



UNIVERSIDADE
LUSÓFONA

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

PREVALÊNCIA MOLECULAR DE PIROPLASMAS EM
EQUIDEOS DE PORTUGAL CONTINENTAL

Dissertação apresentada a provas públicas para a obtenção do grau de mestre em Medicina Veterinária, orientada por Professor Doutor David Ramilo, Professor Doutor Mário Cotovio [co-orientador] e Professora Doutora Joana Simões [co-orientadora].

Patrícia Alcaide Pereira

2026

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**PREVALÊNCIA MOLECULAR DE PIROPLASMAS EM
EQUIDEOS DE PORTUGAL CONTINENTAL**

Patrícia Alcaide Pereira

VERSÃO FINAL

Dissertação defendida por Patrícia Alcaide Pereira em provas públicas na Universidade Lusófona, Centro Universitário de Lisboa no dia 21/01 de 2026, perante o júri nomeado pelo Despacho de Nomeação n.º: 751/2025, de 5 de Janeiro, com a seguinte composição:

Presidente: Professora Doutora Maria Margarida Ferreira Alves (Universidade Lusófona - Centro Universitário de Lisboa)

Vogal: Professora Doutora Helga Marlene Cardoso Waap (Universidade Lusófona - Centro Universitário de Lisboa) - arguente

Orientador: Professor Doutor David Wilson Russo Ramilo (Universidade Lusófona - Centro Universitário de Lisboa)

Este trabalho também foi orientado pelo Professor Doutor Mário Cotovio (co-orientador) e pela Professora Doutora Joana Simões (co-orientadora).

Patrícia Alcaide Pereira

2026

Aqueles que passam por nós não vão sós.

Deixam um pouco de si e levam um pouco de nós

- Antoine de Saint-Exupéry

Resumo

A piroplasmose equina é uma doença parasitária de grande importância sanitária e económica, causada pelos protozoários intraeritrocitários *Babesia caballi* e *Theileria equi*, transmitidos principalmente por carrças dos géneros *Rhipicephalus*, *Hyalomma* e *Dermacentor*. Em Portugal, a doença é considerada endémica; contudo, a informação atualizada sobre a sua prevalência molecular é ainda limitada.

O presente estudo teve como objetivo determinar a prevalência molecular de piroplasmas em equídeos de Portugal Continental e identificar eventuais fatores de risco associados. Foram analisadas 339 amostras de sangue de equinos provenientes de diferentes regiões NUTS II, num intervalo de tempo entre dezembro de 2023 e maio de 2025. O DNA foi extraído a partir de sangue total e submetido a uma reação de PCR dirigida ao gene *18S rRNA*, utilizando *primers* universais para *Babesia caballi* e *Theileria equi*. Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose, purificados e posteriormente sequenciados para confirmação molecular.

A prevalência global obtida foi de 34,8%, com um intervalo de confiança de 95%, evidenciando a importância da doença em território nacional. A análise estatística revelou variações regionais e associações entre a positividade e variáveis como a região NUTS II a que pertencem, faixa etária, utilização/modalidade desportiva, tipo de pelagem, raça, estilo de vida e utilização de antiparasitários e respetivo princípio ativo. *Theileria equi* foi o único agente detetado, dentro de uma subpopulação de 20% das amostras positivas no teste de PCR, em concordância com estudos prévios realizados noutras regiões endémicas.

Estes resultados confirmam a endemidade da piroplasmose equina em Portugal e reforçam a necessidade de vigilância epidemiológica contínua e controlo eficaz de vetores, de forma a mitigar o impacto clínico e económico da doença, especialmente no contexto da movimentação internacional de equinos.

Palavras-chave: Piroplasmose equina, *Babesia caballi*, *Theileria equi*, equídeos, prevalência molecular.

Abstract

Equine piroplasmosis is a parasitic disease of major sanitary and economic importance, caused by the intraerythrocytic protozoa *Babesia caballi* and *Theileria equi*, which are mainly transmitted by ticks of the *Rhipicephalus*, *Hyalomma* and *Dermacentor* genera. In Portugal, the disease is considered endemic; however, updated information on its molecular prevalence remains limited.

The aim of this study was to determine the molecular prevalence of piroplasms in equids from mainland Portugal and to identify possible associated risk factors. A total of 339 blood samples from horses originating from different NUTS II regions were analyzed over a period between December 2023 and May 2025. DNA was extracted from whole blood and amplified by PCR, targeting the *18S rRNA* gene and using universal primers for *Babesia caballi* and *Theileria equi*. Amplified products were visualized by agarose gel electrophoresis, purified, and subsequently sequenced for molecular confirmation.

The overall prevalence obtained was 34.8%, with a 95% confidence interval, highlighting the importance of the disease at the national level. Statistical analysis revealed regional variations and associations between PCR positivity and variables such as NUTS II region, age group, use/sporting modality, coat type, breed, lifestyle, and the use of antiparasitic treatments and their respective active ingredients. *Theileria equi* was the only agent detected, within a subpopulation corresponding to 20% of the PCR-positive samples, in agreement with previous studies conducted in other endemic regions.

These results confirm the endemic status of equine piroplasmosis in Portugal and reinforce the need for continuous epidemiological surveillance and effective vector control in order to mitigate the clinical and economic impact of the disease, particularly in the context of international movement of equids.

Keywords: equine piroplasmosis, *Babesia caballi*, *Theileria equi*, equids, molecular prevalence.

Lista de abreviaturas

ADS – Agrupamento de Defesa Sanitária

AST – Aspartato Aminotransferase

CK – Creatina Quinase

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

NCBI – National Center for Biotechnology Information

NUTS II – Nomenclatura das Unidades Territoriais para Fins Estatísticos, nível II

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

qPCR- Reação em cadeia da polimerase em tempo real

PE – Piroplasmose Equina

rRNA – RNA ribossômico

SPSS – Statistical Package for the Social Sciences

TBE – Tris/Borato/EDTA (tampão usado em eletroforese)

WOAH – World Organisation for Animal Health (antiga OIE)

χ^2 – Teste do Qui-quadrado

Et al. – E outros, da locução latina “*et alli*”

Índice

I. Introdução	14
1. Agentes etiológicos.....	14
a Babesia caballi.....	14
b Theileria equi.....	15
c Vetores.....	16
2. Transmissão.....	17
a Carraça- equídeo.....	17
b Transplacentária.....	18
c Transestadial e transovarica.....	18
d Transmissão iatrogénica.....	19
3. Fisiopatologia	20
4. Sinais clínicos e formas de apresentação.....	21
a Forma hiperaguda.....	21
b Forma aguda.....	21
c Forma subaguda.....	22
d Forma crónica.....	22
5. Lesões <i>post mortem</i>.....	23
6. Diagnóstico.....	23
a Métodos diretos.....	24
b Métodos indiretos.....	26
7. Tratamento.....	26
8. Epidemiologia da Piroplasmose Equina em Portugal e no mundo.....	28
9. Profilaxia	29
II. Material e métodos	31
1. Tipo de estudo.....	31
2. Dimensão da Amostra.....	31
3. Caracterização da amostra.....	31
4. Colheita e conservação de amostras biológicas.....	32
5. Processamento da amostra em tubo seco.....	32

6.	Processamento da amostra em tubo de EDTA	32
a	Extração de DNA	32
b	Reação em cadeia de polimerase.....	33
c	Eletroforese em gel de agarose e visualização dos produtos de PCR	33
d	Sequenciação dos produtos de PCR.....	34
7.	Análise filogenética	34
8.	Análise Estatística	35
III.	Resultados	36
1.	Estatística descritiva.....	36
a	Região NUTS II	36
b	Sexo.....	37
c	Faixa etária.....	37
d	Utilização/modalidade	38
e	Tipo de pelagem.....	39
f	Raça.....	40
g	Estilo de vida	41
h	Utilização de antiparasitários.....	42
i	Princípio ativo do antiparasitário.....	43
j	Análise Filogenética	45
2.	Estatística inferencial	45
a	Regiões NUTS II	45
b	Sexo.....	45
c	Faixa etária.....	45
d	Utilização/modalidade	46
e	Tipo de Pelagem.....	46
f	Raça.....	46
g	Estilo de Vida.....	46
h	Utilização de antiparasitário	47
i	Princípio ativo do antiparasitário.....	47
IV.	Discussão.....	48
V.	Conclusões	54
VI.	Referências Bibliográficas	56
VII.	Anexos e apêndices	61

1.	Inquérito aos proprietários	62
2.	Formulário de consentimento informado.....	63
3.	Tabelas estatística inferencial	64
4.	Mapa coroplético representativo da prevalência por NUTS II.....	73
5.	Resultados da análise filogenética	74

Índice de tabelas

Tabela 1- Teste qui-quadrado região NUTS II	64
Tabela 2- Tabela cruzada resultado do teste x região NUTS II	64
Tabela 3- Teste qui-quadrado sexo.....	65
Tabela 4- Teste qui-quadrado faixa etária.....	65
Tabela 5- Tabela cruzada resultado do teste x faixa etária.....	66
Tabela 6- Teste qui-quadrado utilização/modalidade.....	66
Tabela 7- Tabela cruzada resultado do teste x utilização/modalidade.....	67
Tabela 8- Teste qui-quadrado tipo de pelagem.....	67
Tabela 9- Tabela cruzada resultado do teste x pelagem	68
Tabela 10- Teste qui-quadrado raça	68
Tabela 11- Tabela cruzada resultado do teste x raça	69
Tabela 12- Teste qui-quadrado estilo de vida	69
Tabela 13- Tabela cruzada resultado do teste x estilo de vida	70
Tabela 14- Teste qui-quadrado utilização de antiparasitários.....	70
Tabela 15- Tabela cruzada resultado do teste x utilização de antiparasitários.....	71
Tabela 16- Teste qui-quadrado princípio ativo do antiparasitário	71
Tabela 17- Tabela cruzada resultado do teste x princípio ativo do antiparasitário	72

Índice de figuras

Figura 1- Ilustração do ciclo de vida de Babesia caballi. Adaptado de Onyiche et al., 2020.	14
Figura 2- Ilustração do ciclo de vida de Theileria equi. Adaptado de Onyiche et al., 2020....	16
Figura 3- Eritrócitos parasitados por Theileria equi (A) e Babesia caballi (B). Adaptado de Onyiche et al., 2020.....	25
Figura 4- Mapa coroplético representativo da prevalência por NUTS II.....	73

Índice de gráficos

Gráfico 1- Casuística do estágio por especialidade e espécie.	12
Gráfico 2- Distribuição da casuística por espécie animal de acordo com as horas totais de estágio (600h).....	13
Gráfico 3- Distribuição da amostra por regiões NUTS II.....	36
Gráfico 4- Prevalência por região NUTS II.....	36
Gráfico 5- Distribuição da amostra por sexo.....	37
Gráfico 6- Prevalência por sexo	37
Gráfico 7- Distribuição da amostra por faixa etária	38
Gráfico 8- Prevalência por faixa etária	38
Gráfico 9- Distribuição da amostra por utilização/modalidade desportiva	39
Gráfico 10- Prevalência por utilização/modalidade	39
Gráfico 11- Distribuição da amostra por tipo de pelagem	40
Gráfico 12- Prevalência por tipo de pelagem	40
Gráfico 13- Distribuição da amostra por raça	41
Gráfico 14- Prevalência por raça.....	41
Gráfico 15- Distribuição da amostra por estilo de vida.....	42
Gráfico 16- Prevalência por estilo de vida	42
Gráfico 17- Distribuição da amostra por utilização de antiparasitários.....	42
Gráfico 18- Prevalência por utilização de antiparasitários.....	43
Gráfico 19- Distribuição da amostra por princípio ativo do antiparasitário.....	44
Gráfico 20- Prevalência por princípio ativo do antiparasitário.....	44

Casuística do estágio

Para conclusão do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, a autora realizou o estágio curricular inteiramente em regime ambulatorio com a Doutora Mariana Machado Seborro Moreira Carido, realizado no período de 9 de setembro de 2024 a 20 de dezembro de 2024, contabilizando um total de 600 horas.

A casuística do estágio compreendeu diferentes espécies, nomeadamente equinos, bovinos, ovinos, caprinos e canídeos.

Durante o período de estágio foi possível o acompanhamento de consultas nas diferentes áreas da medicina interna, reprodução, cirurgia e profilaxia. Para além de consultas agendadas, foi também possível acompanhar consultas de urgência e realização de trabalho de sanidade animal através de dois Agrupamento de Defesa Sanitária (ADS) distintos.

As consultas assistidas com maior frequência foram de profilaxia, reprodução, identificação de equinos e sanidade animal. A profilaxia foi realizada em equídeos, pequenos ruminantes, bovinos, canídeos, muflões e alpacas. A reprodução, por sua vez, contemplou equinos, ovinos e bovinos e a sanidade animal todos os ruminantes anteriormente referidos.

No gráfico seguinte, é possível a visualização de todos os tipos de consultas assistidas bem como a sua distribuição pelas diferentes espécies (Gráfico 1).

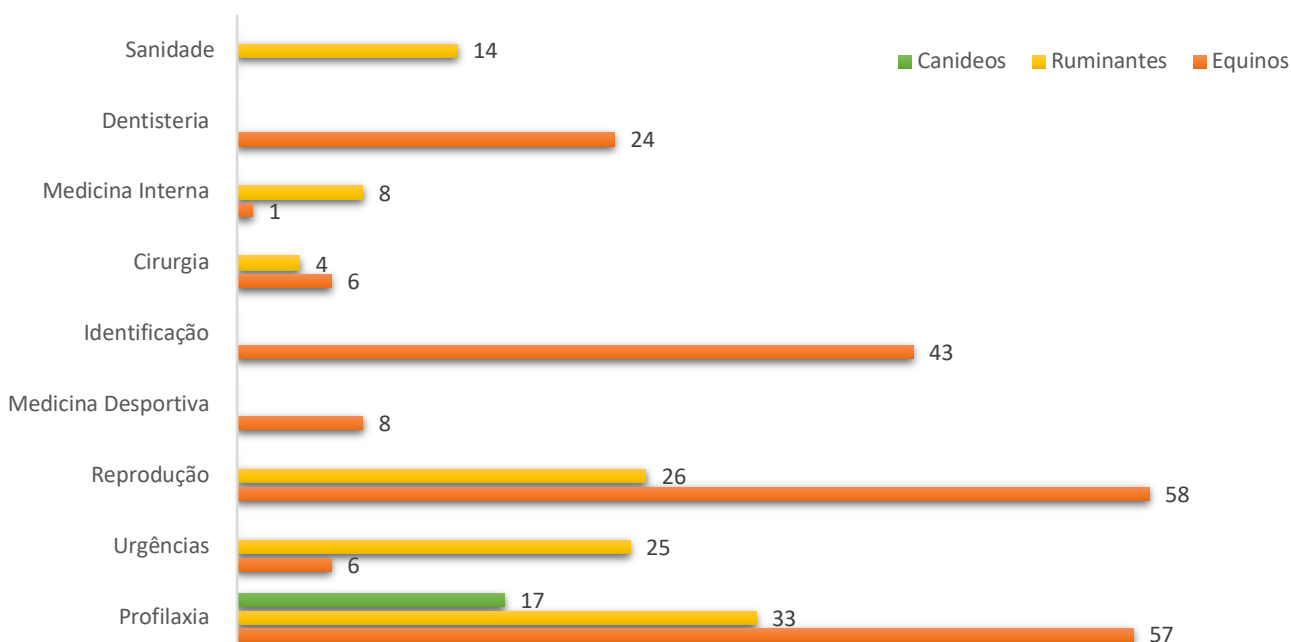


Gráfico 1- Casuística do estágio por especialidade e espécie.

O Gráfico 2 permite visualizar o peso que os diferentes tipos de espécies consultadas tiveram na casuística total do período de estágio. A percentagem apresentada baseia-se na distribuição de horas de estágio pelas diferentes espécies.

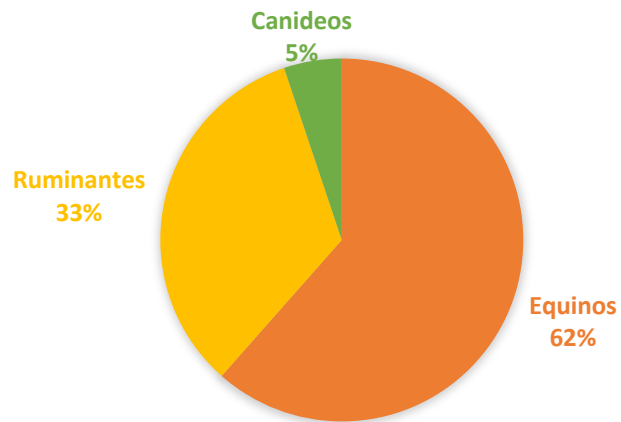


Gráfico 2- Distribuição da casuística por espécie animal de acordo com as horas totais de estágio (600h)

I. Introdução

A piroplasmose equina (PE) é de uma doença que afeta cavalos, asininos, muare e zebras, sendo tipicamente causada pelos hemoparasitas protozoários intraeritrocitários eucariotas *Babesia caballi* e *Theileria equi* (Wise *et al.*, 2013). Esta doença pode ainda ser causada pela espécie *Theileria haneyi*, que foi descrita pela primeira vez no Texas em 2018, mas que ainda não foi identificada na Europa. (Knowles *et al.*, 2018)

O nome “piroplasma” deriva da forma piriforme (aparência de uma pêra ou chama, consoante os autores) que as formas replicativas assumem dentro dos eritrócitos (Adaszek *et al.*, 2011).

1. Agentes etiológicos

a *Babesia caballi*

O protozoário *Babesia caballi* é um dos agentes causadores de PE. Este hemoparasita intraeritrocitário pertence ao Reino Protista, Filo Apicomplexa, Classe Aconoidasida, Ordem Piroplasmida e família Babesiidae (Moretti *et al.*, 2010). A sua transmissão típica acontece através da picada de carraças, que atuam como vetores biológicos (Giubega *et al.*, 2024).

O ciclo de vida de *Babesia caballi*, envolve dois hospedeiros: os equinos (hospedeiro vertebrado) e as carraças (hospedeiro invertebrado), ocorrendo em cada um deles uma forma diferente de reprodução, assexuada e sexuada respetivamente (Figura 1) (Taylor *et al.*, 2016).

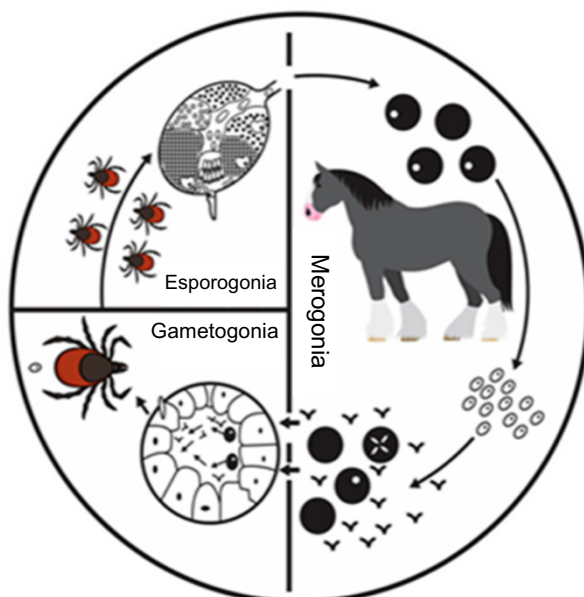


Figura 1- Ilustração do ciclo de vida de *Babesia caballi*. Adaptado de Onyiche *et al.*, 2020.

No momento em que, para se alimentar, o vetor infetado (carraça) pica o cavalo, ocorre a inoculação de esporozoítos, contidos na saliva da carraça, na circulação sanguínea periférica do equídeo. Já no interior dos eritrócitos, dá-se a transformação em trofozoítos, que sofre divisão binária, originando dois merozoítos. Este fenómeno reprodutivo assexuado culmina na rotura dos eritrócitos infetados e conseqüente libertação de merozoítos para a circulação sanguínea (Moretti *et al.*, 2010). A partir deste momento tornam-se capazes de invadir eritrócitos saudáveis e perpetuar os fenómenos reprodutivos assexuados. A contínua atividade reprodutiva do parasita leva a um aumento exponencial da parasitemia e proporcional agravamento dos sinais clínicos (Adaszek *et al.*, 2011).

Quanto mais elevada a carga parasitária em circulação no hospedeiro vertebrado (dez vezes superior em animais sintomáticos comparativamente a animais assintomáticos), maior a probabilidade de, no momento da picada da carraça para alimentação, ocorrer ingestão de eritrócitos parasitados. Uma vez no trato digestivo da carraça ocorre a fase reprodutiva sexuada; os gametócitos diferenciam-se em macro e microgâmetas, os quais originam zigotos por fusão. Posteriormente, estes zigotos invadem as células epiteliais intestinais da carraça e desenvolvem-se os oocinetes. Estes invadem os tecidos da carraça (p.e.: fibras musculares, hemócitos e túbulos de Malpighi) e os ovários. Os ovos são infetados e, subsequentemente, as larvas. Aqui, os oocinetes multiplicam-se assexuadamente e invadem as glândulas salivares, onde ocorre a esporogonia (Onyiche *et al.*, 2020). Os trofozoítos de formato arredondado ou oval desenvolvem-se no interior dos eritrócitos do hospedeiro vertebrado e originam merozoítos descritos com formato de “pêra”, medindo cerca de 2–5µm de comprimento (Rothschild, 2013).

b Theileria equi

O hemoparasita *Theileria equi* compartilha as características anteriormente descritas para *Babesia caballi*, apresentando a mesma classificação taxonómica, mas diferenciando-se a partir da família (Theileriidae) (Schnittger *et al.*, 2012).

Tal como o protozoário anterior, este hemoparasita apresenta tropismo eritrocitário; no entanto, diferencia-se por possuir capacidade de replicação intraleucocitária na fase inicial da infeção do hospedeiro vertebrado (Scoles & Ueti, 2015). Após a picada do hospedeiro invertebrado infetado, os esporozoítos inoculados migram para o sistema linfóide do equídeo, onde, ao invadirem os leucócitos, passam por um processo de esquizogonia, originando esquizontes. Todos os esquizontes iniciam o seu desenvolvimento sob a forma de macroesquizontes, que representam estágios jovens e em crescimento; à medida que amadurecem, diferenciam-se em microesquizontes, estruturas mais compactas e maduras

responsáveis pela formação dos merozoítos (Almazán *et al.*, 2022). Cada esquizonte dá origem a múltiplos merozoítos que, ao entrarem em circulação invadindo os eritrócitos, iniciam processos de reprodução assexuada como os descritos na espécie anterior (Figura 2) (Ueti *et al.*, 2008).

Os merozoítos encontrados no interior dos eritrócitos têm tendencialmente dimensões menores que os da espécie anterior, de cerca de 2–3µm; no entanto, apresentam o mesmo tipo de formato (Rothschild, 2013).

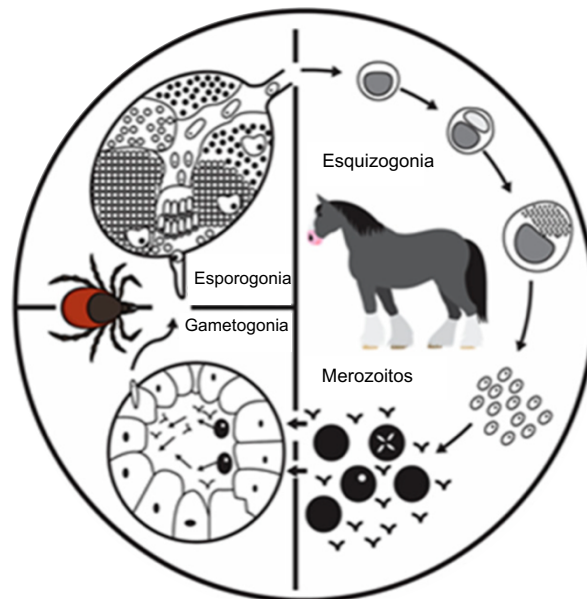


Figura 2- Ilustração do ciclo de vida de *Theileria equi*. Adaptado de Onyiche *et al.*, 2020.

c Vetores

A transmissão da PE ocorre essencialmente através da picada de vetor, neste caso, carrças (Scoles & Ueti, 2015). Estão descritas mais de três dezenas de espécies com capacidade de transmissão de PE, todas elas pertencentes ao reino Animalia, filo Arthropoda, classe Arachnida, ordem Ixodida, distribuídas principalmente entre duas famílias, Ixodidae (carrças de cutícula dorsal dura) e Argasidae (carrças de cutícula dorsal mole) (Taylor *et al.*, 2016). As espécies envolvidas na transmissão de *Babesia caballi* e *Theileria equi* pertencem quase exclusivamente à família Ixodidae, caracterizadas por uma cutícula dorsal endurecida (escudo), comportamento hematófago prolongado e elevada especificidade ecológica e etológica (Santos-Silva *et al.*, 2011).

Entre os géneros mais importantes no contexto da PE, destacam-se *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Hyalomma*, *Amblyomma* e *Haemaphysalis* (Taylor *et al.*, 2016).

Em Portugal, a fauna de carraças inclui várias espécies com capacidade vetora, nomeadamente *Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*, *Hyalomma marginatum* e, em menor frequência, *Dermacentor marginatus*. Estas espécies estão bem adaptadas às condições climáticas mediterrânicas, com verões quentes e secos e invernos suaves, o que favorece o seu ciclo de vida e a sua abundância sazonal (Santos-Silva *et al.*, 2011).

Nesta doença, as carraças atuam como vetores biológicos obrigatórios, por nelas ocorrer a fase sexuada do ciclo de vida dos protozoários (Scoles & Ueti, 2015). A competência vetorial das carraças é influenciada por múltiplos fatores, incluindo a temperatura ambiente, a humidade, a densidade populacional de hospedeiros vertebrados e o tipo de habitat (Probst *et al.*, 2023). Além disso, a duração do período de alimentação está intrinsecamente relacionada à capacidade de inoculação, bem como a quantidade de esporozoítos inoculados por picada (Wise *et al.*, 2013). Esta dinâmica torna o controlo das populações de carraças um desafio, especialmente em regiões onde os hospedeiros e o clima favorecem a manutenção do seu ciclo de vida (Wise *et al.*, 2013).

2. Transmissão

Apesar de, tal como descrito anteriormente, os parasitas causadores de PE dependerem de dois hospedeiros para realizar o seu ciclo de vida, e, portanto, a transmissão vetorial ter maior relevância, é importante mencionar outras formas de transmissão, bem como formas de transmissão nos vetores invertebrados que fazem com que a infeção se perpetue. Assim sendo, para além da transmissão carraça-equino por vetor, é ainda possível descrever a transmissão transplacentária em hospedeiros vertebrados, formas de transmissão no hospedeiro invertebrado, a transmissão transestadial e a transmissão transovariana (Hermans *et al.*, 2025). De igual modo, é importante ressaltar que a deficiente prática de desinfeção e assepsia do material, quer por parte dos proprietários, quer pelos médicos veterinários nas atividades clínicas, tem grande relevância na transmissão iatrogénica, possibilitando a infeção de animais indemnes (Adaszek *et al.*, 2011).

a Carraça- equídeo

A transmissão da PE está maioritariamente dependente da picada de carraças infetadas, sendo este o principal mecanismo de disseminação da doença (Scoles & Ueti, 2015). As carraças infetam-se ao ingerirem o parasita durante a hematofagia num hospedeiro infetado. Após a ingestão de eritrócitos contendo piroplasmas, e depois de passarem por fenómenos reprodutivos no interior do sistema digestivo do vetor, os protozoários atingem as glândulas salivares do artrópode (Ueti *et al.*, 2008). Desta forma, nas posteriores picadas para

alimentação, a carraça irá inocular as formas infetantes nos equinos, perpetuando assim o ciclo de vida do hemoparasita (Scoles & Ueti, 2015).

O sucesso deste tipo de transmissão está sempre dependente de fatores como a densidade parasitária, quer no ambiente, quer no hospedeiro vertebrado, e da duração do período de alimentação (Probst *et al.*, 2023). Ou seja, quanto mais longo o período de inoculação, maior a eficácia de transmissão das formas parasitárias contidas nas glândulas salivares do vetor (Wise *et al.*, 2013).

Por fim, é importante referir que a capacidade de inoculação parasitária permanece a mesma ao longo de todas as picadas que o vetor possa efetuar, o que lhe confere a capacidade de infeção de múltiplos hospedeiros vertebrados com a mesma efetividade (Scoles & Ueti, 2015).

b Transplacentária

A transmissão transplacentária trata-se de um processo no qual ocorre a passagem do parasita da fêmea gestante para o feto, um mecanismo que, consoante a quantidade de parasitas e a sensibilidade do feto, pode conduzir a aborto, natimortalidade ou nascimento de crias infetadas (Wise *et al.*, 2013). Um estudo verificou a já descrita transmissão transplacentária para a espécie *Theileria equi* (Allsopp *et al.*, 2007), mencionando, igualmente, a eventual possibilidade da transmissão de *B. caballi* por via transplacentária; porém, a reduzida prevalência e os baixos níveis de parasitemia que a espécie tipicamente causa podem influenciar na deteção deste parasita nas amostras de sangue dos poldros neonatos (De Waal & Van Heerden, 2004).

Ao contrário da espécie anterior, *T. equi* apresenta uma capacidade de infeção por longos períodos e uma maior prevalência em populações saudáveis, o que podem ser fatores que contribuem para a já verificada capacidade de transmissão transplacentária (Hermans *et al.*, 2025).

Desta forma, esta via de transmissão tem implicações importantes no maneiio reprodutivo dos animais, devido à possível gravidade dos quadros clínicos em caso de infeção congénita, devido à imaturidade do sistema imunitário dos recém-nascidos (Wise *et al.*, 2013).

c Transestadial e transovarica

A perpetuação dos agentes causadores de piroplasmose não depende exclusivamente da relação carraça-equídeo (Scoles & Ueti, 2015). Desde o momento em que uma carraça se infeta com um dos agentes causadores da doença, a perpetuação da infeção

está assegurada quer pela transmissão transestadial (em ambos os protozoários), quer pela transmissão transovárica (apenas na espécie *B. caballii*) (Ueti *et al.*, 2008). Estas características tornam o controlo parasitário mais difícil, resultando numa epidemiologia da doença mais complexa (Probst *et al.*, 2023).

A transmissão transovárica ocorre quando o parasita invade os tecidos da carraça, nomeadamente o tecido ovárico das fêmeas, adquirindo a capacidade de infetar a descendência (Wise *et al.*, 2013). Assim, os ovos produzidos por fêmeas infetadas já estão infetados com o parasita, e as larvas que eclodem destes ovos têm a capacidade de transmitir a doença a partir da sua primeira picada para alimentação. Este mecanismo é particularmente relevante para a manutenção do ciclo do parasita em regiões endémicas, por garantir a infeção de novas gerações de vetores sem necessidade de contacto prévio com hospedeiros infetados (Ghosh & Nagar, 2014).

d Transmissão iatrogénica

Para além das formas naturais de transmissão anteriormente referidas, é importante mencionar que, sendo o cavalo alvo de manejo e intervenção veterinária constantes, as possibilidades de infeção por via iatrogénica de esta e outras doenças aumentam exponencialmente (Adaszek *et al.*, 2011). Devem ser destacadas as cirurgias a campo com material mal esterilizado ou descartáveis reutilizados, internamento com transfusões de sangue e programas de reprodução assistida como os principais causadores de infeções por via iatrogénica com origem em atos médicos veterinários (Wise *et al.*, 2013).

A transmissão transfusional tem sido documentada em vários surtos de PE, tanto em animais hospitalizados como em equídeos dadores de sangue assintomáticos (Moretti *et al.*, 2010). O período de incubação após a infeção iatrogénica tende a ser reduzido, devido à introdução direta das formas parasitárias na corrente sanguínea do animal recetor ou dador (reutilização de materiais) (Ueti *et al.*, 2008). Além disso, a infeção iatrogénica pode resultar em quadros clínicos mais graves, especialmente em animais imunocomprometidos ou já debilitados, quer pela introdução direta na circulação, quer pela carga parasitária inoculada subitamente (Adaszek *et al.*, 2011).

A prevenção da transmissão iatrogénica exige a implementação de protocolos rigorosos de controlo, incluindo o rastreio sistemático de dadores de sangue para piroplasmose, a utilização de material descartável sempre que possível, e a desinfeção adequada de instrumentos reutilizáveis (Wise *et al.*, 2013).

3. Fisiopatologia

Na sequência da invasão eritrocitária, o ciclo reprodutivo intracelular dos piroplasmas conduz à lise progressiva dos eritrócitos, originando hemólise intravascular (Onyiche *et al.*, 2020). A destruição eritrocitária pode também ocorrer por mecanismos extravasculares, mediados por fagócitos ativados no baço e no fígado, mesmo na ausência de rutura celular direta (Adaszek *et al.*, 2011). O acréscimo dos níveis de hemoglobina livre no plasma, aumentam o risco de sobrecarga dos mecanismos de excreção, o que pode originar um quadro secundário de lesão renal aguda (Rothschild, 2013).

Como consequência destes processos hemolíticos, desencadeia-se uma resposta inflamatória sistémica complexa, mediada principalmente pela produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6). Estas moléculas amplificam a resposta do organismo, promovendo o recrutamento celular, a permeabilidade vascular e a ativação de mecanismos efetores (Scoles & Ueti, 2015).

Contudo, quando esta resposta é exagerada ou mantida por um elevado período, pode tornar-se prejudicial para o hospedeiro (Ueti *et al.*, 2008). A produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias contribui para disfunção endotelial, stress oxidativo e lesão tecidual, comprometendo a integridade funcional de vários órgãos. Esta disfunção multissistémica é particularmente marcada em infeções com elevada parasitemia ou em indivíduos imunocomprometidos, agravando a evolução clínica (Onyiche *et al.*, 2020).

Para além disso, em infeções causadas por *T. equi*, pode ocorrer adesão dos eritrócitos parasitados ao endotélio vascular. Esta interação leva à formação de microtrombos e consequente obstrução da microcirculação podendo culminar em isquemia tecidual localizada (Almazán *et al.*, 2022). Os tecidos com maior sensibilidade à hipóxia, tais como o sistema nervoso central e o parênquima pulmonar, poderão sofrer consequências mais severas nestas situações (Onyiche *et al.*, 2020).

Nos casos de infeção por *T. equi*, devido à permanência da infeção, ainda que em níveis baixos, o hospedeiro passa a viver com parasitemia subclínica persistente, sendo um portador crónico. Estes animais são uma fonte reservatória importante da infeção, ainda que a ausência de sinais clínicos seja devida a um equilíbrio entre a persistência do parasita e a resposta imunológica do hospedeiro (Wise *et al.*, 2013).

4. Sinais clínicos e formas de apresentação

A expressão clínica da PE apresenta uma ampla variabilidade individual, podendo ir desde formas subclínicas assintomáticas até quadros agudos com evolução fatal (Taylor *et al.*, 2016a). Esta diversidade resulta de uma interação multifatorial entre as características do agente etiológico, as particularidades fisiológicas do hospedeiro, como o contacto prévio e o estado imunitário do hospedeiro, e os fatores ambientais, nomeadamente a atividade vetorial e a endemicidade regional (Tirosh-Levy *et al.*, 2020).

Tendencialmente, a espécie *Theileria equi* gera quadros mais graves por ser mais patogénica; no entanto, também a carga parasitária é um fator determinante na gravidade do quadro (Santos-Silva *et al.*, 2011).

a Forma hiperaguda

A forma hiperaguda da PE é menos frequente, mas extremamente grave (Adaszek *et al.*, 2011). Ocorre tipicamente em cavalos completamente *naïf*, sujeitos a elevada carga parasitária num curto espaço de tempo, como pode acontecer em contextos de introdução em zonas endémicas com elevada densidade vetorial (Scoles & Ueti, 2015).

A progressão clínica é fulminante, iniciando-se com febre muito alta, seguida rapidamente de colapso circulatório, distúrbios neurológicos e morte súbita, frequentemente em menos de 48 horas (Adaszek *et al.*, 2011). Na maioria dos casos, a morte antecede qualquer tentativa de diagnóstico ou tratamento, o que torna esta forma particularmente preocupante em termos de saúde pública veterinária, sobretudo em situações de movimentação internacional de equídeos sem controlo sanitário adequado (Almazán *et al.*, 2022).

b Forma aguda

A forma aguda da PE manifesta-se normalmente poucos dias após a inoculação do parasita, sendo característica de animais sem imunidade prévia e frequentemente associada a infeções primárias em zonas não endémicas (Scoles & Ueti, 2015).

Os sinais clínicos surgem de forma súbita e acentuada, com febre elevada, frequentemente superior a 39,5°C, acompanhada de taquicardia e taquipneia, síndrome de resposta inflamatória sistémica e tentativa de compensação metabólica perante a diminuição da capacidade de transporte de oxigénio (Wise *et al.*, 2013).

Um dos principais fenómenos nesta fase é a anemia hemolítica, resultante da destruição dos eritrócitos parasitados, que se reflete clinicamente por mucosas pálidas ou

ictéricas e da fração de bilirrubina não conjugada no sangue periférico (Onyiche *et al.*, 2020). É frequente a presença de urina de coloração escura, devido à hemoglobinúria, associada à lise intensa de eritrócitos e à liberação de hemoglobina livre para o plasma (Scoles & Ueti, 2015).

Outros sinais clínicos que os animais infetados podem apresentar são anorexia, apatia, intolerância ao exercício e perda de peso, alterações estas que se intensificam rapidamente na ausência de tratamento adequado (Wise *et al.*, 2013). Em casos mais graves, podem observar-se edemas submandibulares, linfadenomegália, cólica e, em casos severos, falência hepática ou renal, originando um quadro de colapso multiorgânico que pode culminar em morte (WOAH, 2021).

c Forma subaguda

A forma subaguda da PE ocorre predominantemente em animais residentes em zonas endêmicas, cuja exposição precoce ao agente patogénico resulta numa resposta imunitária geralmente eficaz (Tirosh-Levy *et al.*, 2020). Nestes casos, os animais infetados não demonstram sinais clínicos evidentes (Wise *et al.*, 2013).

Apesar da ausência de sinais clínicos, os parasitas mantêm-se em circulação a baixas concentrações, estabelecendo um estado de portador (Onyiche *et al.*, 2020). Este estado tem particular relevância epidemiológica, pois os equinos afetados tornam-se fontes silenciosas de infeção para os vetores, perpetuando o ciclo de transmissão dentro das populações equinas (Scoles & Ueti, 2015). O diagnóstico nesta fase depende exclusivamente de métodos laboratoriais sensíveis, uma vez que a avaliação clínica isolada é insuficiente para a deteção (WOAH, 2021).

d Forma crónica

A forma crónica da PE caracteriza-se por uma evolução mais lenta e sinais clínicos de menor intensidade, mas persistentes, interferindo significativamente com o bem-estar e desempenho dos animais (Tirosh-Levy *et al.*, 2020).

Os cavalos afetados apresentam frequentemente episódios intermitentes de febre, acompanhados de anemia de grau ligeiro a moderado, perda de condição corporal e diminuição progressiva do desempenho físico, o que se torna particularmente evidente em equinos de competição ou trabalho (Santos-Silva *et al.*, 2011).

À semelhança da forma subclínica, os animais com infeção crónica mantêm o parasita em circulação por longos períodos, podendo ser portadores durante meses ou mesmo anos,

dependendo do agente envolvido, sendo a persistência de *Theileria equi* geralmente superior à de *Babesia caballi* (Moretti *et al.*, 2010). Estes portadores crónicos são particularmente problemáticos do ponto de vista sanitário, pois além do risco de transmissão, podem reagudizar a doença perante situações de imunossupressão (Zanet *et al.*, 2017).

5. Lesões *post mortem*

Em casos de piroplasmose cujo diagnóstico, por alguma razão, não consegue ser realizado em tempo útil e ocorre a morte do animal, a necropsia constitui uma ferramenta essencial para a confirmação diagnóstica e exclusão de outras causas de morte súbita (Moretti *et al.*, 2010). Entre as alterações macroscópicas mais frequentemente descritas destaca-se a palidez generalizada das mucosas e dos músculos esqueléticos, resultante da anemia hemolítica, bem como a presença de icterícia difusa em tecidos subcutâneos e serosas, associada à acumulação de bilirrubina não conjugada decorrente da intensa hemólise (Schnittger *et al.*, 2012).

O baço encontra-se habitualmente aumentado, congestionado e de consistência friável, refletindo a hiperatividade do sistema mononuclear fagocitário responsável pela destruição de eritrócitos alterados e parasitados, sendo este um achado típico em equídeos com evolução rápida da doença (Wise *et al.*, 2013). O fígado apresenta frequentemente congestão difusa e coloração amarelada, podendo observar-se também necrose focal associadas à hipoxia tecidual (Onyiche *et al.*, 2020). Já os rins podem evidenciar congestão acentuada e pigmentação escura da medula, alterações compatíveis com nefropatia associada à hemoglobínúria, achado comum em casos de infeção aguda por *T. equi* (Scoles & Ueti, 2015).

Nos pulmões, são comuns os quadros de congestão e edema, que traduzem alterações vasculares sistémicas e a instalação de hipoxia (Almazán *et al.*, 2022). Em situações mais graves podem ainda ser observadas lesões hemorrágicas ou fenómenos tromboembólicos, agravando o quadro respiratório (Moretti *et al.*, 2010).

Embora a forma neurológica da doença seja rara em equídeos, em casos extremos podem surgir sinais de encefalopatia associados à hipoxia ou à presença de microtromboses, sem ocorrerem, no entanto, as manifestações hemorrágicas cerebrais típicas descritas noutras espécies, como os bovinos (Taylor *et al.*, 2016).

6. Diagnóstico

O diagnóstico da PE constitui uma etapa essencial na gestão clínica e sanitária da doença, sobretudo em regiões endémicas como Portugal, onde a elevada prevalência de portadores subclínicos dificulta a deteção eficaz de casos ativos (Barradas *et al.*, 2024).

Uma abordagem diagnóstica rigorosa é indispensável, não apenas para a definição da terapêutica adequada, mas também para o controlo epidemiológico, em particular em situações de movimentação internacional de equídeos (Adaszek *et al.*, 2011).

Embora o diagnóstico clínico seja possível, principalmente em casos agudos, a maioria dos sinais observados podem ser inespecíficos e, por isso, comuns a outras doenças infecciosas ou metabólicas, o que pode conduzir a um diagnóstico errado e consequente tratamento inadequado (Almazán *et al.*, 2022); além disso, em casos subclínicos ou crónicos, o diagnóstico por sinais clínicos não é possível, tornando-se necessária a aplicação de testes laboratoriais para alcançar um diagnóstico correto (Moretti *et al.*, 2010).

Os métodos atualmente disponíveis agrupam-se em duas grandes categorias: métodos diretos, que visam a deteção do parasita ou do seu genoma, e métodos indiretos, que identificam a resposta imunitária do hospedeiro ao contacto com o parasita (Adaszek *et al.*, 2011). Cada abordagem apresenta vantagens e limitações próprias, sendo a combinação de técnicas a estratégia mais robusta para garantir resultados fiáveis (Schnittger *et al.*, 2012). Apesar de menos frequentes, as infeções mistas por *T. equi* e *B. caballii*, podem ocorrer e acarretam um desafio diagnóstico acrescido (Schnittger *et al.*, 2012).

a Métodos diretos

Os métodos diretos permitem confirmar a presença do parasita no hospedeiro, através de observação microscópica ou da deteção de material genético. São particularmente eficazes em fases agudas, quando a parasitemia é elevada, mas perdem sensibilidade em infeções crónicas ou subclínicas (Scoles & Ueti, 2015).

i) Esfregaço sanguíneo com coloração de Giemsa

É uma técnica simples, rápida e económica, que possibilita a visualização direta dos eritrócitos parasitados (Figura 3) sendo útil em casos agudos com parasitemias elevadas (Taylor *et al.*, 2016). Apesar de útil na identificação da infeção, é muito difícil e pouco fiável a identificação da espécie através deste método, sendo sempre necessária a conjugação de outros métodos laboratoriais como os descritos em seguida para identificação da espécie infetante (OIE, 2018). A infeção dos leucócitos que ocorre em bovinos pelas espécies do género *Theileria* como *Theileria annulata* e *Theileria parva*, caracteriza-se por ser facilmente detetável devido a características como a duração da fase intraleucocitária longa; no caso da espécie *Theileria equi*, que afeta equídeos, a infeção dos leucócitos ocorre durante um curto período, anterior à invasão eritrocitária e não está associada à manifestação de sinais clínicos. Assim sendo, a identificação de leucócitos parasitados é muito difícil e os casos em que está descrita são muito limitados (Ramsay *et al.*, 2013).

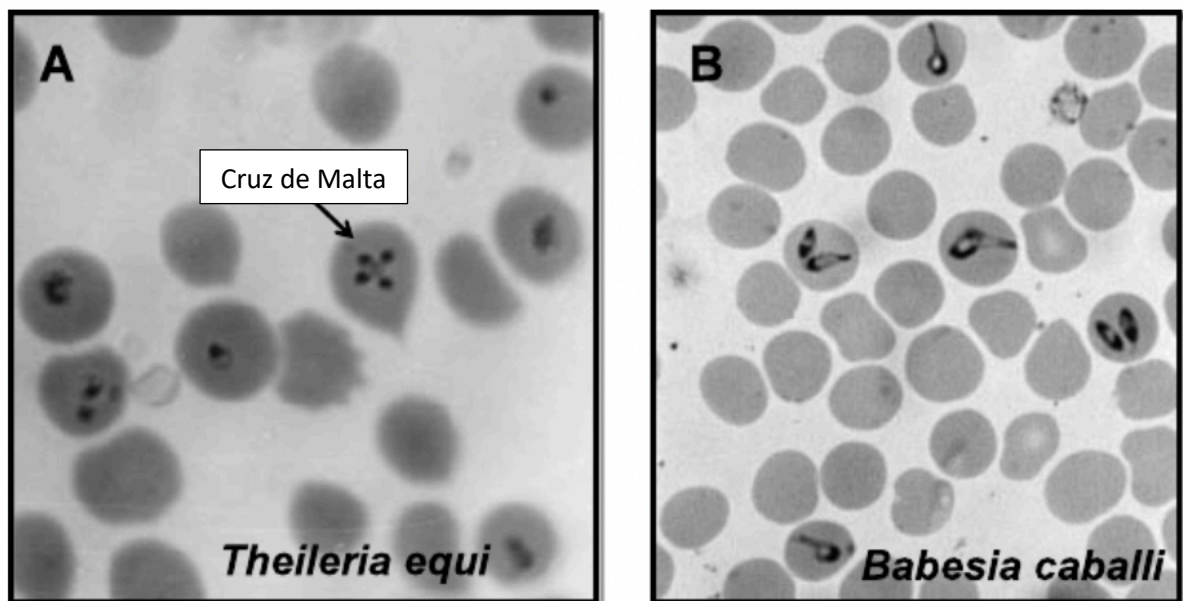


Figura 3- Eritrócitos parasitados por *Theileria equi* (A) e *Babesia caballi* (B). Adaptado de Onyiche *et al.*, 2020

ii) Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O desenvolvimento da técnica de PCR revolucionou o diagnóstico da PE, permitindo a deteção sensível e específica do DNA parasitário mesmo em baixas quantidades. *Primers* universais, como os que permitem a amplificação do gene *18S rRNA*, possibilitam o rastreio inicial, enquanto *primers* direcionados a genes específicos, como *EMA-1* (para *T. equi*) ou *RAP-1* (para *B. caballi*), asseguram a identificação precisa da espécie (Tirosh-Levy *et al.*, 2020). A reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) fornece dados quantitativos

da infecção parasitária, sendo valiosa para monitorização clínica e resposta terapêutica, enquanto a *PCR multiplex* permite a identificação simultânea de múltiplos agentes, tornando-se útil em contextos epidemiológicos de elevada complexidade (Onyiche *et al.*, 2020).

A sequenciação do produto de PCR amplificado pode ainda auxiliar na diferenciação filogenética entre as espécies infetantes (Tirosh-Levy *et al.*, 2020).

b Métodos indiretos

Os métodos indiretos baseiam-se na deteção de anticorpos específicos contra *T. equi* ou *B. caballi* (Scoles & Ueti, 2015). São fundamentais na identificação de animais previamente expostos, mesmo na ausência de parasitemia, desempenhando papel crucial na vigilância epidemiológica e nos processos de certificação sanitária para comércio internacional. Contudo, não permitem distinguir entre infeções ativas, crónicas ou resolvidas, o que limita a sua utilidade clínica em casos agudos ou de sintomatologia suspeita (WOAH, 2021).

i) Imunofluorescência indireta (IFA)

É um dos métodos de referência, usado amplamente em diversos pontos do globo. Baseia-se na ligação de anticorpos a antigénios fixados em lâminas, com leitura num microscópio de fluorescência (Wise *et al.*, 2013).

ii) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Apresenta maior objetividade e sensibilidade em comparação com a IFA. É adequado para rastreios em larga escala e integra programas oficiais de vigilância. Contudo, tal como a IFA, não diferencia infeções recentes de anteriores, exigindo complementação com PCR para confirmação em animais positivos (Tirosh-Levy *et al.*, 2020).

7. Tratamento

O tratamento da PE assenta em dois pilares fundamentais: a terapêutica específica contra o parasita e o tratamento de suporte, adaptado à gravidade e aos sinais clínicos apresentados pelo animal (Moretti *et al.*, 2010). Enquanto a primeira tem como objetivo reduzir ou eliminar a carga parasitária, o tratamento de suporte visa essencialmente minimizar os efeitos negativos causados pela parasitose ativa, tais como a hemólise e resposta inflamatória sistémica, prevenindo complicações potencialmente fatais (Almazán *et al.*, 2022). Esta vertente do tratamento procura restabelecer o equilíbrio hemodinâmico, corrigir a anemia e limitar a progressão das lesões tecidulares que resultam da hipoxia e do stress oxidativo. Para além disso, tem como finalidade atenuar a dor e o desconforto associados à doença, promovendo melhores condições de recuperação clínica e funcional do animal (Adaszek *et*

al., 2011). Em casos graves, o suporte clínico pode ser determinante para evitar falência multiorgânica, atuando como medida de estabilização até que a terapêutica específica inicie a sua ação (Scoles & Ueti, 2015).

Atualmente, o fármaco de eleição para o tratamento da PE é o dipropionato de imidocarb, administrado por via intramuscular ou subcutânea. A posologia mais utilizada é de 2–4 mg/kg, podendo ser repetida após 24 a 72 horas, consoante o protocolo instaurado (Almazán *et al.*, 2022). No caso de *Babesia caballi*, este tratamento é geralmente eficaz, permitindo a eliminação completa do parasita (Moretti *et al.*, 2010). Já em infeções por *Theileria equi*, a resposta é menos satisfatória: a administração de duas doses de 2–3 mg/kg normalmente promove a recuperação clínica, mas não assegura a eliminação parasitária (Almazán *et al.*, 2022). Protocolos mais intensivos, como quatro administrações de 4 mg/kg em intervalos de 72 horas, podem aumentar a probabilidade de eliminação completa do parasita, mas estão associados a elevada incidência de efeitos colaterais adversos, o que reforça a necessidade de tratamento de suporte em simultâneo (Adaszek *et al.*, 2011).

Os efeitos colaterais mais comuns do dipropionato de imidocarb resultam da sua atividade colinérgica e incluem cólicas, hipersalivação e diarreia (Moretti *et al.*, 2010). Por este motivo, recomenda-se a administração concomitante de butilescopolamina pelo seu efeito anticolinérgico. Caso o quadro clínico inclua febre, recomenda-se a administração de flunixin meglumina antes da injeção de dipropionato de imidocarb (Mendonza *et al.*, 2024).

Nos casos graves, caracterizados por anemia marcada ou sinais sistémicos severos, o tratamento de suporte desempenha um papel fundamental (Adaszek *et al.*, 2011). Terapêuticas frequentemente instauradas incluem fluidoterapia e transfusões sanguíneas, quando o hematócrito é inferior a 15% (Almazán *et al.*, 2022). Em certos, pode justificar-se a administração de oxitetraciclina, principalmente em infeções por *T. equi*, por se verificar mais eficaz na diminuição parasitária nesta espécie, e em situações que se pretenda diminuir a dose de dipropionato de imidocarb para evitar os seus efeitos colaterais marcados (Mendonza *et al.*, 2024). A suplementação nutricional e vitamínica constitui ainda um contributo relevante para a recuperação clínica (Adaszek *et al.*, 2011).

A eliminação completa de *T. equi* após tratamento é frequentemente difícil, conduzindo ao estabelecimento de portadores crónicos que permanecem uma ameaça epidemiológica (Almazán *et al.*, 2022). Este facto representa um desafio sanitário, sobretudo no contexto do comércio e transporte internacional de equídeos, exigindo a realização de testes moleculares, como PCR, mesmo após terapêutica com dipropionato de imidocarb, para confirmar a ausência do parasita (Moretti *et al.*, 2010).

8. Epidemiologia da Piroplasmose Equina em Portugal e no mundo

A PE apresenta uma distribuição global e com grande impacto sanitário e económico no mundo equestre (Tirosch-Levy *et al.*, 2020).

A prevalência da doença está fortemente associada à existência de carraças no ambiente, sendo, por isso, mais prevalente em regiões tropicais e subtropicais, onde as condições climáticas, como temperaturas elevadas e elevada humidade, favorecem o desenvolvimento e a atividade destes artrópodes hematófagos (Scoles & Ueti, 2015). Adicionalmente, a movimentação internacional de equídeos, em particular para fins desportivos, comerciais ou reprodutivos, representa um risco significativo para a introdução do agente em áreas anteriormente livres da infeção (Wise *et al.*, 2013).

Globalmente, *Theileria equi* apresenta uma distribuição mais ampla do que *Babesia caballi*, sendo detetada com maior frequência em estudos de prevalência. Uma das razões subjacentes a esta diferença reside na maior persistência da infeção pelo parasita no hospedeiro: enquanto *B. caballi* tende a ser eliminada espontaneamente ao fim de alguns meses, *T. equi* pode permanecer durante anos, mesmo em equinos aparentemente saudáveis, os quais atuam como reservatórios silenciosos da infeção (Onyiche *et al.*, 2020). Esta capacidade de persistência favorece a manutenção da transmissão em zonas endémicas e representa um desafio adicional nos processos de certificação sanitária e controlo em programas de exportação de equídeos (Almazán *et al.*, 2022).

A PE é endémica em diversas regiões do mundo, incluindo grande parte da América Latina, África, Médio Oriente, sul da Europa e Ásia. Nestes territórios, observa-se frequentemente o fenómeno de estabilidade endémica, que ocorre quando os poldros são expostos precocemente aos agentes etiológicos e desenvolvem imunidade, o que contribui para a redução da incidência de quadros clínicos graves (Taylor *et al.*, 2016). Ainda assim, surtos podem ocorrer em animais deslocados de áreas livres ou durante períodos de elevada densidade vetorial (Santos-Silva *et al.*, 2011).

Em Portugal, a PE é considerada uma doença endémica, estando documentada a presença tanto de *B. caballi* como de *T. equi*, frequentemente em equídeos subclínicamente infetados (Cabete *et al.*, 2025).

Estudos serológicos conduzidos em diferentes regiões do país reportam taxas elevadas de seroprevalência, sobretudo em animais mantidos em regime extensivo, com contacto frequente com vetores e sem a adoção de medidas profiláticas eficazes (Zanet *et al.*, 2017). A deteção recorrente de portadores crónicos em território português evidencia a necessidade de uma vigilância epidemiológica contínua e da implementação de estratégias

integradas para o controlo das carraças. Estas medidas são essenciais para mitigar o risco de novos surtos e preservar o estatuto sanitário dos efetivos equídeos (Cabete *et al.*, 2025).

Por fim, importa salientar que a PE é uma doença de declaração obrigatória, segundo a *World Organisation for Animal Health*, atendendo à sua importância para o comércio internacional e ao facto de os tratamentos disponíveis não garantirem a eliminação completa dos parasitas, permitindo a manutenção de portadores assintomáticos (WOAH, 2021).

As alterações climáticas cada vez mais propiciam ao desenvolvimento dos vetores em zonas tipicamente frias. Exemplo disto foi um estudo desenvolvido na Polónia, país onde a piroplasmose raramente era descrita, em que foi possível identificar piroplasmas isolados de animais com doença clínica (Adaszek *et al.*, 2011).

Segundo Tirosh-Levy *et al.*, (2020), estima-se que 90% da população global de equídeos habite em zonas consideradas endémicas; no entanto, todas elas apresentam condições ambientais que afetam diretamente a prevalência e patogenicidade da doença em cada região.

9. Profilaxia

A prevenção da PE constitui um eixo essencial no controlo da doença, particularmente em regiões endémicas como Portugal. Após a infeção por *Babesia caballi* desenvolve-se um período de imunidade com duração superior a um ano, embora, findo esse período, a proteção seja apenas parcial. Importa ainda salientar que não existe imunidade cruzada entre *B. caballi* e *Theileria equi*, o que aumenta a complexidade da profilaxia (Onyiche *et al.*, 2020; Otgonsuren *et al.*, 2024).

Dada a natureza multifatorial do ciclo biológico dos agentes e da ecologia das carraças, a profilaxia deve assentar numa estratégia integrada, combinando medidas ambientais, controlo de vetores, quimioprofilaxia, investigação vacinal, monitorização epidemiológica e boas práticas de manejo (Cabete *et al.*, 2025; Ghosh & Nagar, 2014).

O controlo de vetores é, sem dúvida, a medida mais eficaz na redução dos níveis de transmissão dos agentes causadores de piroplasmose. As formas de realizar este controlo incluem o uso tópico de *sprays* e champôs e a administração de antiparasitários sistémicos injetáveis, sem esquecer a importância da correta utilização e periodicidade para uma boa eficácia, sendo ainda aconselhada a alternância entre princípios ativos e mecanismos de ação, de forma a evitar e retardar o desenvolvimento de resistências.

Adicionalmente, o manejo ambiental contribui de forma significativa: a rotação dos animais entre pastagens associada à limpeza dos terrenos para eliminação de locais propícios à proliferação vetorial (Barradas *et al.*, 2024) e controlo da densidade de vegetação nos terrenos pastados para dificultar a transmissão dos vetores entre indivíduos (Zanet *et al.*, 2017).

A quimioprofilaxia é outra ferramenta relevante, sobretudo em situações de risco elevado ou deslocação de animais para zonas endémicas (Mullayarova *et al.*, 2024). O dipropionato de imidocarb tem sido utilizado com este objetivo, devido à sua ação prolongada, permitindo prevenir infeções clínicas. Contudo, a sua aplicação deve ser prudente, tendo em conta os riscos de toxicidade e de desenvolvimento de resistências (Peris *et al.*, 2025).

A vacinação surge como uma alternativa promissora. Algumas vacinas atenuadas com estirpes vivas foram implementadas em determinados países, conferindo imunidade e atenuando a gravidade da doença (Believe, 2024). No entanto, a sua utilização é limitada por fatores como requisitos rigorosos de armazenamento e risco de reativação da doença (Alexandre & Angeiras, 2024). A investigação atual concentra-se em vacinas recombinantes e de subunidades, com o objetivo de aumentar a segurança e a eficácia (Axt *et al.*, 2024).

Outra dimensão indispensável da profilaxia é a monitorização epidemiológica, através de testes serológicos e moleculares que permitam identificar animais portadores assintomáticos (Cabete *et al.*, 2025). A deteção precoce destes casos possibilita intervenções direcionadas e reduz a disseminação dos piroplasmas nos efetivos (Mullayarova *et al.*, 2024).

Por fim, a educação e capacitação de produtores e médicos veterinários desempenha um papel determinante (Alexandre & Angeiras, 2024). O conhecimento sobre o ciclo da doença, as medidas de controlo de vetores e a importância da vigilância ativa são fundamentais para o sucesso das estratégias preventivas (Axt *et al.*, 2024). Programas de controlo baseados em dados epidemiológicos locais permitem otimizar recursos e reduzir de forma significativa o impacto sanitário e económico da PE (Peris *et al.*, 2025).

II. Material e métodos

1. Tipo de estudo

A base da presente dissertação consiste num estudo observacional e transversal com o objetivo de determinar a prevalência molecular de piroplasmas em equídeos de Portugal Continental, bem como fatores predisponentes ou de risco epidemiológico.

Este estudo foi aprovado pelo Comité de Ética e Bem-Estar Animal (CEBEA) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona, com o número de parecer 30-2023.

2. Dimensão da Amostra

A dimensão amostral foi calculada através da utilização do sistema Epitools® (Ausvet), considerando uma estimativa de prevalência de 30% (Tirosh-Levy *et al.*, 2020), uma precisão de 5% e um intervalo de confiança de 95%, o que resultou na determinação de 339 equídeos como a amostra mínima recomendada.

3. Caracterização da amostra

O estudo contou com 339 equídeos, selecionados por amostragem por conveniência, oriundos de diferentes tipos de explorações, nomeadamente centros equestres, detenções caseiras e coudelarias. A inclusão dos cavalos esteve dependente do consentimento informado dos tutores.

As explorações testadas pertenciam às regiões NUTS II, Norte, Centro, Oeste e Vale do Tejo, Grande Lisboa, Península de Setúbal, Alentejo e Algarve. O número de cavalos submetidos a colheita em cada uma destas regiões foi determinado proporcionalmente ao número de cavalos registados no registo nacional de equinos (RNE), em cada uma destas regiões a 23 de dezembro de 2023, de forma à distribuição geográfica da amostragem ser o mais proporcional à distribuição real dos equídeos em Portugal.

Em conjunto com os proprietários no momento da colheita, foi realizado um questionário (Anexo 1) com o objetivo de recolher dados com importância epidemiológica, incluindo o sexo, idade, raça, tipo de pelagem, utilização do animal, estilo de vida, utilização de antiparasitários e respetivo princípio ativo, sinais clínicos relevantes e utilização de medicação no momento da colheita.

4. Colheita e conservação de amostras biológicas

As amostras de sangue utilizadas provieram de cavalos sujeitos a colheita para análises laboratoriais em contexto clínico, sendo o volume excedente utilizado no presente estudo.

O período de colheita de amostras biológicas decorreu entre dezembro de 2023 e maio de 2025. Foram utilizados cerca de 7ml de sangue periférico da veia jugular, sendo o volume total dividido entre dois tubos, EDTA e tubo seco. No primeiro foram colocados 3ml, volume indicado no tubo, e o restante sangue terá sido colocado no segundo tubo.

As amostras foram preservadas em caixas de conservação térmica com temperatura entre 2 e 8°C, e armazenadas em frigorífico a 4°C. Após a utilização do volume necessário, a restante amostra foi congelada a -20°C para eventual utilização futura.

5. Processamento da amostra em tubo seco

Uma vez em laboratório, os tubos secos terão sido levados à centrifuga a uma velocidade de 5000rpm durante 5min. Desta forma foi possível a extração do soro de cada amostra para *ependorfs* de 2ml de volume. Esta parte da amostra foi preservada a -20°C para posterior testagem de anticorpos contra diferentes agentes patogénicos e a restante descartada.

6. Processamento da amostra em tubo de EDTA

a Extração de DNA

Realizou-se a extração de DNA genómico a partir da amostra de sangue colhida para tubo de EDTA; para isso, foi utilizado o kit High Pure PCR Template Preparation Kit® (Roche Diagnostics GmbH, Alemanha), seguindo o protocolo indicado pelo fabricante.

Protocolo de extração de DNA ("High Pure PCR Template Preparation Kit®", Roche)

Procedimento:

1. Colocar 200µL de sangue num tubo de 1,5mL e adicionar 200µL de tampão de ligação e 40µL de proteinase K. Misturar rapidamente e incubar a 70°C, durante 10 minutos;
2. Adicionar 100µL de isopropanol e agitar. Pipetar o volume total da amostra para a coluna de extração que se encontra no tubo de recolha. Centrifugar a 8000rpm, durante 1 minuto;
3. Descartar o tubo de recolha e o líquido, e substituir por um novo. Adicionar 500µL de tampão de remoção de inibidores. Centrifugar a 8000rpm, durante 1 minuto;
4. Descartar o tubo de recolha e o líquido, e substituir por um novo. Adicionar 500µL de tampão de lavagem. Centrifugar a 8000rpm, durante 1 minuto;

5. Repetir o passo 4;
6. Descartar o tubo de recolha e o líquido, e substituir por um novo. Para remover quaisquer excessos de tampão de lavagem, centrifugar a 14000rpm, durante 10 segundos;
7. Descartar o tubo de recolha e o líquido, e combinar a coluna de extração com um tubo *eppendorf* de 1,5mL. Adicionar 70µL de tampão de eluição (previamente aquecido a 70°C). Centrifugar a 8000rpm, durante 1 minuto. O *eppendorf* contém agora o DNA eluído.

Por forma a garantir a integridade das amostras de DNA, o produto extraído foi conservado a uma temperatura de -20°C.

b Reação em cadeia de polimerase

Para amplificar material genético dos agentes patogénicos procurados, *Babesia caballi* e *Theileria equi*, foram utilizados *primers* específicos para o gene *18S rRNA*, minimizando o número de reações de PCR, economizando tempo e recursos. Os reagentes da reação de PCR foram calculados para um volume final de 25µL, tendo sido utilizados 12,5µL NZY *green master mix* (NZYTech, Portugal), 7,9µL de água ultra pura, 0,8µL de *primer forward* (5'-AATACCCAATCCTGACACAGGG-3'), 0,8µL de *primer reverse* (5'-TTAAATACGAATGCCCCAAC-3') e 3µL de amostra a testar. Os parâmetros do termociclador foram ajustados consoante os resultados obtidos até se conseguirem resultados fiáveis e boa definição na imagem da eletroforese. O protocolo utilizado terá sido o seguinte: desnaturação inicial a 94°C durante 3 minutos; 35 ciclos constituídos por desnaturação a 94°C durante 30 segundos, *annealing* a 64°C durante 30 segundos e extensão a 72 °C durante 30 segundos; realizou-se uma extensão final a 72°C durante 7 minutos; os produtos foram mantidos a 4°C até posterior utilização.

c Eletroforese em gel de agarose e visualização dos produtos de PCR

Os produtos de PCR obtidos terão sido submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% em TBE contendo um corante fluorescente intercalante, GelRed® (Biotium, EUA) para possibilitar a visualização do material genético no gel com recurso a luz UV. A migração das moléculas de DNA entre polos elétricos foi realizada sob uma voltagem de 120V durante um período de 60 minutos e foi utilizado o marcador de peso molecular, NZYDNA Ladder V (NZYTech, Portugal), de forma a se poder comparar o peso molecular das bandas das amostras com as bandas do marcador.

A observação do gel foi feita com recurso a um transiluminador com capacidade de digitalização e armazenamento das imagens geradas, Gel Doc™ (Bio-Rad, EUA).

d Sequenciação dos produtos de PCR

Uma vez determinadas as bandas de tamanho compatível com o resultado positivo, aproximadamente 400 pares de bases, foram sequenciadas 1 por cada 20 amostras positivas, novamente respeitando a distribuição NUTS II (áreas em que não foi possível respeitar esta proporção, foram testados 1 ou 2 animais consoante o número de animais positivos), e com critérios como a intensidade da banda e exploração de origem, ou seja, em regiões com mais que uma amostra para sequenciação, garantiu-se a proveniência das mesmas de explorações diferentes, de forma a aumentar a representatividade dos dados na região.

Os produtos de PCR positivos foram purificados, com recurso ao kit innuPREP PCRpure Kit (250 run) (Analytik Jena AG, Jena, Alemanha) e posteriormente sequenciados no laboratório da STAB VIDA.

Protocolo de purificação e concentração de produtos de PCR obtidos de reações de PCR de até 50µL:

1. Misturar 200µL de tampão de ligação com 20µL do produto da reacção de PCR num *ependorf* separado, homogeneizando cuidadosamente por pipetagem.
2. Transferir completamente a amostra misturada para o *spin filter* com tubo coletor.
3. Centrifugar durante 3 minutos a 11 000 × g. Para obter uma pureza máxima, recomenda-se descartar o filtrado após uma primeira centrifugação de 1 minuto a 11 000 × g, recolocar o *spin filter* num novo tubo coletor e centrifugar novamente durante 2 minutos a 11 000 × g. Em seguida, descartar o tubo coletor.
4. Colocar o *spin filter* dentro de um tubo de eluição (neste caso o tubo a ser enviado para sequenciação).
5. Pipetar 12µL de tampão de eluição diretamente sobre o centro da membrana do *Spin Filter*.
6. Incubar durante 1 minuto à temperatura ambiente.
7. Centrifugar durante 1 minuto a 11 000 × g.
8. O tubo de eluição conterá agora os fragmentos de PCR purificados

Foram ainda adicionados 5µL de *primer forward* utilizado na reacção de PCR ao conteúdo de cada tubo a enviar para sequenciação.

7. Análise filogenética

A edição dos cromatogramas foi realizada com recurso ao software 4Peaks (Nucleobytes, 2025).

As sequências obtidas foram comparadas com sequências de nucleótidos depositadas na base de dados *Nacional Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando o algoritmo *Basic Local Alignment Search Tool for nucleotids* (BLASTn).

8. Análise Estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada com recurso ao software IBM SPSS Statistics®, versão 28.

Primeiramente foi realizada uma estatística descritiva mencionando frequências e percentagens para variáveis categóricas e a média e o desvio padrão para variáveis contínuas.

Em seguida, procedeu-se à realização da análise inferencial com recurso ao teste de qui-quadrado de independência (χ^2), possibilitando a verificação de associação entre o resultado positivo do teste molecular e as variáveis categóricas.

Para a variável idade, tendo em conta o tamanho da amostra ($n=339$) e com base no teorema central do limite, não foi necessária a verificação de normalidade, tendo-se realizado diretamente o teste *t-student* para amostras independentes, comparando a média de idades dos dois grupos (positivos e negativos). O nível de significância estatística adotado foi de $p<0,05$.

III. Resultados

1. Estatística descritiva

a Região NUTS II

Após a distribuição da amostra ($n=339$) pelas regiões de Portugal Continental, foi determinada a testagem de 55 cavalos na região Norte, 30 na zona centro, 102 na região Oeste e Vale do Tejo, 54 na Grande Lisboa, 22 na Península de Setúbal, 72 no Alentejo e 4 no Algarve (Gráfico 3).

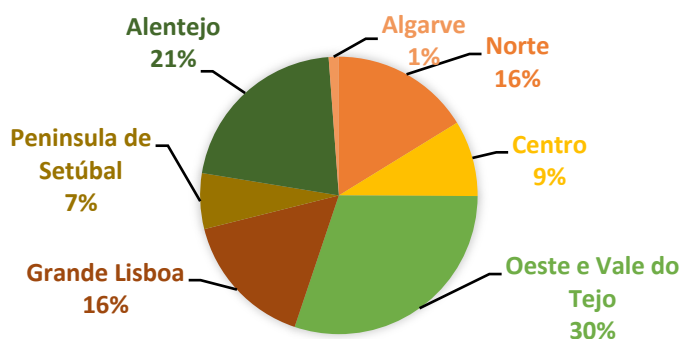


Gráfico 3- Distribuição da amostra por regiões NUTS II

A análise da prevalência, segundo as regiões NUTS II das quais os cavalos eram provenientes, revelou os seguintes resultados: prevalência nacional de 34,8% (118 animais positivos em 339) com a distribuição apresentada no Gráfico 4.

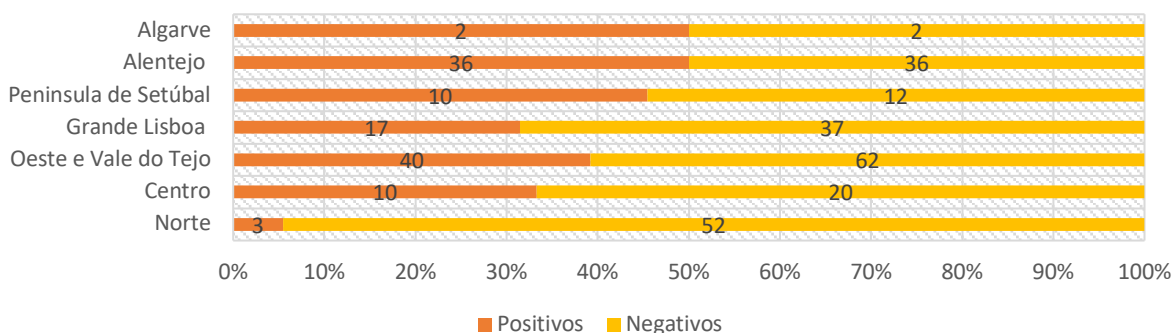


Gráfico 4- Prevalência por região NUTS II

Foi elaborado um mapa coroplético no QGIS (versão 3.44.4 – Solothurn) para representar a prevalência por NUTS II, utilizando classes definidas de acordo com padrões epidemiológicos observados nos dados. A camada vetorial das NUTS II foi obtida no Sistema

Nacional de Informação Geográfica (SNIG), disponível em <https://snig.dgterritorio.gov.pt/> (Anexo 4).

b Sexo

No que diz respeito ao sexo, foram testados 221 machos e 118 fêmeas, na proporção apresentada no Gráfico 5.

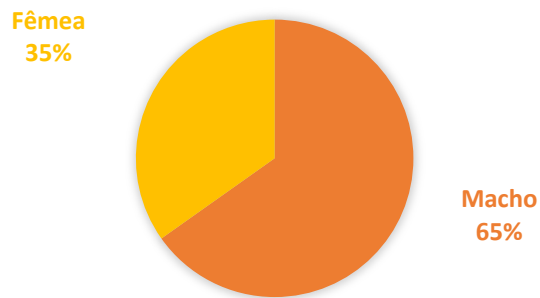


Gráfico 5- Distribuição da amostra por sexo

Nesta variável, a prevalência da infeção encontra-se representada no gráfico seguinte (Gráfico 6).

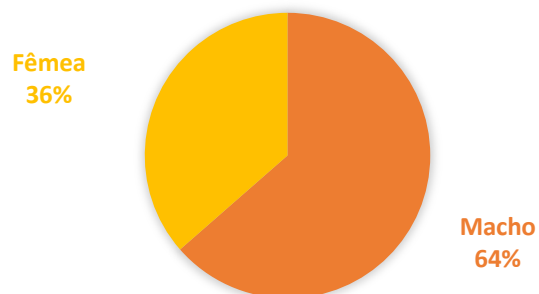


Gráfico 6- Prevalência por sexo

c Faixa etária

Em relação à idade dos animais, os equídeos integrantes no projeto tinham uma média de idades de 10 anos e 7 meses.

Para facilitar a análise estatística e interpretar de forma mais eficaz os resultados, os animais foram agrupados por faixa etária com a seguinte distribuição (Gráfico 7):

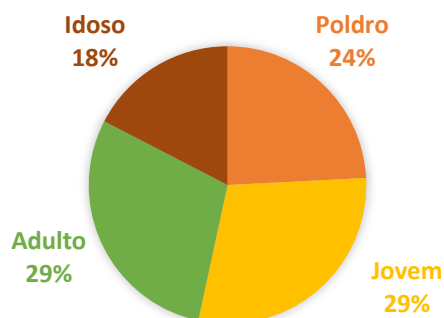


Gráfico 7- Distribuição da amostra por faixa etária

Foi possível verificar maior prevalência em poldros e jovens, seguidos de animais adultos, e por fim, uma prevalência inferior em animais idosos, na proporção apresentada no Gráfico 8.

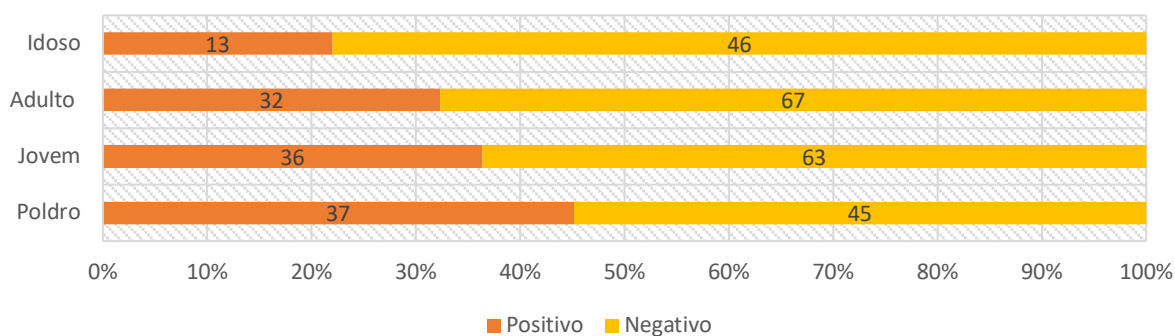


Gráfico 8- Prevalência por faixa etária

d Utilização/modalidade

Em relação à utilização dos animais, existiu uma grande variedade de modalidades praticadas e lazer, nomeadamente ensino, obstáculos, concurso completo de equitação, técnica de *randonné*e equestre de competição (TREC), equitação de trabalho, aulas de equitação, lazer, modalidades/utilizações residuais nesta amostragem, como atrelagem e

utilidades reprodutivas. Devido à idade precoce de alguns animais no momento da colheita, existiram alguns animais cuja modalidade a integrar ainda não estava definida (Gráfico 9).

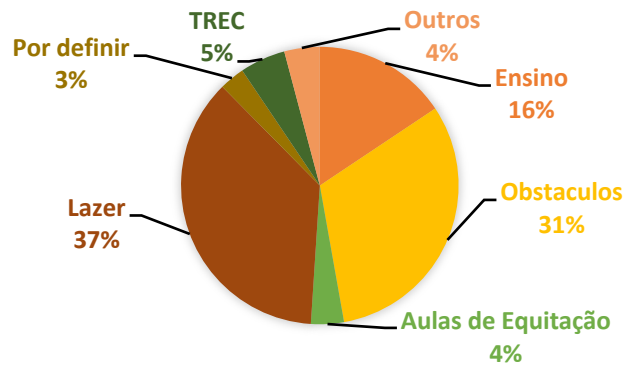


Gráfico 9- Distribuição da amostra por utilização/modalidade desportiva

Ao analisar a prevalência por utilização/modalidade, foi possível verificar a prevalência mais baixa em cavalos de saltos de obstáculos (13% - 17 animais positivos em 131), seguidos dos cavalos de ensino com 41,1% (23 animais positivos em 56) e, por fim, com a maior prevalência, os cavalos de lazer, com 52,9% (74 animais positivos em 140) (Gráfico 10).

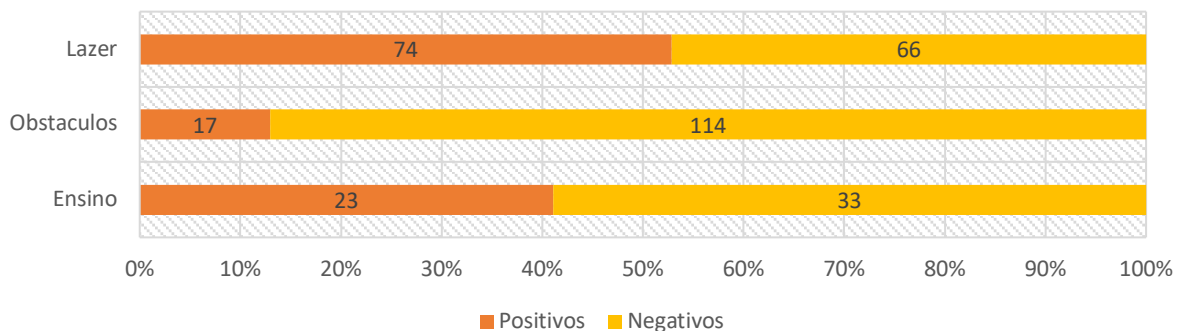


Gráfico 10- Prevalência por utilização/modalidade

e Tipo de pelagem

O tipo de pelagem dos animais testados, apresentou uma enorme variedade, tendo-se verificado maior frequência de cavalos de pelagem ruço e castanho, seguidos de cavalos de pelagem lazão. Por sua vez, as pelagens mais raras foram malhado e castanho pezenho (Gráfico 11).

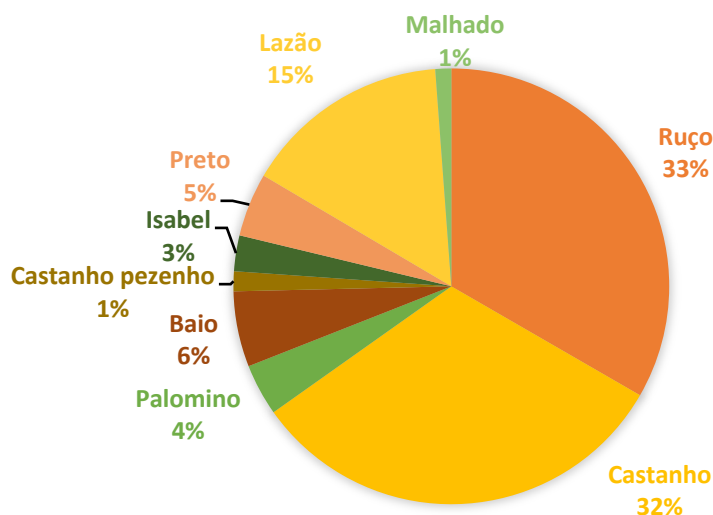


Gráfico 11- Distribuição da amostra por tipo de pelagem

Foi possível verificar maior prevalência em cavalos de pelagem castanho pezenho 80,0% (4 animais positivos em 5), seguidos da pelagem Isabel e preto, 55,6% (5 animais positivos em 9) e 50,0% (8 animais positivos em 16) respectivamente. Já a pelagem menos afetada foi o palomino com apenas 7,7% (1 animal positivo em 13) (Gráfico 12).

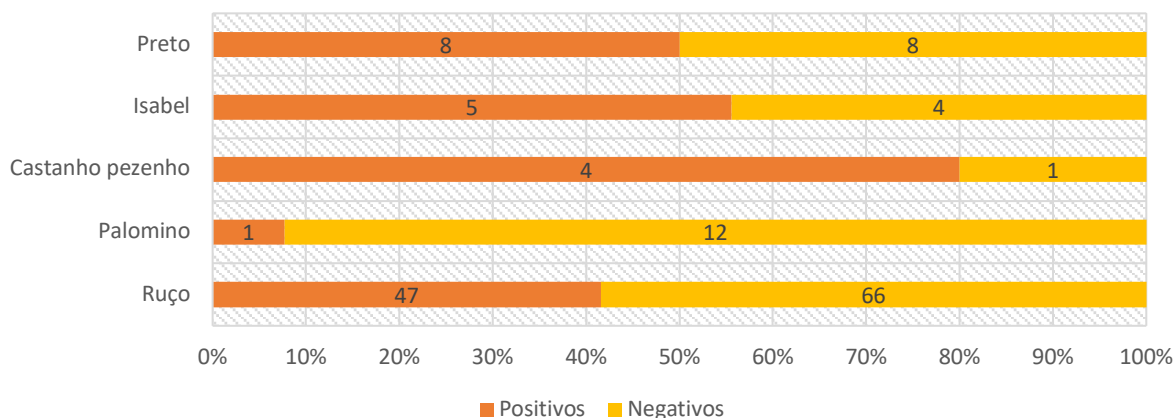


Gráfico 12- Prevalência por tipo de pelagem

f Raça

A raça também foi uma característica de elevada variabilidade, quer em raças puras, quer em cruzamentos de ascendência conhecida (cruzamento de duas raças puras). Por este motivo, e, para uma mais fácil representação e clareza na análise estatística, foram formados 5 grupos, nos quais se agruparam animais Puro Sangue Lusitano, Cruzados de Português, Cruzamentos de Árabe, que contemplavam Luso-Árabes, Anglo-Árabe e Puro-sangue-árabe, e raças nórdicas, tais como KWPN, Honoveriano, Belga, Puro-sangue-inglês; existiam também outras raças, mas em número reduzido, como Andaluz, Frísio, Sela Francês, Garrano do Gerês, que estão na figura seguinte representados em outros (Gráfico 13).

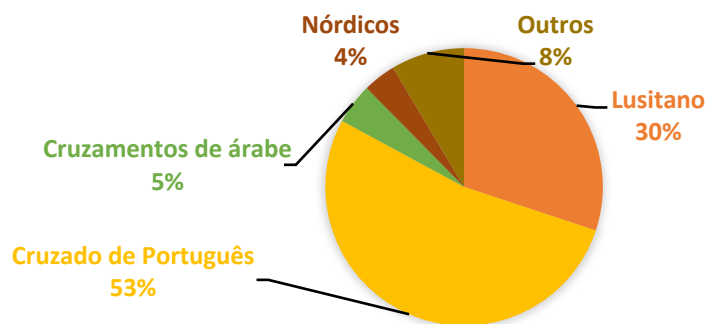


Gráfico 13- Distribuição da amostra por raça

Segundo esta variável, os cruzamentos de árabe foram os mais afetados, seguidos dos cavalos lusitanos, dos cruzados de português e por fim, com uma prevalência bastante inferior, os cavalos nórdicos. As prevalências correspondentes a cada grupo estão representadas no gráfico seguinte (Gráfico 14).

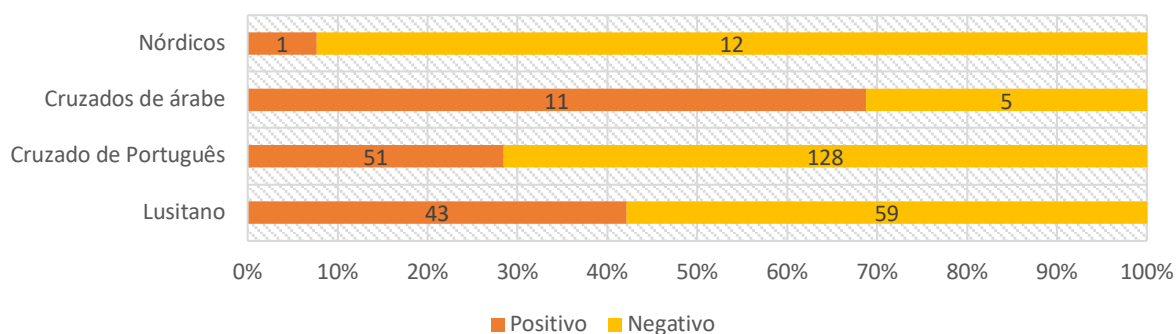


Gráfico 14- Prevalência por raça

g Estilo de vida

No que diz respeito ao estilo de vida, foram consideradas 3 possibilidades de estilo de vida, nos quais todos os cavalos do estudo se encaixaram - estabelecido, estabelecido com acesso ao paddock e a campo - tendo existido o predomínio de cavalos estabelecidos, principalmente pela facilidade logística dos proprietários em disponibilizar este tipo de animais (Gráfico 15).

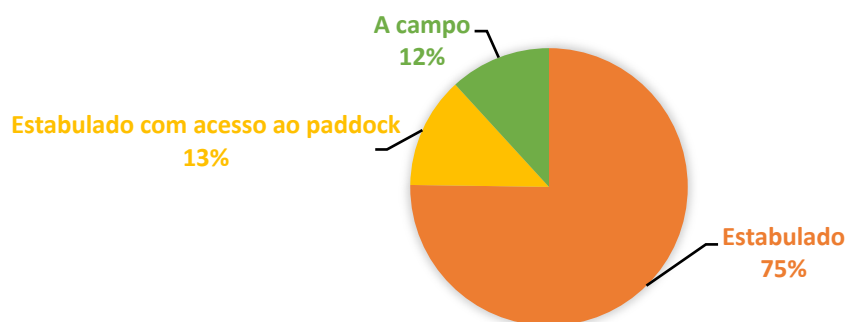


Gráfico 15- Distribuição da amostra por estilo de vida

A prevalência da parasitemia variou consoante o estilo de vida, estando a mesma representada no Gráfico 16.

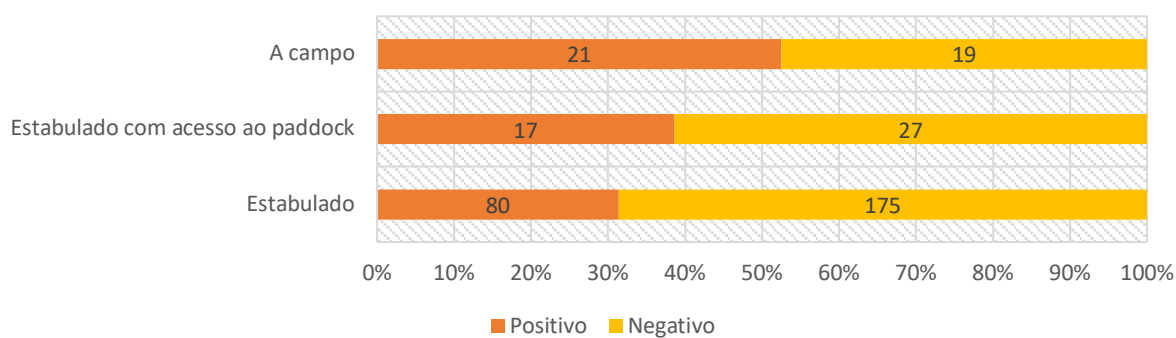


Gráfico 16- Prevalência por estilo de vida

h Utilização de antiparasitários

Quando inquiridos sobre a utilização ou não de antiparasitário (interno ou externo) foi possível verificar uma grande desproporção entre os dois grupos (Gráfico 17).

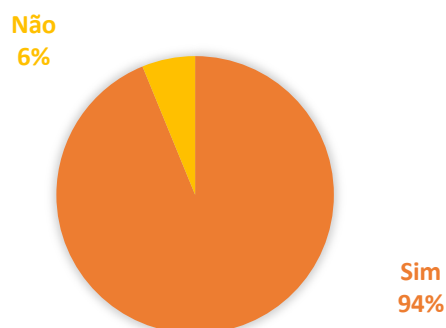


Gráfico 17- Distribuição da amostra por utilização de antiparasitários

Em relação a esta variável, a prevalência variou entre os dois grupos, com os seguintes resultados (Gráfico 18).

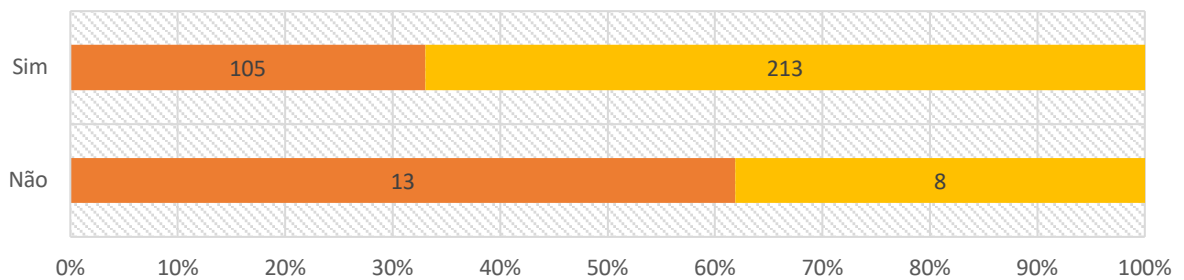


Gráfico 18- Prevalência por utilização de antiparasitários

i Princípio ativo do antiparasitário

Para além da utilização ou não de antiparasitários, aqueles que faziam uso dos mesmos, foram inquiridos sobre o princípio ativo do antiparasitário utilizado, tendo sido verificados diferentes princípios e conjugações entre eles. Devido ao facto das formulações orais serem as de mais fácil administração, quer pela via, quer pela possibilidade de aquisição da dose individual em vez de frasco multidoses, a adesão à sua utilização é substancialmente superior a outras formas e, no caso desta amostra, todos os cavalos desparasitados com pastas orais variavam entre duas formulações comerciais, cujos princípios ativos são ivermectina e praziquantel. Os restantes princípios ativos foram: ivermectina, noramectina, moxidectina com praziquantel, doramectina, noramectina com deltametrina, noramectina com febendazol e deltametrina, febendazol e ivermectina com praziquantel e deltametrina (Gráfico 19).

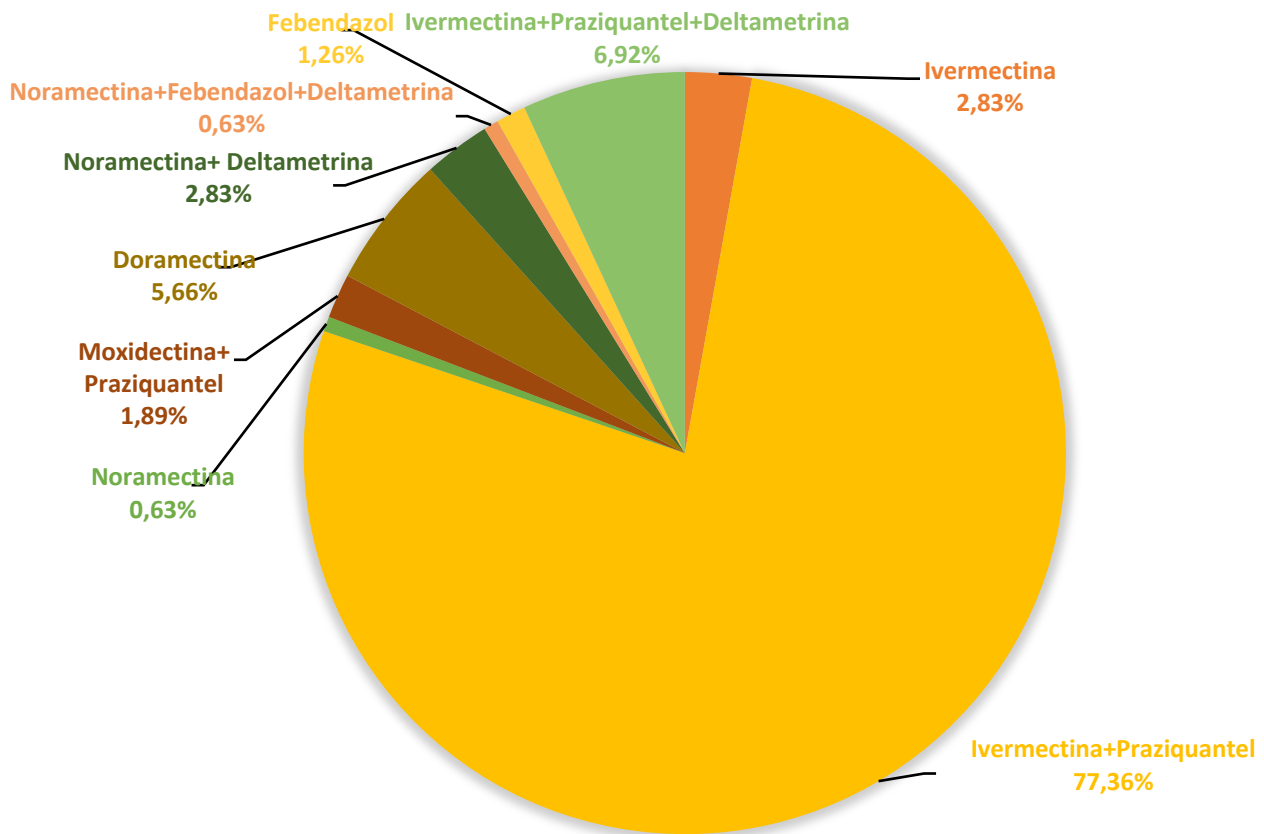


Gráfico 19- Distribuição da amostra por princípio ativo do antiparasitário

Verificaram-se diferentes prevalências consoante o princípio ativo em causa; a figura seguinte (Gráfico 20) representa os diferentes princípios ativos utilizados (ivermectina, noramectina, moxidectina com praziquantel, doramectina, noramectina com deltametrina, noramectina com febendazol e deltametrina, febendazol e ivermectina com praziquantel e deltametrina) e respetivos resultados.

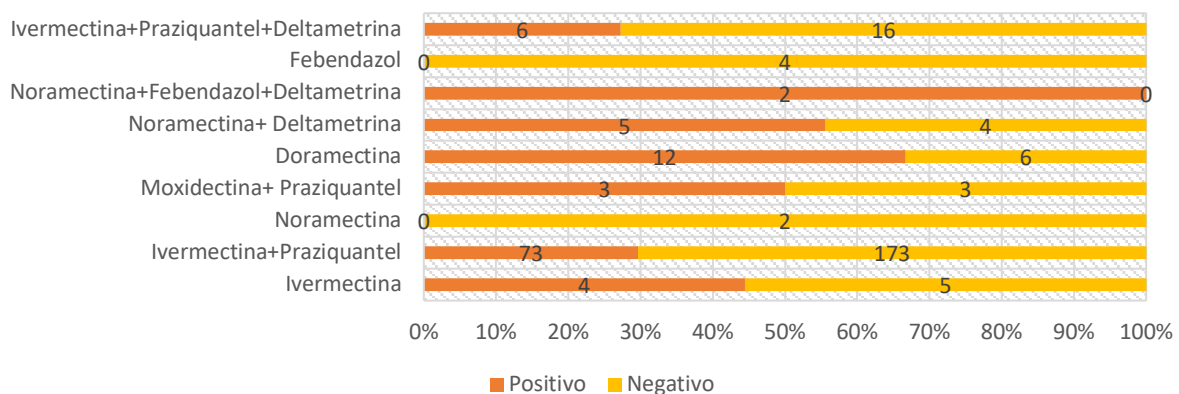


Gráfico 20- Prevalência por princípio ativo do antiparasitário

***j* Análise Filogenética**

Quando realizada a análise filogenética das amostras submetidas a sequenciação, verificou-se 100% de frequência de *Theileria equi* (27 amostras) e ausência completa da detecção de amostras positivas para *Babesia caballi*. Verificaram variações de *query cover* entre 99% e 100% e *identity* e entre 96,85% e 100% quando comparadas às sequências de *T. equi* da base de dados.

2. Estatística inferencial

De forma a compreender a associação entre as diferentes variáveis e a presença da parasitemia em equídeos, foi aplicado o teste de qui-quadrado de Pearson. Desta forma, foi possível avaliar a existência ou não de relação estatisticamente significativa entre variáveis independentes e o resultado da análise molecular.

***a* Regiões NUTS II**

O teste do qui-quadrado de Pearson revelou associação estatisticamente significativa entre a região NUTS II onde o cavalo habita e o resultado da análise molecular ($p < 0,001$).

A análise da tabela cruzada mostrou que o número de cavalos positivos estava associado à região do Alentejo (resíduo ajustado (RA) = 3,0), enquanto os cavalos habitantes na região Norte apresentaram uma associação com o resultado negativo (RA=-5,0).

***b* Sexo**

Foi aplicado o teste do qui-quadrado de Pearson para avaliar a associação entre o sexo do animal e o resultado da análise molecular. Não se verificou associação estatisticamente significativa ($p = 0,645$), indicando que a proporção de animais positivos não difere em função do sexo.

***c* Faixa etária**

O teste do qui-quadrado de Pearson revelou associação estatisticamente significativa entre a faixa etária e o resultado da análise molecular ($p=0,037$).

A análise da tabela cruzada mostrou que o número de cavalos positivos estava associado a animais jovens (RA= 2,3), enquanto os cavalos idosos apresentaram uma associação com o resultado negativo (RA= -2,3).

d Utilização/modalidade

O teste do qui-quadrado de Pearson revelou associação estatisticamente significativa entre a modalidade praticada pelo cavalo e o resultado da análise molecular ($p < 0,001$).

A análise da tabela cruzada mostrou que o número de cavalos positivos estava associado à utilização para lazer (RA= 5,9), enquanto os cavalos da modalidade de obstáculos apresentaram uma associação com o resultado negativo (RA= -6,8).

e Tipo de Pelagem

O teste do qui-quadrado de Pearson revelou associação estatisticamente significativa entre a pelagem do cavalo e o resultado da análise molecular ($p = 0,004$).

A análise da tabela cruzada mostrou que o número de cavalos positivos estava associado à pelagem castanho pezenho (RA = 2,1), enquanto os cavalos castanho e palomino apresentaram uma associação com o resultado negativo (RA= -3,3 e RA= -2,1 respetivamente).

f Raça

O teste do qui-quadrado de Pearson revelou associação estatisticamente significativa entre a raça e o resultado da análise molecular ($p < 0,001$).

A análise da tabela cruzada mostrou que o número de cavalos positivos estava associado à raça Puro-Sangue-Lusitano e ao cruzamento da raça Puro-Sangue-Árabe (RA = 2,1 e RA= 3,0 respetivamente), enquanto os cavalos Cruzados de Português e Nórdicos apresentaram uma associação com o resultado negativo (RA= -2,5 e RA=-2,1 respetivamente).

g Estilo de Vida

O teste do qui-quadrado de Pearson revelou associação estatisticamente significativa entre o estilo de vida do cavalo e o resultado da análise molecular ($p = 0,043$).

A análise da tabela cruzada mostrou que o número de cavalos positivos estava associado ao alojamento a campo (RA= 2,5), enquanto os cavalos estabulados apresentaram uma associação com o resultado negativo (RA= -2,3).

h Utilização de antiparasitário

O teste do qui-quadrado de Pearson revelou associação estatisticamente significativa entre a utilização de antiparasitários e o resultado da análise molecular ($p= 0,014$).

A análise da tabela cruzada mostrou que o número de cavalos positivos estava associado à não utilização de antiparasitários (RA= 2,7), enquanto os cavalos que utilizavam antiparasitários apresentaram uma associação com o resultado negativo (RA= -2,7).

i Princípio ativo do antiparasitário

O teste do qui-quadrado de Pearson revelou associação estatisticamente significativa entre o princípio ativo do antiparasitário e o resultado da análise molecular ($p= 0,007$).

A análise da tabela cruzada mostrou que o número de cavalos positivos estava associado à utilização de Doramectina como princípio ativo do antiparasitário (RA= 3,1), enquanto os cavalos desparasitados com o princípio ativo de Ivermectina e Praziquantel apresentaram uma associação com o resultado negativo (RA= -2,3).

IV. Discussão

A detecção exclusiva de *Theileria equi* em equinos assintomáticos no presente estudo está em consonância com as características epidemiológicas e biológicas desta espécie. Estudos realizados em Portugal indicam que *T. equi* apresenta uma prevalência superior à de *Babesia caballi* em equinos assintomáticos. Por exemplo, um estudo realizado no Norte de Portugal encontrou uma prevalência de 19,1% para *T. equi* e 11,7% para *B. caballi*, com 33,3% dos cavalos positivos para, pelo menos, um agente (Ribeiro *et al.*, 2013).

Esta tendência coincide com estudos realizados na região da Andaluzia, Espanha, onde a prevalência de *T. equi* foi significativamente superior à de *B. caballi* com uma prevalência de 42% e 22% respetivamente, e uma prevalência geral de piroplasmas equinos de 54% (Peris *et al.*, 2025).

A diferença na prevalência entre as duas espécies pode ser justificada pelas suas distintas características biológicas. Enquanto *T. equi* estabelece infeções persistentes, o que permite a detecção de baixos níveis parasitários mesmo em animais assintomáticos, a infeção por *B. caballi* tende a ser eliminada mais rapidamente pelo sistema imunitário do hospedeiro, resultando numa menor probabilidade de detecção em equídeos assintomáticos (Rocafort-Ferrer *et al.*, 2022).

A prevalência da infeção por piroplasmas foi relacionada com distintas variáveis. Em relação à região NUTS II onde os animais habitavam, foi possível verificar uma predisposição de cavalos do Alentejo ao resultado positivo, da mesma forma que os cavalos do Norte se demonstraram mais predispostos ao resultado negativo.

Este padrão pode ser explicado por fatores ambientais e ecológicos específicos. A região do Alentejo caracteriza-se por um clima mediterrânico quente e seco, com temperaturas médias elevadas, baixa pluviosidade e longos períodos de seca, condições que favorecem a atividade e ciclo biológico de carraças como *Rhipicephalus bursa* e *Dermacentor marginatus*, vetores conhecidos da piroplasmose equina (Camino *et al.*, 2021; Duaso *et al.*, 2025). Por outro lado, o Norte de Portugal apresenta maior humidade relativa, menor radiação solar e temperaturas médias anuais inferiores, condições que dificultam a proliferação e sobrevivência dessas carraças e resultam em menor prevalência da infeção (Ribeiro *et al.*, 2013)

A importância da localização geográfica na epidemiologia da PE foi já confirmada em vários estudos europeus. Um estudo retrospectivo realizado em Portugal com 3063 cavalos revelou prevalência molecular de 40,5% para *T. equi* e 8,3% para *B. caballi*, destacando a

região de origem como um dos principais fatores de risco. As regiões com maior e menor prevalência estão em concordância com o presente estudo (Cabete *et al.*, 2025).

Noutro estudo, Duaso *et al.* (2025) observaram uma prevalência da infecção por piroplasmas de 31,5% em equídeos na região sudoeste da Europa, evidenciando a influência que as condições ambientais podem ter no resultado do teste molecular. Esta tendência é coincidentemente verificada por Axt *et al.* (2024) num estudo com mais de 4000 equídeos europeus em que se revelou positividade por PCR significativamente maior no sul do continente, relacionada com o aumento de vetores dos géneros *Dermacentor* e *Hyalomma* em resposta às alterações climáticas.

O estudo desenvolvido por Deshpande *et al.* (2024), verificou que, nas últimas décadas, o aumento da temperatura média anual tem tido repercussões na duração da época de maior atividade das carrças, começando no início da primavera em vez do final e estendendo-se até meados do outono. Esta grande alteração tem implicação direta na epidemiologia da doença, não só pelo aumento da densidade vetorial, como pelo aumento da época vetorial crítica, e também pela criação de um ambiente mais propício à proliferação de carrças em áreas que anteriormente apresentavam temperaturas médias pouco favoráveis e, por isso, tinha prevalências mais baixas; estes fatores aumentam o risco de infestação por carrças e infecção por piroplasmas (Cabete *et al.*, 2025).

Os fatores de manejo também podem explicar as diferenças regionais observadas. No Alentejo, predominam sistemas extensivos e maior interação com fauna silvestre, aumentando o risco de exposição a carrças infetadas. Já no Norte e Centro predominam explorações de menor dimensão e maior vigilância sanitária, reduzindo o risco de infecção (Cabete *et al.*, 2025).

Tal como na bibliografia citada, o presente estudo verificou a estabulação completa de cavalos da região Norte e a variação de diferentes sistemas no Alentejo. Mais uma vez, não só a região pelas suas características ambientais, mas também as tendências no manejo podem ter tido influência nos resultados obtidos.

No que diz respeito à relação entre o resultado do teste molecular e o sexo do animal testado, foi verificada ausência de relação entre as duas variáveis. Esta ausência de associação entre sexo e prevalência molecular da piroplasmose equina é consistente com vários estudos que relataram resultados semelhantes. Por exemplo, algumas fontes como Moretti *et al.* (2010) e Onyiche *et al.* (2020) indicam que o sexo não é um fator determinante para a infecção por *Theileria equi* ou *Babesia caballi* em equídeos. No entanto, algumas

investigações, embora minoritárias, sugerem prevalências variáveis consoante o sexo, mas tais achados não são consensuais (Ferreira *et al.*, 2024).

Esta ausência de variação é sustentada por não existirem evidências de diferenças imunológicas relevantes entre sexos que afetem a suscetibilidade à piroplasmose em equídeos (Axt *et al.*, 2024).

Em contrapartida, a faixa etária do animal demonstrou que os animais jovens estão mais predispostos à infeção causada por piroplasmas, ao contrário dos animais idosos, que apresentam uma predisposição reduzida. Também Cabete *et al.*, (2025) verificou esta predisposição mais elevada em animais jovens. Esta variação poderá estar associada às recentes ou ainda ativas infeções em cavalos mais jovens, enquanto cavalos mais velhos podem ter quantidades parasitárias reduzidas, indetetáveis pela técnica de PCR convencional utilizada (Nogueira *et al.*, 2017; Onyiche *et al.*, 2020).

Para além disso, também alguma variabilidade de manejo pode estar associada à idade dos animais, ou seja, cavalos em idade anterior ao início de desbaste estão tendencialmente a campo, o que aumenta a exposição aos vetores com capacidade de transmissão de piroplasmas presentes no ambiente, enquanto cavalos mais velhos, por limitações, nomeadamente de saúde, permanecem mais resguardados nos estábulos (Alcaide Lopes, 2020).

Já em relação à utilização do animal/modalidade praticada, os cavalos de lazer foram substancialmente mais associados ao resultado positivo enquanto os cavalos da modalidade de obstáculos tiveram maior associação ao resultado negativo.

Essa associação pode estar relacionada a diferentes níveis de exposição aos vetores transmissores de PE consoante a utilização/modalidade do equídeo. Cavalos utilizados para lazer geralmente têm maior contato com áreas abertas e pastagens, onde a presença de carraças vetorais como *Hyalomma* spp. e *Rhipicephalus* spp. é maior, elevando a possibilidade de infeção (Cabete *et al.*, 2025). Para além disso, a participação em atividades lúdicas ao ar livre por parte de cavalos de lazer é elevada, pelo que aumenta o contacto com possíveis vetores infetados (Campos, 2017).

Por outro lado, cavalos da modalidade de salto de obstáculos tendem a passar mais tempo no interior de instalações controladas, como centros equestres com controlo veterinário rigoroso e menor exposição ao ambiente rural (Nadal *et al.*, 2022).

De modo geral, não é a modalidade que tem uma relação direta com o resultado do teste molecular, mas sim o manejo, tipo de ambiente onde o cavalo permanece enquanto

exerce funções, vigilância sanitária das instalações, materiais e animais ao redor que determinam a ocorrência de fatores extrínsecos ao animal e que podem proporcionar o desenvolvimento de ambiente de risco, favorecendo a ocorrência da infecção (Cabete *et al.*, 2025).

No presente estudo, os animais de lazer pertenceram tendencialmente à região do Alentejo, e os da modalidade de obstáculos, apesar de distribuídos por todo o território, representaram 100% dos cavalos da região Norte. A associação entre a região, modalidade e estabulação exclusiva deste grupo de 55 indivíduos da região Norte pode ter influenciado os resultados obtidos.

Já em relação à pelagem do cavalo, foi possível verificar uma associação entre o resultado positivo e a pelagem castanho pezenho e o resultado negativo e a pelagem castanho e palomino. Embora não existam ainda estudos específicos sobre a relação entre o tipo de pelagem e prevalência de piroplasmas em equídeos, Chaibi *et al.* (2024) observaram resultados semelhantes em dromedários, verificando uma maior carga de ectoparasitas em indivíduos de pelagem escura. Tal pode dever-se a fatores físicos e comportamentais, incluindo a maior absorção de calor em pelagens mais escuras que cria microambientes favoráveis à fixação de carrças e a maior camuflagem destes vetores em tons semelhantes aos do pelo do hospedeiro. Apesar de interessante a relação entre a pelagem do equídeo e o resultado do teste molecular, ainda carece de estudos específicos para um entendimento aprofundado da influência desta característica fenotípica na epidemiologia molecular da PE, sendo uma área promissora para pesquisas futuras que associem características desta natureza a fatores de risco para a infecção (Cabete *et al.*, 2025).

Relativamente à raça, também nesta variável foi possível verificar influência no resultado do teste molecular – neste estudo, os cavalos da raça Puro-Sangue Lusitano e cruzamentos da raça Puro-Sangue Árabe apresentaram predisposição ao resultado positivo, enquanto os cavalos cruzados de Português e Nórdicos mostraram predisposição ao resultado negativo.

Estudos desenvolvidos em Portugal indicam que a prevalência da PE pode variar conforme a raça, o que pode estar relacionado tanto a predisposições genéticas quanto a diferenças no manejo associado a cada raça (Cabete *et al.*, 2025). O Puro-Sangue Lusitano, por exemplo, é uma raça tradicionalmente criada em regime extensivo na região do Alentejo, onde a incidência de vetores, como carrças ixodídeas, é elevada (Cabete *et al.*, 2025; Ribeiro *et al.*, 2013); já cruzamentos da raça Puro-Sangue Árabe não estão tão fortemente associados a um tipo de criação ou manejo específico, pelo que o resultado do teste molecular é bastante variável (Duaso *et al.*, 2025).

Cavalos cruzados de Português e Nórdicos tendem a estar associados à prática desportiva mais intensiva e estabulação, características que reduzem a exposição aos vetores capazes de transmitir os agentes da piroplasmose. Dessa forma, a associação negativa observada para essas raças está provavelmente relacionada à menor exposição ao ambiente onde os vetores são abundantes, assim como ao tratamento e manejo profilático mais rigorosos (Camino *et al.*, 2020).

Em relação ao estilo de vida, foi clara a tendência para o resultado positivo em equídeos a campo, e uma tendência para o resultado negativo em equídeos estabulados.

Essa tendência pode ser explicada principalmente pelo maior contato que cavalos a campo têm com vetores da PE, como carrças dos géneros *Hyalomma*, *Rhipicephalus* e *Dermacentor* (Cabete *et al.*, 2025). Quanto mais frequente for o contacto com estes vetores, mais provável é a ocorrência de uma picada por parte de uma carrça infetada (Campos, 2017). Para além disso, o estilo de vida a campo implica um contacto não tão regular entre o ser humano e os cavalos, tornando muitas vezes difícil o controlo de vetores que parasitam o animal e que podem ser responsáveis pela transmissão de agentes patogénicos (Wise *et al.*, 2013).

O estudo de Duaso *et al.* (2025), realizado no sul da Europa (Andaluzia, Espanha), identificou também a prevalência significativamente maior em cavalos mantidos em regime extensivo, reforçando que a exposição prolongada a pastagens e o contacto com carrças dos géneros *Hyalomma* e *Rhipicephalus* são fatores determinantes na infeção por *Theileria equi* e *Babesia caballi*. Em contraste, animais mantidos em estábulos apresentaram menor prevalência, atribuída ao controlo mais eficaz de vetores e higienização regular dos ambientes.

No que diz respeito à utilização de antiparasitários, verificou-se o peso da sua utilização no resultado do teste molecular, reforçando a eficácia e importância da utilização dos mesmos. Já em relação ao princípio ativo, aquele que apresentou maior eficácia foi a conjugação de ivermectina com praziquantel, da mesma forma que o uso de doramectina se verificou deficiente.

Essa associação está em consonância com o papel dos antiparasitários no controle indireto da piroplasmose equina, pois muitos desses medicamentos, especialmente as lactonas macrocíclicas, como ivermectina, abamectina e moxidectina, atuam sobre os vetores da doença, as carrças, além da sua ação contra helmintes intestinais (Wise *et al.*, 2013).

O uso periódico e adequado de antiparasitários reduz a infestação por carrças, diminuindo a exposição dos equídeos aos agentes infecciosos *Theileria equi* e *Babesia caballi* (Cabete *et al.*, 2025).

Por outro lado, Duaso *et al.* (2025) verificaram o aumento exponencial do parasitismo por carrças na ausência do tratamento por antiparasitários.

Relativamente ao princípio ativo dos mesmos Mendes (2017) verificou a maior eficácia de ivermectina quando comparada com doramectina, o que vai de acordo aos resultados obtidos no presente estudo.

No entanto, ressalva-se que nenhum antiparasitário elimina completamente os agentes da piroplasmose, sendo necessária a associação de manejo ambiental e vigilância epidemiológica para controlo eficaz (Wise *et al.*, 2013). Além disso, o uso inadequado de antiparasitários pode contribuir para o desenvolvimento de resistência, comprometendo a eficácia terapêutica (Mendes, 2017).

Foi relatada pelos proprietários alguma preferência pelo modo de aplicação e valor monetário mais reduzido de antiparasitários de formulação oral (pasta), o que coincide com a formulação de ivermectina com praziquantel. Também esta facilidade pode favorecer a administração regular e responsável de antiparasitários, o que evita desenvolvimento de resistências, considerando a fácil adequação da dosagem ao peso do animal e, apesar de requerer prescrição medico-veterinária, não estar dependente da administração por um Médico Veterinário.

V. Conclusões

No presente estudo, conclui-se que, do total de 339 equinos assintomáticos testados por PCR convencional, 118 apresentaram resultado positivo, correspondendo a uma prevalência global de 34,8%.

A análise filogenética das 27 amostras submetidas a sequenciação confirmou a presença exclusiva de *Theileria equi*, não tendo sido detetada qualquer amostra positiva para *Babesia caballi*.

A prevalência variou significativamente entre regiões NUTS II, verificando-se maior frequência de animais positivos no Alentejo (50%; 36/72), seguido do Algarve (50%; 2/4), da Península de Setúbal (45,5% 10/22) e do Oeste e Vale do Tejo (39,2% 40/102), enquanto o Norte (5,5%; 3/55) apresentou a menor taxa de positividade (Figura 4 em anexo). Estas diferenças refletem a influência das condições climáticas, ecológicas e de manejo, que favorecem o desenvolvimento e atividade dos vetores em determinadas regiões, sabendo-se que a região do Alentejo predispõe a um resultado positivo e a região Norte a um resultado negativo.

No que se refere ao sexo, a prevalência observada foi de 36,4% nas fêmeas (43/118) e 33,9% nos machos (75/221). Não se observou associação estatisticamente significativa entre o resultado molecular e o género dos animais, corroborando a ausência de predisposição sexual descrita na literatura.

A variável “faixa etária” apresentou associação significativa, com poldros (45,1%; 37/82) e jovens (36,4%; 7/19), enquanto adultos (32,3%; 32/99) e idosos (22%; 13/59) revelaram menores taxas. Os animais mais jovens estão mais predispostos à infeção, possivelmente devido a uma menor maturidade imunológica e a maior exposição a ambientes exteriores.

Também se verificou associação significativa entre a utilização/modalidade e o resultado molecular. Os cavalos utilizados para lazer apresentaram a maior prevalência (52,9%; 74/140), seguidos dos cavalos de ensino (41,1%; 23/56) e, por fim, dos de obstáculos (13,0%; 17/131). Esta diferença pode ser explicada pelas condições de manejo, sendo os cavalos de lazer mais predispostos ao resultado positivo e os de obstáculos ao resultado negativo.

Relativamente à raça, observou-se associação estatisticamente significativa, com cruzamentos de Árabe (68,8%) e Lusitanos (42,2%) associados ao resultado positivo, enquanto Cruzados de Português e Nórdicos associados a resultados negativos. Estas

diferenças poderão estar relacionadas com as práticas de manejo e a utilização predominante de cada raça no presente estudo.

O estilo de vida também revelou associação significativa, com animais mantidos a campo mais frequentemente positivos e estabulados associados ao resultado negativo. O contacto com o ambiente e a exposição constante a carraças no regime extensivo justificam esta tendência.

No que respeita à utilização de antiparasitários, verificou-se associação significativa, sendo mais elevada a prevalência entre animais não desparasitados, enquanto os animais tratados regularmente apresentaram maior probabilidade de resultado negativo. Estes dados reforçam o papel fundamental da desparasitação periódica e correta na prevenção da infeção.

Por fim, observou-se também associação significativa com o princípio ativo do antiparasitário utilizado. A doramectina associou-se ao resultado positivo, sugerindo menor eficácia na prevenção da piroplasmose, enquanto a ivermectina com praziquantel mostrou associação negativa, indicando melhor desempenho no controlo indireto da infeção.

O presente estudo permitiu caracterizar a situação epidemiológica da PE em equídeos assintomáticos em Portugal Continental, confirmando a predominância de *Theileria equi* e evidenciando a influência significativa de fatores geográficos, etários e de manejo na ocorrência da infeção.

Estes resultados reforçam a necessidade de vigilância epidemiológica contínua, do controlo eficaz de vetores e da utilização racional e regular de antiparasitários, de modo a mitigar o impacto sanitário e económico da piroplasmose equina em Portugal.

Numa perspetiva futura, mais estudos deveriam ser feitos na área, especialmente para investigação de fatores predisponentes específicos, limitando as variáveis às de interesse, diminuindo a interferência de variáveis externas que possam enviesar os resultados obtidos em investigações com amostragens muito diversificadas.

VI. Referências Bibliográficas

Adaszek, L., Górna, M., Krzysiak, M., Adaszek, M., Garbal, M., & Winiarczyk, S. (2011). Identification of the piroplasms isolated from horses with clinical piroplasmosis in Poland. *Polish Parasitological Society*, 57, 21–26.

Alcaide Lopes, P. (2020). Piroplasmose equina e implicações nas trocas comerciais em Portugal e no Brasil: percepções em uma amostras de proprietários, coudelarias e médicos veterinários. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

Alexandre, R., & Angeiras, C. (2024). Piroplasmose equina: diagnóstico molecular e avaliação de alterações hematológicas em cavalos com doença clínica e subclínica.

Allsopp, M. T. E. P., Lewis, B. D., & Penzhorn, B. L. (2007). Molecular evidence for transplacental transmission of *Theileria equi* from carrier mares to their apparently healthy foals. *Veterinary Parasitology*, 148(2), 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.05.017>

Almazán, C., Scimeca, R. C., Reichard, M. V., & Mosqueda, J. (2022). Babesiosis and Theileriosis in North America. In *Pathogens* (Vol. 11, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pathogens11020168>

Axt, C. W., Springer, A., Strube, C., Jung, C., Naucke, T. J., Müller, E., & Schäfer, I. (2024). Molecular and Serological Detection of Vector-Borne Pathogens Responsible for Equine Piroplasmosis in Europe between 2008 and 2021. *Microorganisms*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms12040816>

Barradas, P. F., Marques, J., Tavares, C., Brito, N. V., & Mesquita, J. R. (2024). Detection of tick-borne pathogens in *Rhipicephalus bursa* ticks collected from the autochthonous Garrano breed of horses in Portugal. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 51. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2024.101033>

Believe, A. (2024). Molecular epidemiology and genotypic diversity of equine piroplasma parasites. Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine.

Cabete, A., Xufre, Â., Padre, L., Bettencourt, E., Nunes, T., & Gomes, J. (2025). Occurrence and risk factors of equine piroplasmosis in Portugal: A five-year retrospective study. *Veterinary Parasitology*, 334. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2024.110378>

Camino, E., Cruz-Lopez, F., de Juan, L., Dominguez, L., Shiels, B., & Coultous, R. M. (2020). Phylogenetic analysis and geographical distribution of *Theileria equi* and *Babesia caballi* sequences from horses residing in Spain. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 11(6). <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101521>

Campos, J. (2017). Fatores Determinantes para a ocorrência de piroplasmose equina no Pantanal Sul Matogrossense.

Chaibi, R., Mimoune, N., Benaceur, F., Stambouli, L., Hamida, L., Khedim, R., Saidi, R., Benaissa, M. H., Gouzi, H., Neffar, S., & Chenchouni, H. (2024). Extrinsic and intrinsic drivers of prevalence and abundance of hard-bodied ticks (Acari: Ixodidae) in one-humped camel (*Camelus dromedarius*). *Parasite Epidemiology and Control*, 27. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2024.e00387>

Deshpande, G., Beetch, J. E., Heller, J. G., Naqvi, O. H., & Kuhn, K. G. (2024). Assessing the Influence of Climate Change and Environmental Factors on the Top Tick-Borne Diseases in the United States: A Systematic Review. In *Microorganisms* (Vol. 12, Issue 1). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/microorganisms12010050>

Duaso, J., Perez-Ecija, A., Navarro, A., Martínez, E., De Las Heras, A., & Mendoza, F. J. (2025). True Prevalence and Seroprevalence of Piroplasmosis in Horses in Southwestern Europe. *Animals*, 15(14). <https://doi.org/10.3390/ani15142047>

Ferreira, P. A. L., Pereira, J. A. S., Alexandrowitsch, F. C. F., Lemes, B. C., Amaral, I. M., Sousa, B. R., Carvalho, J. L. da S., de Mesquita, M. B., & Scarpa, J. O. de S. (2024). *Babesia caballi* como um dos agentes infecciosos da Piroplasmose Equina: Revisão de literatura. In *Fundamentos da Ciência Médica: Uma Perspectiva Multidisciplinar*. Seven Editora. <https://doi.org/10.56238/sevened2024.021-008>

Ghosh, S., & Nagar, G. (2014). Problem of ticks and tick-borne diseases in india with special emphasis on progress in tick control research: A review. *Journal of Vector Borne Diseases*, 51(4), 259–270. <https://doi.org/10.4103/0972-9062.147842>

Giubega, S., Ilie, M. S., Morariu, S., Imre, M., Dreghiciu, C., Rugea, T., Ivascu, S., Simion, G., & Dărăbuș, G. (2024). Molecular Investigations of *Babesia caballi* from Clinically Healthy Horses in Southwestern Romania. *Veterinary Sciences*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/vetsci11120600>

Hermans, L. M., Bonsergent, C., Josson, A., Rocafort-Ferrer, G., Guyader, M. le, Pessey, S. A., Leblond, A., & Malandrin, L. (2025). Evaluation of *Theileria equi* vertical transmission rate and routes in a cohort of asymptomatic mares and their foals. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 16(1). <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2024.102432>

Knowles, D. P., Kappmeyer, L. S., Haney, D., Herndon, D. R., Fry, L. M., Munro, J. B., Sears, K., Ueti, M. W., Wise, L. N., Silva, M., Schneider, D. A., Grause, J., White, S. N.,

Tretina, K., Bishop, R. P., Odongo, D. O., Pelzel-McCluskey, A. M., Scoles, G. A., Mealey, R. H., & Silva, J. C. (2018). Discovery of a novel species, *Theileria haneyi* n. sp., infective to equids, highlights exceptional genomic diversity within the genus *Theileria*: implications for apicomplexan parasite surveillance. *International Journal for Parasitology*, 48(9–10), 679–690. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.03.010>

Mendes, A. (2017). Eficácia da doramecctina administrada por via oral e intramuscular em equinos.

Mendoza FJ, Pérez-Écija A, Kappmeyer LS, Suarez CE, Bastos RG. New insights in the diagnosis and treatment of equine piroplasmosis: pitfalls, idiosyncrasies, and myths. *Front Vet Sci*. 2024 Aug 14;11:1459989. doi: 10.3389/fvets.2024.1459989. PMID: 39205808; PMCID: PMC11349644.

Moretti, A., Mangili, V., Salvatori, R., Maresca, C., Scoccia, E., Torina, A., Moretta, I., Gabrielli, S., Tampieri, M. P., & Pietrobelli, M. (2010). Prevalence and diagnosis of *Babesia* and *Theileria* infections in horses in Italy: A preliminary study. *Veterinary Journal*, 184(3), 346–350. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.03.021>

Mullayarova, I., Nikolaeva, O., & Ruzikulov, N. (2024). Effectiveness of treatment of equine piroplasmosis. *Вестник Ошского Государственного Университета. Сельское Хозяйство: Агрономия, Ветеринария и Зоотехния*, 2(7), 136–143. [https://doi.org/10.52754/16948696_2024_2\(7\)_14](https://doi.org/10.52754/16948696_2024_2(7)_14)

Nogueira, R. de M. S., Silva, A. B., Sato, T. P., de Sá, J. C., dos Santos, A. C. G., Filho, E. F. A., do Vale, T. L., & Gazêta, G. S. (2017). Molecular and serological detection of *Theileria equi*, *Babesia caballi* and *Anaplasma phagocytophilum* in horses and ticks in Maranhão, Brazil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 37(12), 1416–1422. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2017001200010>

Onyiche, T. G. E., Taioe, M. O., Molefe, N. I., Biu, A. A., Luka, J., Omeh, I. J., Yokoyama, N., & Thekiso, O. (2020). Equine piroplasmosis: An insight into global exposure of equids from 1990 to 2019 by systematic review and meta-analysis. In *Parasitology* (Vol. 147, Issue 13, pp. 1411–1424). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/S0031182020001407>

Otgonsuren, D., Amgalanbaatar, T., Narantsatsral, S., Enkhtaivan, B., Munkhgerel, D., Zoljargal, M., Davkharbayar, B., Myagmarsuren, P., Battur, B., Battsetseg, B., Sivakumar, T., & Yokoyama, N. (2024). Epidemiology and genetic diversity of *Theileria equi* and *Babesia*

caballi in Mongolian horses. *Infection, Genetics and Evolution*, 119.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2024.105571>

Peris, M. P., Serrano, M., Romero, A., García, M., Halaihel, N., Castillo, J. A., & Gracia, M. J. (2025). Prevalence rates of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in the horse population of northern Spain: a serological and molecular study. *Veterinary Research Communications*, 49(3). <https://doi.org/10.1007/s11259-025-10722-y>

Probst, J., Springer, A., Topp, A. K., Bröker, M., Williams, H., Dautel, H., Kahl, O., & Strube, C. (2023). Winter activity of questing ticks (*Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus*) in Germany – Evidence from quasi-natural tick plots, field studies and a tick submission study. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 14(6).
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2023.102225>

Ramsay, J. D., Ueti, M. W., Johnson, W. C., Scoles, G. A., Knowles, D. P., & Mealey, R. H. (2013). Lymphocytes and Macrophages Are Infected by *Theileria equi*, but T Cells and B Cells Are Not Required to Establish Infection In Vivo. *PLoS ONE*, 8(10).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076996>

Rocafort-Ferrer, G., Leblond, A., Joulié, A., René-Martellet, M., Sandoz, A., Poux, V., Pradier, S., Barry, S., Vial, L., & Legrand, L. (2022). Molecular assessment of *Theileria equi* and *Babesia caballi* prevalence in horses and ticks on horses in southeastern France. *Parasitology Research*, 121(3), 999–1008. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07441-7>

Rothschild, C. M. (2013). Equine piroplasmiasis. In *Journal of Equine Veterinary Science* (Vol. 33, Issue 7, pp. 497–508). <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.03.189>

Santos-Silva, M. M., Beati, L., Santos, A. S., De Sousa, R., Nuncio, M. S., Melo, P., Santos-Reis, M., Fonseca, C., Formosinho, P., Vilela, C., & Bacellar, F. (2011). The hard-tick fauna of mainland Portugal (Acari: Ixodidae): An update on geographical distribution and known associations with hosts and pathogens. *Experimental and Applied Acarology*, 55(1), 85–121. <https://doi.org/10.1007/s10493-011-9440-x>

Schnittger, L., Rodriguez, A. E., Florin-Christensen, M., & Morrison, D. A. (2012). *Babesia*: A world emerging. In *Infection, Genetics and Evolution* (Vol. 12, Issue 8, pp. 1788–1809). <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.07.004>

Scoles, G. A., & Ueti, M. W. (2015). Vector ecology of equine piroplasmiasis*. In *Annual Review of Entomology* (Vol. 60, pp. 561–580). Annual Reviews Inc.
<https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-021110>

Taylor, M. A. ., Coop, R. L. ., & Wall, Richard. (2016). *Veterinary parasitology* (4th ed.). John Wiley and Sons, Inc.

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>

Ueti, M. W., Palmer, G. H., Scoles, G. A., Kappmeyer, L. S., & Knowles, D. P. (2008). Persistently infected horses are reservoirs for intrastadial tick-borne transmission of the apicomplexan parasite *Babesia equi*. *Infection and Immunity*, 76(8), 3525–3529.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00251-08>

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>

WOAH. (2021). *Equine piroplasmosis: Aetiology Epidemiology Diagnosis Prevention and Control References*. <http://www.oie.int/wahis/public.php?page=home>

Zanet, S., Bassano, M., Trisciuglio, A., Taricco, I., & Ferroglio, E. (2017). Horses infected by Piroplasms different from *Babesia caballi* and *Theileria equi*: species identification and risk factors analysis in Italy. *Veterinary Parasitology*, 236, 38–41.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.01.003>

De Waal, D.T., Van Heerden, J., 2004. Equine piroplasmosis. In: Coetzer, J.A.W., Tustin, R.C. (Eds.), *Infectious Diseases of Live- stock*. Oxford, Southern Africa, pp. 425–434.

VII. Anexos e apêndices

1. Inquérito aos proprietários

Questionário EquiVBD

Número da amostra: _____

Data de colheita: ____ / ____ / ____

1. Freguesia: _____

2. Concelho: _____

3. Distrito: _____

4. Idade: _____

5. Raça: _____

6. Tipo de pelagem: _____

7. Sexo: M F MC

8. Tipo de utilização do animal: Lazer Desporto

9. Modalidade equestre: _____

10. Estilo de vida: A campo Estabulado Estabulado com acesso a *paddock*

11. Faz desparasitação Sim Não

11.1. Em caso afirmativo, nome do princípio ativo: _____

12. Sinais clínicos relevantes: _____

13. Alguma terapia? AINEs Imunossuppressores Antibióticos

2. Formulário de consentimento informado



faculdade
de medicina veterinária



UNIVERSIDADE
LUSÓFONA

Apêndice 2

Formulário de Consentimento

· Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona ·

Eu, _____,
detentor do animal de nome _____, espécie _____, raça
_____, sexo _____, de idade (anos) _____, com o número de
identificação eletrónica _____, aceito que o animal participe
no _____ projeto
entitulado: _____
_____, sob a supervisão do
médico veterinário _____.

Declaro ter sido informado dos seguintes pontos:

- Que a participação é voluntária podendo o animal ser retirado a qualquer momento.
- Fui elucidado sobre os procedimentos.
- Os resultados do projeto e material audiovisual podem ser divulgados e publicados sem menção do nome do detentor do animal, do animal e do seu número de identificação eletrónica.

Por estar de acordo, assino o presente consentimento informado.

_____, ____ de _____ de 20__

Assinatura do detentor:

BI/CC n.º _____

3. Tabelas estatística inferencial

Tabela 1- Teste qui-quadrado região NUTS II

	Valor	df	Significância Assintótica (Bilateral)
Qui-quadrado de Pearson	30,878 ^a	6	,000
Razão de verossimilhança	37,115	6	,000
Associação Linear por Linear	22,120	1	,000
N de Casos Válidos	339		

Tabela 2- Tabela cruzada resultado do teste x região NUTS II

		Norte	Centro	Oeste e Vale do Tejo	Grande Lisboa	Península de Setúbal	Alentej o	Algarve	Total	
Resultado do teste	Contagem	52	20	62	37	12	36	2	221	
	Negativo	Contagem Esperada	35,9	19,6	66,5	35,2	14,3	46,9	2,6	221,0
	Resíduos ajustados	5,0	,2	-1,1	,6	-1,1	-3,0	-,6		
	Contagem	3	10	40	17	10	36	2	118	
	Positivo	Contagem Esperada	19,1	10,4	35,5	18,8	7,7	25,1	1,4	118,0
	Resíduos ajustados	- 5,0	-,2	1,1	-,6	1,1	3,0	,6		
	Contagem	55	30	102	54	22	72	4	339	
	Total	Contagem Esperada	55,0	30,0	102,0	54,0	22,0	72,0	4,0	339,0

Tabela 3- Teste qui-quadrado sexo

	Valor	df	Significância Assintótica (Bilateral)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1 lado)
Qui-quadrado de Pearson	,213 ^a	1	,645		
Correção de continuidade ^b	,117	1	,733		
Razão de verossimilhança	,212	1	,645		
Teste Exato de Fisher				,720	,365
Associação Linear por Linear	,212	1	,645		
N de Casos Válidos	339				

Tabela 4- Teste qui-quadrado faixa etária

	Valor	df	Significância Assintótica (Bilateral)
Qui-quadrado de Pearson	8,462 ^a	3	,037
Razão de verossimilhança	8,655	3	,034
Associação Linear por Linear	8,171	1	,004
N de Casos Válidos	339		

Tabela 5- Tabela cruzada resultado do teste x faixa etária

		Poldro	Jovem	Adulto	Idoso	Total	
Resultado do teste	Negativo	Contagem	45	63	67	46	221
		Contagem Esperada	53,5	64,5	64,5	38,5	221,0
		Resíduos ajustados	-2,3	-,4	,6	2,3	
	Positivo	Contagem	37	36	32	13	118
		Contagem Esperada	28,5	34,5	34,5	20,5	118,0
		Resíduos ajustados	2,3	,4	-,6	-2,3	
Total	Contagem	82	99	99	59	339	
	Contagem Esperada	82,0	99,0	99,0	59,0	339,0	

Tabela 6- Teste qui-quadrado utilização/modalidade

	Valor	df	Significância Assintótica (Bilateral)
Qui-quadrado de Pearson	48,544 ^a	2	,000
Razão de verossimilhança	52,290	2	,000
Associação Linear por Linear	11,869	1	,001
N de Casos Válidos	327		

Tabela 7- Tabela cruzada resultado do teste x utilização/modalidade

		Ensino	Obstáculos	Lazer	Total	
Resultado do teste	Negativo	Contagem	33	114	66	213
		Contagem Esperada	36,5	85,3	91,2	213,0
		Resíduos ajustados	-1,1	6,8	-5,9	
	Positivo	Contagem	23	17	74	114
		Contagem Esperada	19,5	45,7	48,8	114,0
		Resíduos ajustados	1,1	-6,8	5,9	
Total	Contagem	56	131	140	327	
	Contagem Esperada	56,0	131,0	140,0	327,0	

Tabela 8- Teste qui-quadrado tipo de pelagem

	Valor	df	Significância (Bilateral)	Assintótica
Qui-quadrado de Pearson	22,800 ^a	8	,004	
Razão de verossimilhança	24,044	8	,002	
Associação Linear por Linear	1,471	1	,225	
N de Casos Válidos	339			

Tabela 9- Tabela cruzada resultado do teste x pelagem

		Ruça	Castanha	Palomina	Baia	Castanho Pezenho	Isabel	Preta	Lazã	Malhado	Total
Resultado do teste	Negativo										
	Contagem	66	84	12	11	1	4	8	32	3	221
	Contagem Esperada	73,7	70,4	8,5	12,4	3,3	5,9	10,4	33,9	2,6	221,0
	Resíduos ajustados	-1,9	3,3	2,1	-,7	-2,1	-1,3	-1,3	-,6	.4	
	Positivo										
	Contagem	47	24	1	8	4	5	8	20	1	118
	Contagem Esperada	39,3	37,6	4,5	6,6	1,7	3,1	5,6	18,1	1,4	118,0
	Resíduos ajustados	1,9	-3,3	-2,1	,7	2,1	1,3	1,3	.6	-,4	
	Total										
Contagem	113	108	13	19	5	9	16	52	4	339	
Contagem Esperada	113,0	108,0	13,0	19,0	5,0	9,0	16,0	52,0	4,0	339,0	

Tabela 10- Teste qui-quadrado raça

	Valor	df	Significância (Bilateral)	Assintótica
Qui-quadrado de Pearson	18,010 ^a	3	,000	
Razão de verossimilhança	18,507	3	,000	
Associação Linear por Linear	3,250	1	,071	
N de Casos Válidos	310			

Tabela 11- Tabela cruzada resultado do teste x raça

		Lusitano	Cruzado de Portugues	Cruzamentos de árabe	Nordicos	Total	
Resultado do teste	Negativo	Contagem	59	128	5	12	204
		Contagem Esperada	67,1	117,8	10,5	8,6	204,0
		Resíduos ajustados	-2,1	2,5	-3,0	2,1	
	Positivo	Contagem	43	51	11	1	106
		Contagem Esperada	34,9	61,2	5,5	4,4	106,0
		Resíduos ajustados	2,1	-2,5	3,0	-2,1	
Total	Contagem	102	179	16	13	310	
	Contagem Esperada	102,0	179,0	16,0	13,0	310,0	

Tabela 12- Teste qui-quadrado estilo de vida

	Valor	df	Significância (Bilateral)	Assintótica
Qui-quadrado de Pearson	8,148 ^a	3	,043	
Razão de verossimilhança	8,169	3	,043	
Associação Linear por Linear	4,949	1	,026	
N de Casos Válidos	339			

Tabela 13- Tabela cruzada resultado do teste x estilo de vida

		Estabulado	Estabulado com acesso ao paddock	A campo	Total	
Resultado do teste	Negativo	Contagem	175	27	19	221
		Contagem Esperada	166,2	28,7	26,1	221,0
		Resíduos ajustados	2,3	-,6	-2,5	
	Positivo	Contagem	80	17	21	118
		Contagem Esperada	88,8	15,3	13,9	118,0
		Resíduos ajustados	-2,3	,6	2,5	
Total	Contagem	255	44	40	339	
	Contagem Esperada	255,0	44,0	40,0	339,0	

Tabela 14- Teste qui-quadrado utilização de antiparasitários

	Valor	df	Significância Assintótica (Bilateral)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1 lado)
Qui-quadrado de Pearson	7,243 ^a	1	,007		
Correção de continuidade ^b	6,026	1	,014		
Razão de verossimilhança	6,826	1	,009		
Teste Exato de Fisher				,009	,008
Associação Linear por Linear	7,222	1	,007		
N de Casos Válidos	339				

Tabela 15- Tabela cruzada resultado do teste x utilização de antiparasitários

			Não	Sim	Total
Resultado do teste	Negativo	Contagem	8	213	221
		Contagem Esperada	13,7	207,3	221,0
		Resíduos ajustados	-2,7	2,7	
	Positivo	Contagem	13	105	118
		Contagem Esperada	7,3	110,7	118,0
		Resíduos ajustados	2,7	-2,7	
Total	Contagem	21	318	339	
	Contagem Esperada	21,0	318,0	339,0	

Tabela 16- Teste qui-quadrado princípio ativo do antiparasitário

	Valor	df	Significância Assintótica (Bilateral)
Qui-quadrado de Pearson	21,182 ^a	8	,007
Razão de verossimilhança	22,501	8	,004
Associação Linear por Linear	1,428	1	,232
N de Casos Válidos	318		

Tabela 17- Tabela cruzada resultado do teste x princípio ativo do antiparasitário

		Ivermectina	Ivermectin a+Praziquan tel	moxidectin a+praziqua ntel	Doramecti na	Noramectin a+deltametr ina	Febendaz ol	Ivermectin a+praziqua ntel+delta metrina	Total	
Resultado do teste	Negativo	Contagem	5	173	3	6	4	4	16	211
		Contagem Esperada	6.0	165.3	4.0	12.1	6.0	2.7	14.8	211.0
		Resíduos ajustados	-.8	2.2	-.9	-3.2	-1.5	1.4	.6	
	Positivo	Contagem	4	73	3	12	5	0	6	103
		Contagem Esperada	3.0	80.7	2.0	5.9	3.0	1.3	7.2	103.0
		Resíduos ajustados	.8	-2.2	.9	3.2	1.5	-1.4	-.6	
Total	Contagem	9	246	6	18	9	4	22	314	
	Contagem Esperada	9.0	246.0	6.0	18.0	9.0	4.0	22.0	314.0	

4. Mapa coroplético representativo da prevalência por NUTS II

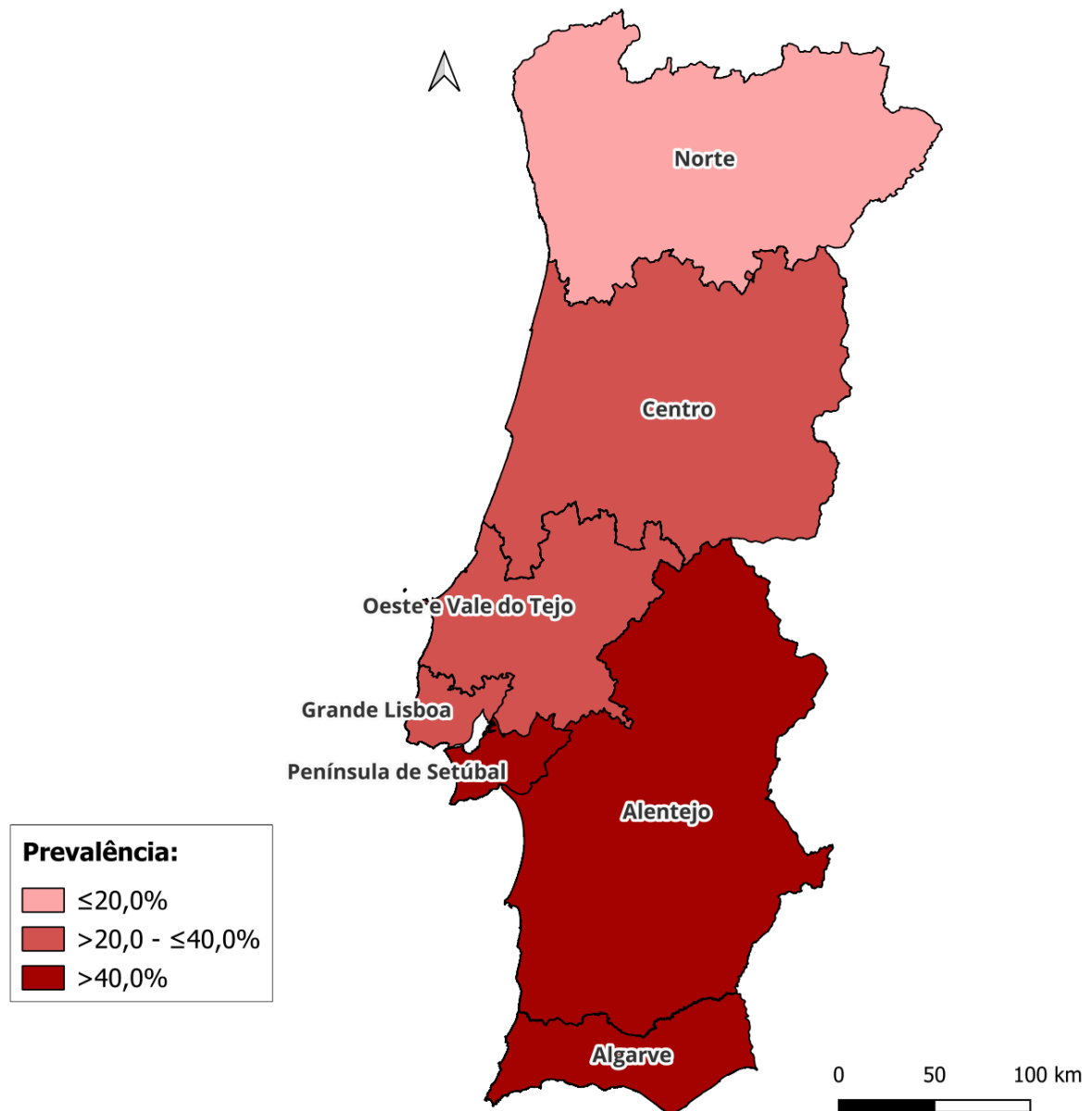


Figura 4- Mapa coroplético representativo da prevalência por NUTS II

5. Resultados da análise filogenética

Seq. ID	Query Length	Sequence	Query cover	Identity	E value	Blast result
AG7350	375	GGGGCTTGAAGTCTTGAATTGGAATGATGGGAATCTAAACCCCTTCCAGAGTATCAATTG GAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAACCT TGTTGCAGTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTGTTTCGTTGACTGCGCTTGGCGTTT GTCATCGTTGCGGCTTGGTTGGGTTTCGATTATTCGTTTCCCGGCGTTTACTTTGAGAAAA TTAGAGTGCCTGAAGCAGGCTTTTGCCTTGAATACTTTAGCATGGAATAACGGAGTAGGAC TTTGGTCTATTTTGGTGGTTTGGAGGCCAGAGTAATGGTTAATAGGAACAGTTGGGGGC ATTCGTATTT	100%	100%	0.0	<i>T. equi</i>
AG7351	303	GTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGcTCCAATAGCGIATATTAACCTTGTTCAGT TAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTGTTTCGTTGACTGCGTTTGGCGTTTGCATCGTT CGCGCTTGGTTGgGTTTCGATTATTCGTTTCCCGGCGTTTACTTTGAGAAAAATTAGAGTGC TTGAAGCAGGCTTTTGCCTTGAATACTTTAGCATGgAATAACGAAGTAGGACTTTGGTTCT ATTTTGTGGTTTTAGGAGCCAGAGTAATGGTTAATAGGAACAGTTGGGGGCATTGCGTA	100%	99,67%	2e-153	<i>T. equi</i>
AG7352	347	TCTTGAATTGGAATGATGGGAATTTAAACCCCTTCCAGAGTATCAATTGGAGGGCAAGT TGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAACCTTGTTCAGTTAA AAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTGCATCGTGATCGTCCcTGTGICiAGTGATCgTCGtgT GgGTTAGTTGgggCATGATTICATGACTCGAcGTTIACITTTGAAAAAATAAAGGGCTCAGCA GGCTTTTGCCTTGAATACTTTAACATGGAATAACGGAgGAAGACTTTGGITCTAATTTGGTGG TTTTAgGAGCCCGAAGIATGGGTAATAAGAACAGG	100%	96.84%	1e-160	<i>T. equi</i>
AG7353	356	CTTGAAGTCTTGAATTGGAATGATGGGAATTTAAACCCCTTCCAGAGTATCAATTGGAGG GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAACCTTGT GCAGTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTGCATCGTGGTTCTTCGCTATGTCGAGTGA TCTTCGTTGGGCTTAGTTGGGGCATGTTTTCATGACTCGACGTTTACTTTGAGAAAAATTA GAGTGCTTCAAGCAGGCTTTTGCCTTGAATACTTTAGCATGGAATAATGGAGTAGGACTTT GGTCTATTTTGGTGGTTTTAGGAGCCGAGTAAGGTTAATAGGAACAGTC	100%	100	0.0	<i>T. equi</i>
AG7340	356	CTTGAAGTCTTGAATTGGAATGATGGGAATTTAAACCCCTTCCAGAGTATCAATTGGAGG GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAACCTTGT GCAGTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTGCATCGTGGTTCTTCGCTATGTCGAGTGA TCTTCGTTGGGCTTAGTTGGGGCATGTTTTCATGACTCGACGTTTACTTTGAGAAAAATTA GAGTGCTTCAAGCAGGCTTTTGCCTTGAATACTTTAGCATGGAATAATGGAGTAGGACTTT GGTCTATTTTGGTGGTTTTAGGAGCCGAGTAATGGTTAATAGGAACAGTT	100%	100%	0.0	<i>T. equi</i>
AG7342	357	GGCTTGAAGTCTTGAATTGGAATGATGGGAATTTAAACCCCTTCCAGAGTATCAATTGGA GGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAACCTTGT TTGCAGTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTGCATCGTGGTTCTTCGCTATGTCGAGT CATCGTTGCGGCTTGGITGGGTTTCGATTATTCGTTTCCCGGCGTTTACTTTGAGAAAAATTA GAGTGCTTGAAGCAGGCTTTTGCCTTGAATACTTTAGCATGGAATAACGGAGTAGGACTTT GGTCTATTTTGGTGGTTTTAGGAGCCGAGTAATGGTTAATAGGAACAGTT	100%	100%	0.0	<i>T. equi</i>
AG7343	357	GCTTGAAGTCTTGAATTGGAATGATGGGAATTTAAACCCCTTCCAGAGTATCAATTGGAG GGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAACCTTGT TGCAGTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTGCATCGTGGTTCTTCGCTATGTCGAGT ATCTTCGTTGTGGCTTAGTTGGGGCATGTTTTCATGACTCGACGTTTACTTTGAGAAAAATTA AGAGTGCTTCAAGCAGGCTTTTGCCTTGAATACTTTAGCATGGAATAATGGAGTAGGACTT TGGTTCTATTTTGGTGGTTTTAGGAGCCGAGTAATGGTTAATAGGAACAGTT	100%	100%	0.0	<i>T. equi</i>
AG7345	360	TTGGAATGATGGGAATTTAAACCCCTTCCAGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC AGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAACCTTGTTCAGTTAAAAAGCTC GTAGTTGAATTTCTGCTGCATCGTGGTTCTTCGCTATGTCGAGTATCTTCGTTGTGGCTT AGTTGGGGCATGTTTTCATGACTCGACGTTTACTTTGAGAAAAATTAGAGTGCCTCAAGCAG GCTTTTGCCTTGAATACTTTAGCATGGAATAATGGAGTAGGACTTTGGTCTATTTTGGTGG TTTTAGGAGCCGAGTAATGGTTAATAGGAACAGTTGGGGGCATTGCGATTTAA	100%	100%	0.0	<i>T. equi</i>
AG7346	359	AATTGGAATGATGGGAATTTAAACCCCTTCCAGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGGCC AGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAACCTTGTTCAGTAAAAAGCTCG TAGTTGAATTTCTGCTGCATCGTGGTTCTTCGCTATGTCGAGTATCTTCGTTGTGGCTTA GTTGGGGCATGTTTTCATGACTCGACGTTTACTTTGAGAAAAATTAGAGTGCCTCAAGCAGG CTTTTGCCTTGAATACTTTAGCATGGAATAATGGAGTAGGACTTTGGTCTATTTTGGTGGT TTTTAGGAGCCGAGTAATGGTTAATAGGAACAGTTGGGGGCATTGCGATTTAA	100%	99,45%	0.0	<i>T. equi</i>
AG7347	376	GCTTGAAGTCTTGAATTGGAATGATGGGAATTTAAACCCCTTCCAGAGTATCAATTGGAG GGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAACCTTGT TGCAGTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTGCATCGTGGTTCTTCGCTATGTCGAGT ATCTTCGTTGTGGCTTAGTTGGGGCATGTTTTCATGACTCGACGTTTACTTTGAGAAAAATTA AGAGTGCTTCAAGCAGGCTTTTGCCTTGAATACTTTAGCATGGAATAATGGAGTAGGACTT TGGTTCTATTTTGGTGGTTTTAGGAGCCGAGTAATGGTTAATAGGAACAGTTGGGGGCAT TCGTATTTAA	100%	100%	0.0	<i>T. equi</i>

AG7349	377	GGCTTGAAGTCTTGAATTGGAATGATGGGAATTTAAACCCCTCCAGAGTATCAATTGGA GGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAACTTG TTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTGCATCGTGGTTCTTCGCTATGTCGAGT GATCTTCGTTGTGGCTTAGTTGGGGCATGTTTTCATGACTCGACGTTTACTTTGAGAAAAT TAGAGTGCCTCAAGCAGGCTTTTGCCTTGAATACTTTAGCATGGAATAATGGAGTAGGACT TTGGTCTATTTTGGTGGTTTTAGGAGCCGGAGTAATGGTTAATAGGAACAGTTGGGGGCA TTCGTAATTTAAA	100%	100%	0.0	<i>T. equi</i>
AG7330	375	CTTGAAGTCTTGAATTGGAATGATGGGAATTTAAACCCCTCCAGAGTATCAATTGGAGG GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAACTTGTT GCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTGTTTCGTTGACTGCGTTTGGCGTTTGCA TCGTTGCGGCTTGGTTGGTTTTCGATTATTCGTTTCCGGCGTTTACTTTGAGAAAATTAG AGTGCTTGAAGCAGGCTTTTGCCTTGAATACTTTAGCATGGAATAACGGAGTAGGACTTTG GTTCTATTTTGGTGGTTTTAGGAGCCAGAGTAATGGTTAATAGGAACAGTTGGGGGCAATC GTATTTAAA	100%	100%	0.0	<i>T. equi</i>
AG7331	368	CTTGAATTGGAATGATGGGAATTTAAACCCCTCCAGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCT GGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAACTTTGTCAGTTAA AAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTGCATCGTGGTTCTTCGCTATGTCGAGTATCTTCGTT GTGGCTTAGTTGGGGCATGTTTTCATGACTCGACGTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCTT CAAGCAGGCTTTTGCCTTGAATACTTTAGCATGGAATAATGGAGTAGGACTTTGGTTCTAT TTTGTGGTTTTAGGAGCCGGAGTAATGGTTAATAGGAACAGTTGGGGGCAATTCGATTAT AAA	100%	99,73%	0.0	<i>T. equi</i>
AG7332	381	TACGGGGCTTGAAGTCTTGAATTGGAATGATGGGAATCTAAACCCCTCCAGAGTATCAA TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAA ACTTGTTCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTGTTTCGTTGACTGCGCTTGGCG TTTGTTCATCGTTGCGGCTTGGTTGGTTTTCGATTATTCGTTTCCGGCGTTTACTTTGAGA AAATTAGAGTGCTTGAAGCAGGCTTTTGCCTTGAATACTTTAGCATGGAATAACGGAGTAG GACTTTGGTTCTATTTTGGTGGTTTTAGGAGCCAGAGTAATGGTTAATAGGAACAGTTGGG GGCATTTCGTAATTTAAA	99%	100%	0.0	<i>T. equi</i>
AG7333	374	TTGAAGTCTTGAATTGGAATGATGGGAATTTAAACCCCTCCAGAGTATCAATTGGAGGG CAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAACTTGTG CAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTGCATCGTGGTTCTTCGCTATGTCGAGTGAT CTTCGTTGTGGCTTAGTTGGGGCATGTTTTCATGACTCGACGTTTACTTTGAGAAAATTAG AGTGCTTCAAGCAGGCTTTTGCCTTGAATACTTTAGCATGGAATAATGGAGTAGGACTTTG GTTCTATTTTGGTGGTTTTAGGAGCCGGAGTAATGGTTAATAGGAACAGTTGGGGGCAATC GTATTTAAA	100%	100%	0.0	<i>T. equi</i>
AG7334	374	CTTGAAGTCTTGAATTGGAATGATGGGAATTTAAACCCCTCCAGAGTATCAATTGGAGG GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAACTTGTG GCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTGTTTCGTTGACTGCGTTTGGCGTTTGCA TCGTTGCGGCTTGGTTGGTTTTCGATTATTCGTTTCCGGCGTTTACTTTGAGAAAATTAG AGTGCTTGAAGCAGGCTTTTGCCTTGAATACTTTAGCATGGAATAACGGAGTAGGACTTTG GTTCTATTTTGGTGGTTTTAGGAGCCAGAGTAATGGTTAATAGGAACAGTTGGGGGCAATC GTATTTAAA	100%	100%	0.0	<i>T. equi</i>
AG7335	383	TACGGGGCTTGAAGTCTTGAATTGGAATGATGGGAATTTAAACCCCTCCAGAGTATCAA TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAA ACTTGTTCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTGCATCGTGGTTCTTCGCTATGT CGAGTGATCTTCGTTGGCTTAGTTGGGGCATGTTTTCATGACTCGACGTTTACTTTGAG AAAATTAGAGTGCTTCAAGCAGGCTTTTGCCTTGAATACTTTAGCATGGAATAATGGAGTA GGACTTTGGTTCTATTTTGGTGGTTTTAGGAGCCGGAGTAATGGTTAATAGGAACAGTTGG GGCATTTCGTAATTTAAA	100%	99,74%	0.0	<i>T. equi</i>
AG7336	376	CTTGAAGTCTTGAATTGGAATGATGGGAATTTAAACCCCTCCAGAGTATCAATTGGAGG GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAACTTGTG GCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTGCATCGTGGTTCTTCGCTATGTCGAGTGA TCTTCGTTGTGGCTTAGTTGGGGCATGTTTTCATGACTCGACGTTTACTTTGAGAAAATTA GAGTGCTTCAAGCAGGCTTTTGCCTTGAATACTTTAGCATGGAATAATGGAGTAGGACTTT GGTTCTATTTTGGTGGTTTTAGGAGCCGGAGTAATGGTTAATAGGAACAGTTGGGGGCAAT CGGTAATTTAAA	100%	99,73%	0.0	<i>T. equi</i>
AG7337	380	GGGGCTTGAAGTCTTGAATTGGAATGATGGGAATCTAAACCCCTCCAGAGTATCCAA TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAA ACTTGTTCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTGTTTCGTTGACTGCGTTTGGCG TTTGTTCATCGTTGCGGCTTGGTTGGTTTTCGATTATTCGTTTCCGGCGTTTACTTTGAGA AAATTAGAGTGCTTGAAGCAGGCTTTTGCCTTGAATACTTTAGCATGGAATAACGGAGTAG GACTTTGGTTCTATTTTGGTGGTTTTAGGAGCCAGAGTAATGGTTAATAGGAACAGTTGGG GGCATTTCGTAATTTAAA	99%	99,73%	0.0	<i>T. equi</i>
AG7316	376	GGCTTGAAGTCTTGAATTGGAATGATGGGAATTTAAACCCCTCCAGAGTATCAATTGGA GGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAACTTG	100%	100%	0.0	<i>T. equi</i>

		TTGCAGTTAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTGTTTCGTTGACTGCGTTTGGCGTTTGT CATCGTTGCGGCTTGGTTGGGTTTCGATTATTCGTTTCCCGCGTTTACTTTGAGAAAATT AGAGTGCTTGAAGCAGGCTTTTGCCTTGAATACTTTAGCATGGAATAACGGAGTAGGACTT TGGTTCTATTTTGGTTTGTAGGAGCCAGAGTAATGGTTAATAGGAACAGTTGGGGGCAT TCGTATTTAAA				
AG7317	367	TTGTAATTGGAATGATGGGAATTTAAACCCCTTCCAGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTG GTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAACCTTGTTCAGTTAAAA AGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTGCATCGTGGTCTTCGCTATGTCGAGTGATCTTCGTTGT GGCTTAGTTGGGGCATGTTTTCATGACTCGACGTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCTTCA AGCAGGCTTTTGCCTTGAATACTTTAGCATGGAATAATGGAGTAGGACTTTGTTCTATTT TGTTGGTTTGTAGGAGCCGAGTAATGGTTAATAGGAACAGTTGGGGGCATTCGTATTTAAA A	100%	100%	0.0	<i>T. equi</i>
AG7318	376	GCTTGAAGTCTTGAATTGGAATGATGGGAATTTAAACCCCTTCCAGAGTATCAATTGGAG GGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAACCTTGT TGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTGCATCGTGGTCTTCGCTATGTCGAGTG ATCTTCGTTGTGGCTTAGTTGGGGCATGTTTTCATGACTCGACGTTTACTTTGAGAAAATT AGAGTGCTTCAAGCAGGCTTTTGCCTTGAATACTTTAGCATGGAATAATGGAGTAGGACTT TGTTCTATTTTGGTTGGTTTGTAGGAGCCGAGTAATGGTTAATAGGAACAGTTGGGGGCAT TCGTATTTAAA	100%	100%	0.0	<i>T. equi</i>
AG7319	383	ATACGGGGCTTGAAGTCTTGAATTGGAATGATGGGAATTTAAACCCCTTCCAGAGTATCA ATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTA AACTTGTTCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTGCATCGTGGTCTTCGCTATG TCGAGTGATCTTCGTTGTGGCTTAGTTGGGGCATGTTTTCATGACTCGACGTTTACTTTGA GAAAATTAGAGTGCTTCAAGCAGGCTTTTGCCTTGAATACTTTAGCATGGAATAATGGAGT AGGACTTTGGTTCTATTTTGGTTGGTTTGTAGGAGCCGAGTAATGGTTAATAGGAACAGTTG GGGGCATTCGTATTTAAA	100%	100%	0.0	<i>T. equi</i>
AG7338	380	CGGGGCTTGAAGTCTTGAATTGGAATGATGGGAATTTAAACCCCTTCCAGAGTATCAATT GGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAC TTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTGCATCGTGGTCTTCGCTATGTCG AGTGATCTTCGTTGTGGCTTAGTTGGGGCATGTTTTCATGACTCGACGTTTACTTTGAGAA AATTAGAGTGCTTCAAGCAGGCTTTTGCCTTGAATACTTTAGCATGGAATAATGGAGTAGG ACTTTGGTTCTATTTTGGTTGGTTTGTAGGAGCCGAGTAATGGTTAATAGGAACAGTTGGGG GCATTTCGTATTTAAA	100%	100%	0.0	<i>T. equi</i>
AG7363	381	AACGGGGCTTGAAGTCTTGAATTGGAATGATGGGAATTTAAACCCCTTCCAGAGTATCAA TTGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTA ACTTTGTTCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTGTTTCGTTGACTGCGTTTGGCG TTTGCATCGTTGCGGCTTGGITGGGTTTCGATTATTCGTTTCCCGCGTTTACTTTGAGAA AATTAGAGTGCTTGAAGCAGGCTTTTGCCTTGAATACTTTAGCATGGAATAACGGAGTAGG ACTTTGGTTCTATTTTGGTTGGTTTGTAGGAGCCAGAGTAATGGTTAATAGGAACAGTTGGGG GCATTTCGTATTTAAA	100%	100%	0.0	<i>T. equi</i>
AG7365	354	TGATGGGAATTTAAACCCCTTCCAGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGC CGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAACCTTGTTCAGTTAAAAAGCTCGTAGTT GAATTTCTGCTGCATCGTGGTCTTCGCTATGTCGAGTGATCTTCGTTGTGGCTTAGTTGG GGCATGTTTTTCATGACTCGACGTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCTTCAAGCAGGCTTTT GCCTTGAATACTTTAGCATGGAATAATGGAGTAGGACTTTGTTCTATTTTGGTTTGTAG GAGCCGAGTAATGGTTAATAGGAACAGTTGGGGGCATTCGTATTTAAA	100%	100%	0.0	<i>T. equi</i>
AG7406	377	ACGGGGCTTGAAGTCTTGAATTGGAATGATGGGAATTTAAACCCCTTCCAGAGTATCAAT TGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTA CTTGTTCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTGCATCGTGGTCTTCGCTATGTC GAGTGATCTTCGTTGTGGCTTAGTTGGGGCATGTTTTTCATGACTCGACGTTTACTTTGAGA AAATTAGAGTGCTTCAAGCAGGCTTTTGCCTTGAATACTTTAGCATGGAATAATGGAGTAG GACTTTGGTTCTATTTTGGTTGGTTTGTAGGAGCCGAGTAATGGTTAATAGGAACAGTTGGG GGCATTTCGTATT	100%	100%	0.0	<i>T. equi</i>