Discussão

Da amostra analisada no presente estudo, é possível observar que a maioria dos animais estudados testou negativo e isso deve-se, de uma forma geral, aos esforços profiláticos realizados por parte dos criadores e veterinários de forma a, principalmente, minimizar prejuízos às trocas comerciais. Parte dessas medidas profiláticas incluem controlo de vetores (por exemplo, derivados da família dos piretróides: permetrina e cipermetrina, ou deltametrina), conhecimento das áreas com maior carga de vetores e cuidados de forma a evitar infeções iatrogénicas (Feijo & Nogueira, 2013; Onyiche *et al.*, 2019).

É possível constatar que a maioria dos animais incluídos na pesquisa são machos e, como esperado, a maioria dos casos positivos foram em machos também. Isso deve-se provavelmente à crescente procura de equinos desse género, preferencialmente castrados, para exportação, tal como indica um estudo realizado por Fenner *et al.* (2019). Segundo cavaleiros e treinadores, equinos castrados são menos ansiosos, mais calmos e mais fáceis de trabalhar que cavalos inteiros ou éguas (Duberstein & Gilkeson, 2010).

No entanto, no que diz respeito à positividade por género, a proporção de fêmeas positivas foi superior à dos machos, 45,5% e 36,2%, respetivamente. Quanto aos resultados positivos em fêmeas serem superiores aos dos machos, estes não revelam a existência de uma relação significativa entre o género do equino e a presença de piroplasmose. Segundo um estudo realizado por Camino *et al.* (2020) numa amostra de 3.368 equinos analisados, em que 1.778 eram machos e 1029 eram fêmeas, não houve qualquer relação significativa entre o género e a seropositividade dos equinos.

A maior proporção de animais adultos positivos tem relação com o fato dessa população específica de animais ter maior prevalência no atendimento da clínica. Além disso, deve-se pela escolha por parte dos compradores em adquirir animais desbastados e treinados, pois em muitos dos casos são adquiridos por pessoas com menos experiência (Duberstein & Gilkeson, 2010). Foi descrito em dois estudos, um realizado por Camino *et al.*, (2021) e outro por Kouman *et al.*, (2010) que equinos adultos apresentam uma maior tendência a serem positivos devido ao contacto com vetores ao longo da sua vida, assim como, o contacto com outros animais como é o caso de

ruminantes e, ainda, por se apresentarem muitas das vezes como persistentemente infetados sem apresentarem sinais clínicos.

Quanto à distribuição geográfica, a grande maioria dos animais estudados encontram-se na zona centro e sul do país, assim como, a maioria dos casos positivos, uma vez que, a área de atendimento foi maioritariamente realizada nestas zonas, são as zonas com maior concentração de criadores de equinos e também devido ao clima mais quente e seco, são as zonas mais propícias ao aparecimento de vetores. Um estudo realizado por Camino *et al.*, (2021) em Espanha revela que ao contrário do que acontecia anteriormente, em que Madrid mostrava uma seroprevalência de PE superior, às regiões de Castela, Leon e Extremadura apresentaram maior probabilidade de casos positivos à PE. Tendo estas zonas climas semelhantes à zona centro de Portugal. Já territórios como Andaluzia e Catalunha, que apresentam climas semelhantes à zona sul do nosso território, apresentam uma menor seroprevalência de PE, possivelmente devido à consciência e implementação de medidas profiláticas, visto que são zonas mais quentes e secas e, portanto, bastante propícias a apresentar uma prevalência alta de PE. Assim sendo, deveria implementar-se medidas profiláticas em zonas de maior risco, na tentativa de reduzir o número de infeções tal como foi realizado pelo país vizinho, estas medidas passam pelo conhecimento de áreas afetadas e controlo de vetores, desparasitações com produtos acaricidas, limpeza dos terrenos e estabulação dos equinos.

Em concordância com os resultados obtidos, existe uma maior prevalência de *Theileria equi* comparativamente a *Babesia caballi*, segundo a comunidade veterinária e um estudo realizado por Ribeiro *et al.*, (2013) no norte de Portugal. Ao longo dos últimos anos tem existindo um aumento do aparecimento de *Theileria equi* ao contrário do que acontecia antigamente, onde a *Babesia caballi* predominava. Num artigo publicado por Habela *et al.*, 1984, *T. equi* apresentava uma prevalência superior nas zonas do Ribatejo, Oeste, Coimbra e Aveiro, 54,7% e 22,5-23,3% respetivamente, enquanto que *B. caballi* apresenta para as mesmas zonas valores de prevalência na ordem dos 31,3% e 15-16,5%, no ano de 1989 nas mesmas zonas, *T. equi* passou a apresentar uma seroprevalência de 46,78% e *B. caballi* 14,1% (Habela *et al.*, 2000). Noutro estudo realizado por Camino *et al.*, (2021) em Espanha, revelou um aumento da

prevalência de *T. equi* comparativamente a *B. caballi*, este aumento tem vindo a ser notado não só em Portugal e Espanha, como em vários outros países de Europa, como Grécia, Itália e França.

Tal como foi possível observar nos resultados, o teste de IFAT foi o que detetou um maior número de infeções comparativamente ao teste de cELISA e o teste de CFT. Apesar de estar descrito na bibliografia, que o teste de ELISA é considerado, atualmente, o teste serológico mais sensível e o recomendado pela OIE desde 2004 para exportação de equinos de países endémicos para não endémicos, o teste de IFAT apresenta um maior número de deteções nos resultados obtidos.

Visto que, todos os testes foram realizados no mesmo laboratório, este opta por realizar sempre o teste de IFAT mesmo que não seja um teste obrigatório, de forma a prevenir a presença de falsos negativos.

Os resultados obtidos da relação entre o teste sorológico realizado e o parasita presente, revelaram que os testes de IFAT e cELISA foram os que mais detetaram *T. equi*, já para *B. caballi* o teste de IFAT apresentou resultados significativamente superiores comparativamente aos restantes. De acordo com os resultados obtidos, um estudo realizado por Camino *et al.*, (2021), revela que os testes de IFAT e ELISA detetaram um maior número de infeções por *Theileria equi* e o teste de IFAT detetou a maioria das infeções causadas por *Babesia caballi*.

Segundo um estudo epidemiológico de Onyiche *et al.*, (2019), foram identificadas 25% de amostras positivas para *B. caballi* pelo teste de ELISA comparativamente à técnica do CFT. De uma forma similar, nos resultados obtidos na presente pesquisa, o teste de ELISA detetou mais infeções do que o teste de CFT (2,9% vs. 2,2%). Ainda, para *B. caballi* o teste mais sensível é o IFAT, e isso refletiu-se também nos dados obtidos, apesar de ser menos específico, comparativamente com o teste de CFT (Sigg *et al.*, 2010). Para *T. equi* o teste de IFAT foi mais sensível que o teste de CFT enquanto que a especificidade estimada é a mesma (Sigg *et al.*, 2010). Os resultados apresentados, no Gráfico 12 e Tabelas 2 e 3, são concordantes com o estudo apresentado, uma vez que, o teste de IFAT detetou mais casos de *Babesia caballi* (7,9%) e de *Theileria equi* (70%) e o teste de CFT foi o que apresentou uma menor deteção de infeções, 2,2% e 7,9% respetivamente.

A principal limitação deste estudo advém do número reduzido de amostras estudadas e da limitação de grande parte dessas amostras corresponderem às mesmas zonas geográficas, não tendo sido possível a criação de amostras iguais para cada zona geográfica de forma a serem analisadas igualmente.

Outra limitação prende-se com o facto de as análises serem feitas com a esperança de que o animal seja negativo, ou seja, muitos destes animais quando testados para realização de trocas comerciais, já é expectável que sejam negativos à Piroplasmose. Muitos destes criadores já sabem as zonas com maior incidência de vetores, tentando de forma profilática contornar a infeção.

Tendo em conta a bibliografia existente relativamente à Piroplasmose em Portugal, este trabalho vem ajudar na descrição da distribuição de *Theileria equi* e *Babesia caballi* em território nacional, apesar das suas limitações como a bibliografia reduzida para comparar resultados, foi possível mostrar quais as zonas mais afetadas de acordo com o clima e perceber a importância da Piroplasmose na expansão do mercado de exportação de equinos da raça Puro Sangue Lusitano.

VII. Conclusão

Com os resultados deste estudo foi possível obter informações relevantes sobre a incidência de PE em Portugal, utilizando testes serológicos de equinos avaliados para exportação. Tendo em conta que nas últimas décadas, a indústria equestre tem vindo a crescer exponencialmente, a PE apresenta-se com um grande impacto nas trocas comerciais e competições equestres internacionais, daí alguns países implementarem medidas restritivas, de forma a manter o seu estatuto de não endémicos, como é o caso dos EUA.

Os objetivos deste estudo foram cumpridos, apesar das suas limitações, foi possível obter informações relevantes da epidemiologia da PE em Portugal, qual os testes serológicos são mais comumente utilizados, tendo em conta o teste obrigatório para exportação, qual a faixa etária e género mais acometidos, assim como, a crescente incidência de *Theileria equi* comparativamente a *Babesia caballi*, as zonas geográficas mais atingidas pelos vetores comparando ao tipo de clima seco e quente que se faz sentir na zona centro e sul do território nacional, e por fim, as dificuldades que surgem para a realização de trocas comerciais.

Como sugestão de melhoramento ou trabalho adicional, dando continuidade a este estudo, poderia criar-se uma amostra superior e igual em todas as zonas do território nacional, aumentando assim a veracidade dos resultados.

São precisas mais investigações nesta área em Portugal, uma vez que, existe pouca bibliografia descrita, é uma zona endémica e o cavalo Puro Sangue Lusitano está em crescente expansão no mercado internacional. Estes estudos seriam uma mais valia para a comunidade veterinária, proprietários e criadores, de forma a consciencializar a comunidade não só para os entraves comerciais, mas também para a prevenção de novos casos, dando a conhecer os fatores de risco e a epidemiologia da PE.

VIII. Referências Bibliográficas

- Alberto Díaz-Sánchez, A., Roblejo-Arias, L., Marrero-Perera, R., & Corona-González, B. (2020). Piroplasmosis equina Equine Piroplasmosis. <https://eqrcode.co/a/UZEB0e>
- Ali, S., Sugimoto, C., & Onuma, M. (1996). Equine Piroplasmosis. *Journal of Equine Science*. 7(4), 67-77.
- American Association of Equine Practitioners (AAEP). (2021). Equine_Piroplasmosis_Guidelines_2021. Infectious Disease Guidelines: Equine Piroplasmosis.
- Belloli, C., Crescenzo, G., Lai, O., Carofiglio, V., Marang, O., & Ormas, P. (2002). Pharmacokinetics of imidocarb dipropionate in horses after intramuscular administration. *Equine Veterinary Journal*, 34(6), 625–629. <https://doi.org/10.2746/042516402776180124>
- Broning, A. (1996). Review Equine Piroplasmosis an Update on Diagnosis, Treatment and Prevention. In *British Veterinary Journal* (Vol. 152, Issue 2).
- Camino, E., Pozo, P., Dorrego, A., Carvajal, K. A., Buendia, A., Gonzalez, S., de Juan, L., Dominguez, L., & Cruz-Lopez, F. (2020). Importance of equine piroplasmosis antibody presence in Spanish horses prior to export. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 11(2). <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101329>
- Chhabra, S., Ranjan, R., Uppal, S. K., & Singla, L. D. (2012). Transplacental transmission of Babesia equi (Theileria equi) from carrier mares to foals. *Journal of Parasitic Diseases*, 36(1), 31–33. <https://doi.org/10.1007/s12639-011-0072-1>
- Coultous, R. M., Sutton, D. G. M., & Boden, L. A. (2022). A risk assessment of equine piroplasmosis entry, exposure and consequences in the UK. *Equine Veterinary Journal*, 55(2), 282–294. <https://doi.org/10.1111/evj.13579>
- De Waal, D. T. (1992). Special Review Series Equine Piroplasmosis: A Review (Vol. 148).

- de Wall, van H. & P. (1987). An Investigation Into the Clinical Pathological Changes and Sero-logical Response in Horses Experimentally Infected with *Babesia equi* and *Babesia caballi*. In *Onderstepoort J. vet. Res* (Vol. 54).
- Deger, S., Deger, Y., Bicek, K., Ozdal, N., & Gul, A. (2009). Status of Lipid Peroxidation, Antioxidants, and Oxidation Products of Nitric Oxide in Equine Babesiosis: Status of Antioxidant and Oxidant in Equine Babesiosis. *Journal of Equine Veterinary Science*, 29(10), 743–747. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2009.07.014>
- Departamento Científico e Técnico da OIE. (2009). Equine Piroplasmosis Aetiology Epidemiology Diagnosis Prevention and Control References. <http://www.oie.int/wahis/public.php?page=home>
- Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV). (2010). Resumo das Característica do Medicamento, Sultropin 0,5 mg/ml.
- Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV). (2019). Resumo das Característica do Medicamento, Imizol 85,00 mg/ml.
- Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV). (2023). Resumo das Característica do Medicamento, Flunixin 3E 50 mg/ml.
- Duberstein, K. J., & Gilkeson, J. A. (2010). Determination of sex differences in personality and trainability of yearling horses utilizing a handler questionnaire. *Applied Animal Behaviour Science*, 128(1–4), 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2010.09.012>
- Eliazar Camino, A. B. , A. D. , P. P. , L. de J. L. D. and F. C.-L. (2021). Sero-molecular survey and risk factors of equine piroplasmosis in horses in Spain. Short running title: Equine piroplasmosis in the horse population of Spain.
- Feijo, L., & Nogueira, C. (2013). Equine Oocytes-IVM View project Paracoccidioides spp. in Soil from the Pampa Biome in Southern Brazil View project. <https://www.researchgate.net/publication/280941860>
- Fenner, K., Caspar, G., Hyde, M., Henshall, C., Dhand, N., Probyn-Rapsey, F., Dashper, K., McLean, A., & McGreevy, P. (2019). It's all about the sex, or is it?

- Humans, horses and temperament. PLoS one, 14(5).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216699>
- Friedhoff, K. T., & Soulé, C. (1996). An account on equine babesioses *. In Rev. sci. tech. Off. int. Epiz (Vol. 15, Issue 3).
- Georges, K. C., Ezeokoli, C. D., Sparagano, O., Pargass, I., Campbell, M., D'Abadie, R., & Yabsley, M. J. (2011). A case of transplacental transmission of *Theileria equi* in a foal in Trinidad. *Veterinary Parasitology*, 175(3–4), 363–366.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.019>
- Habela, M. A. R. G., Sevilla, E., Corchero, J. P. F., De, V., & De, C. E. (2000). Diagnóstico y tratamiento de la Piroplasmosis equina.
- Irby, J.R. (2002). Anthrax, screwworms, and equine piroplasmosis – subdued but not eradicated. In Proceedings of the 48th American Association of Equine Practitioners Annual Convention, Orlando, Florida, USA, 4-8 December, pp. 12-15.
- Jalovecka, M., Sojka, D., Ascencio, M., & Schnittger, L. (2019). Babesia Life Cycle – When Phylogeny Meets Biology. In Trends in Parasitology (Vol. 35, Issue 5, pp. 356–368). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.01.007>
- Josie Traub-Dargatz, Barbara Bischoff, Angela James, & Jerome Freier. (2010). A Literature Review of Equine Piroplasmosis.
- L.D. Singla and Deepak Sumbria. (2019). Cutting edge meticulous appraisal of equine piroplasmosis in India and in rest of the Globe. *Indian J. Vet. Med*, 39, 1–10.
- Lempereur, L., Beck, R., Fonseca, I., Marques, C., Duarte, A., Santos, M., Zúquete, S., Gomes, J., Walder, G., Domingos, A., Antunes, S., Baneth, G., Silaghi, C., Holman, P., & Zintl, A. (2017). Guidelines for the Detection of Babesia and Theileria Parasites. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 17(1), 51–65.
<https://doi.org/10.1089/vbz.2016.1955>
- Mike A. Taylor, R. L. Coop, R. L. W. (2016). *Veterinary parasitology* (2016, WileyBlackwell) (Wiley Blackwell, Ed.; Fourth edi).

- Navarrete, I., & Serrano F.J. (1999). Babesiosis. In Campillo, M.C., Vasquez, F.A.R., Fernandez, A.R.M., Acedo, M.C.S., Rodriguez, S.H., Lopez-Cozar, I.N., Baños, P.D., Romero, H.Q., Varela, M.C., Parasitologia Veterinária. (pp. 587-592). Madrid: McGraw-Hill – Interamericana de España.
- Onyiche, T. E., Suganuma, K., Igarashi, I., Yokoyama, N., Xuan, X., & Thekiso, O. (2019). A review on equine piroplasmosis: Epidemiology, vector ecology, risk factors, host immunity, diagnosis and control. In International Journal of Environmental Research and Public Health (Vol. 16, Issue 10). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijerph16101736>
- Pereira, M.A.V.C., Massard, C.L., Faccini, J.L.H., & Siqueira, L.F.G. (2004). Ocorrência de *Babesia equi* (Laveran, 1901) e *Babesia caballi* (Nuttall & Strickland, 1912) em equinos da raça puro sangue inglês de pequenos estabelecimentos equestres. Arquivos do Instituto Biológico, 71(4);405-409.
- Acedido em 21 Agosto, 2023, disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V71_4/pereira.PDF
- Ribeiro, AJ, Cardoso, L., Maia, JM *et al.* Prevalência de *Theileria equi*, *Babesia caballi* e *Anaplasma phagocytophilum* em cavalos do norte de Portugal. Parasitol Res 112, 2611–2617 (2013). <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3429-9>
- Rothschild. (2013). Equine piroplasmosis. In Journal of Equine Veterinary Science (Vol. 33, Issue 7, pp. 497–508). <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.03.189>
- Rothschild, C. M., & Knowles, D. P. (2007). Equine Piroplasmosis. In Equine Infectious Diseases (pp. 465–473). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-14160-2406-4.50065-X>
- Sant, C., d’Abadie, R., Pargass, I., Basu, A. K., Asgarali, Z., Charles, R. A., & Georges, K. C. (2016). Prospective study investigating transplacental transmission of equine piroplasmosis in thoroughbred foals in Trinidad. Veterinary Parasitology, 226, 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.07.008>
- Scoles, G. A., & Ueti, M. W. (2015). Vector ecology of equine piroplasmosis*. In Annual Review of Entomology (Vol. 60, pp. 561–580). Annual Reviews Inc.

<https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-021110>

Sellon, D. C., & Long, M. T. (2007). Equine infectious diseases.

Sigg, L., Gerber, V., Gottstein, B., Doherr, M. G., & Frey, C. F. (2010). Seroprevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in the Swiss horse population. *Parasitology International*, 59(3), 313–317. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.02.005>

Spickler, A. R. (2018). Equine Piroplasmosis. www.cfsph.iastate.edu

Tamzali, Y. (2013). Equine piroplasmosis: An updated review. In *Equine Veterinary Education* (Vol. 25, Issue 11, pp. 590–598). <https://doi.org/10.1111/eve.12070>

Taylor, M. A. (Mike A.), Coop, R. L., & Wall, R. (Richard L.). (2016). *Veterinary parasitology* (Fourth).

Tirosh-Levy, S., Gottlieb, Y., Fry, L. M., Knowles, D. P., & Steinman, A. (2020). Twenty years of equine piroplasmosis research: Global distribution, molecular diagnosis, and phylogeny. In *Pathogens* (Vol. 9, Issue 11, pp. 1–32). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110926>

Traub-Dargatz, J. L., Acvim, D., Short, M. A., Pelzel, A. M., Norman, T. E., Knowles, D. P., & Acvp, D. (2010). *Equine Piroplasmosis*.

Van der Kolk, J. H. (2023). *Infectious Diseases of the Horse, Diagnosis, Pathology, Management, and Public Health*, 2nd Edition.

Wise, L. N., Kappmeyer, L. S., Mealey, R. H., & Knowles, D. P. (2013). Review of equine piroplasmosis. In *Journal of Veterinary Internal Medicine* (Vol. 27, Issue 6, pp. 1334–1346). <https://doi.org/10.1111/jvim.12168>

Wise, L. N., Pelzel-McCluskey, A. M., Mealey, R. H., & Knowles, D. P. (2014). Equine piroplasmosis. In *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice* (Vol. 30, Issue 3, pp. 677–693). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2014.08.008>

World Organisation for Animal Health (OIE). (2011). *Piroplasmosis Equina*. Código Sanitario Para Los Animales Terrestres.

World Organisation for Animal Health (OIE). (2021). *Equine Piroplasmosis Aetiology*

Classification of the causative agent.

[http://www.oie.int/wahis/public.php?page=home\]](http://www.oie.int/wahis/public.php?page=home)

Zobba, R., Ardu, M., Niccolini, S., Chessa, B., Manna, L., Cocco, R., & Pinna Parpaglia, M. L. (2008). Clinical and Laboratory Findings in Equine Piroplasmosis. *Journal of Equine Veterinary Science*, 28(5), 301–308.
<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2008.03.005>