

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE DNA E REALIZAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA O DIAGNÓSTICO DE *Theileria equi* E *Babesia caballi*

(COMPARATIVE STUDY OF DNA EXTRACTION TECHNIQUES AND ITS USE IN THE POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) FOR THE DIAGNOSIS OF *Theileria equi* AND *Babesia caballi*)

(ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE DNA Y REALIZACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA EL DIAGNÓSTICO DE *Theileria equi* Y *Babesia caballi*)

P. A. CANOLA*¹, R. OLIVEIRA², C. D. BALDANI³, R. Z. MACHADO⁴

RESUMO

A *Theileria equi* e a *Babesia caballi* são os agentes causadores da babesiose equina. É uma doença de caráter cosmopolita, transmitida por carrapatos, presente em áreas que abrigam 90% da população equina mundial. O diagnóstico da babesiose equina pode ser realizado, laboratorialmente, tanto na sua forma clínica como subclínica, por métodos diretos e indiretos. No presente estudo, foi avaliada a viabilidade de quatro métodos de extração de DNA (fenol-clorofórmio; método do CHELEX 100; DNAzol® BD Reagent e GFX Genomic Blood DNA Purification Kit), com a utilização de amostras de sangue controle. Adicionalmente, sangue de 25 animais aparentemente normais, provindos da região noroeste do estado de São Paulo foram testados para a presença de *T. equi* e *B. caballi* pelo método da PCR. O método do fenol-clorofórmio foi o mais eficiente na extração do DNA babesial. Não foi observado produto amplificado pela PCR em nenhum animal testado, entretanto, o método da PCR foi capaz de detectar DNA de *T. equi* e *B. caballi* em amostras de sangue controle.

PALAVRAS-CHAVE: Equino. *Theileria equi*. *Babesia caballi*. PCR

SUMMARY

Theileria equi and *Babesia caballi* are the causing agents of equine babesiosis. It is a cosmopolitan disease transmitted by ticks present in areas that range 90% of the world equine population. The diagnosis of equine babesiosis might be done laboratorially in its clinical and subclinical forms by direct and indirect methods. In this study the usefulness of four different methodologies of DNA extraction (phenol-chloroform method; CHELEX 100 method; DNAzol® BD Reagent and GFX Genomic Blood DNA Purification Kit) was evaluated using control blood samples. Additionally, blood from 25 apparently healthy horses from the northeast region of São Paulo State (Brazil) was examined for the presence of both *T. equi* and *B. caballi*. The phenol-chloroform method showed the best results in extracting babesial DNA. No PCR amplified product was observed in any of the animals tested, although the PCR system was able to detect *T. equi* and *B. caballi* DNA in control blood samples.

1 Pós-graduando do programa de Cirurgia Veterinária da FCAV-Unesp - Campus de Jaboticabal, SP. Alameda Zenon Vargas da Silva, 170. CEP. 14883-344. End.Eletrôn.: pacanola@yahoo.com.br

2 Médica Veterinária Autônoma

3 Pós-graduanda do programa de Clínica Veterinária da FCAV-Unesp - Campus de Jaboticabal, SP.

4 Prof^o. Titular do departamento de Patologia Veterinária da FCAV-Unesp - Campus de Jaboticabal, SP.

KEY WORDS: Equine. Theileria equi. Babesia caballi. PCR.

RESUMEN

La *Theileria equi* y la *Babesia caballi* son los agentes responsables por la babesiosis en los equinos. Esta es una afección de carácter mundial, transmitida por las garrapatas presentes en las regiones que abrigan al 90% de la población mundial de caballos. El diagnóstico de la babesiosis equina puede ser hecho laboratorialmente, tanto en su forma clínica como en la subclínica, por métodos directos e indirectos. En este estudio fue evaluada la viabilidad de cuatro métodos de extracción de DNA (método del fenol-cloroformo; método del CHELEX 100; DNAzol® BD Reagent y GFX Genomic Blood DNA Purification Kit) con la utilización de muestras de sangre control. Adicionalmente, muestras de sangre de 25 animales, aparentemente normales provenientes de la región Noroeste del estado de São Paulo, fueron examinadas para detectar *T. equi* y *B. caballi* por el método de PCR. El método del fenol-cloroformo presentó los mejores resultados en la extracción de DNA babesial. No fue observado producto en la amplificación por la PCR en ningún animal testado, mientras que el método de la PCR fue capaz de detectar DNA de *T. equi* y *B. caballi* en muestras de sangre control.

PALABRAS-CLAVE: Equino. Theileria equi. Babesia caballi. PCR.

INTRODUÇÃO

A *Theileria equi*, recentemente redescrita por Mehlhorn e Schein (1998) e *Babesia caballi* são dois protozoários intra-eritrocíticos relacionadas com a babesiose equina, inicialmente descritos por Ristic (1988). Essa doença provoca anemia, febre, hepato e esplenomegalia, hemoglobinúria e bilirrubinúria devido à eritrólise causada no hospedeiro, principalmente pela *T. equi*. Os animais infectados, em sua maioria, tornam-se portadores e fonte de infecção por um longo período (DE WAAL, 1992). A babesiose equina é também conhecida como febre biliar, piroplasmose, malária equina e nutaliose (FRIEDHOFF et al., 1990).

Os locais de incidência da doença estão relacionados às áreas de maior concentração dos seus vetores, os carrapatos dos gêneros *Dermacentor*, *Hyalomma* e *Rhipicephalus* (HENNING, 1956, FRIEDHOFF, 1988), sendo a espécie *Dermacentor nitens* um vetor significante da *B. caballi* (PFEIFER BARBOSA et al., 1995). Stiller e Coan (1995) descreveram o carrapato da espécie *Boophilus microplus* como responsável pela transmissão da *T. equi* na Europa e Rússia. No Brasil, Guimarães et al. (1998) concluíram que o carrapato pode funcionar como vetor natural da *T. equi*. Num âmbito mundial, quatorze espécies de carrapatos foram relatadas como transmissoras da *T. equi* e/ou *B. caballi* (STAILER et al., 1980, DE WAAL e POTGIETER, 1987, DE WAAL, 1990).

O mecanismo patogênico através do qual o agente afeta seu hospedeiro vertebrado varia de acordo com a espécie do parasito (WRIGHT e GOODGER, 1988). Na *B. caballi*, a maioria das alterações anatomopatológicas é provocada pela estase de hemácias em capilares e em pequenos vasos, resultando na disfunção de diferentes

órgãos (HOLBROOK, 1969). As lesões observadas na infecção pela *T. equi* decorrem de uma excessiva lise das hemácias, provocada pela rápida multiplicação dos parasitos e a morte é devido à anóxia anêmica (HOLBROOK, 1969).

A babesiose equina é considerada hoje, no mundo inteiro, como o principal impedimento para o trânsito internacional de equinos, seja para exportação de animais, seja para participação em esportes equestres (VAN HEERDEN, 1996). Estima-se que somente 10% da população equina mundial habitam áreas livres da doença, as quais, por sua vez, possuem uma indústria equina muito significativa e importante (DE WAAL, 1992). Tal é o fato que existem pesadas restrições, por parte de países livres dessa parasitose, para as importações de equídeos, gerando limitações aos programas de melhoramento genético e difusão de novas raças. Somente equinos sorologicamente negativos para *T. equi* e *B. caballi* podem entrar nessas áreas livres (WEILAND, 1986).

O diagnóstico da babesiose equina pode ser realizado, tanto na sua forma clínica como subclínica e laboratorialmente por métodos diretos e indiretos. A pesquisa parasitológica direta, realizada por meio de esfregaços sanguíneos, constitui-se no método mais antigo e rotineiramente utilizado para o diagnóstico de hemoparasitos. Entretanto, nos casos subagudos ou crônicos, em que há baixa parasitemia, encontrar o parasito pode ser difícil, o qual pode ser facilmente confundido com um artefato, de tal forma que a sensibilidade é baixa e resultados falso-negativos são comuns (BOSE et al., 1995). O primeiro teste sorológico aplicado para detecção de anticorpos anti-*Babesia* em equinos foi a reação de fixação de complemento (RFC), que, desde 1969, tem sido considerado o teste oficial para o diagnóstico da piroplasmose

equina (BRUNING, 1996). Entretanto, esse método não detecta infecções crônicas e pode apresentar resultados falso-positivos e falso-negativos, por não discriminar claramente entre animais negativos e animais portadores (FRIEDHOFF, 1988, BRUNING, 1996). Outro método sorológico que vem ganhando destaque no diagnóstico da babesiose equina é o ensaio imunoenzimático (ELISA), que pode ser uma alternativa para a detecção da babesiose aguda e latente (BRUNING, 1996), principalmente com a utilização de antígenos recombinantes (XUAN et al., 2001, HIRATA et al., 2002, HIRATA et al., 2003).

Atualmente, com a introdução da biologia molecular na detecção e caracterização de agentes patogênicos e, principalmente, com a introdução das técnicas da reação em cadeia da polimerase (PCR) e de hibridização de ácidos nucleicos (sondas moleculares), alguns trabalhos vêm sendo desenvolvidos no sentido de adaptá-las ao diagnóstico da *T. equi* e *B. caballi* (FIGUEROA et al., 1993, BASHIRUDDIN et al., 1999, NICOLAIWSKY et al., 2001). Os resultados demonstram que a PCR é uma técnica de rápido diagnóstico e o seu procedimento é suficientemente sensível, específico e reproduzível para uso na confirmação do diagnóstico clínico da babesiose.

Tendo em vista a necessidade de se desenvolver testes altamente sensíveis, específicos e eficientes para a detecção dos agentes da piroplasmose equina, com este estudo, objetivou-se comparar quatro metodologias distintas de extração de DNA e avaliar suas eficiências na técnica da PCR para o diagnóstico direto de *T. equi* e *B. caballi*. Adicionalmente, buscou-se avaliar a utilização desta técnica a campo em equinos da região nordeste do estado de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Amostras controle de *Theileria equi* e *Babesia caballi*

Para a realização da reação em cadeia da polimerase, utilizaram-se amostras de sangue provenientes de animais naturalmente infectados por *T. equi* e *B. caballi* isoladas em 1994 e 1999 respectivamente, as quais se encontravam criopreservadas em DMSO a 10%.

AMOSTRAS DE SANGUE DE EQUINOS A CAMPO

Foram utilizados um total de 25 equinos, machos e fêmeas, sem raça definida, sendo 13 amostras provenientes de uma fazenda localizada no município de São Carlos, região nordeste do estado de São Paulo, e 12 amostras provenientes do Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal.

Por punção da veia jugular, foram colhidos cerca

de 5 mL de sangue com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) na proporção de 1mg/mL de sangue. As amostras foram acondicionadas em microtubos e mantidas refrigeradas a -70 ° C até sua utilização na PCR.

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O protocolo utilizado foi descrito por Bashiruddin et al. (1999) para isolamento de DNA de *T. equi* e *B. caballi*, com algumas modificações, conforme descrito a seguir.

EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL

A fim de avaliar a interferência do processo de extração de DNA na PCR, foram realizadas quatro metodologias distintas: Método do fenol-clorofórmio (BASHIRUDDIN et al., 1999); Método do CHELEX 100 (WALSH et al., 1991); DNAzol® BD Reagent¹ e GFX Genomic Blood DNA Purification Kit², de acordo com as recomendações do fabricante.

REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO

As reações de amplificação foram conduzidas em um volume total de 50 µL, utilizando-se 1 µL de cada amostra de DNA (160 ng), juntamente com 5 µL do tampão da enzima (200 mM TRis-HCl, pH 8,4 e 500 mM KCl), 1,5mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 µM de cada *primer* e 1,0 unidade de Taq DNA polimerase (Platinum® - Invitrogen, nº 10966-018), completando-se o volume com água destilada ultrapura.

As condições de amplificação para *T. equi* compreenderam desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 64°C durante 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Para a *B. caballi*, os ciclos de amplificação foram alterados para 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Em ambas as reações, os ciclos foram finalizados pela adição de um período de extensão de 5 minutos a 72° C. As reações foram processadas em um termociclador³.

Foram utilizados como “primers” os oligonucleotídeos BEQF e BEQR para *T. equi* e BACF e BACR para a *B. caballi*, conforme descrito a seguir.

1 Gibco BRL

2 Amersham Pharmacia Biotech Inc.

3 Techne Genius

PARASITA	PRIMER	SEQUÊNCIA (5'-3')	PRODUTO (pb)
<i>Theileria equi</i>	BEQF	CATCGTTGCGGCTTGGTTGG	664
	BEQR	CCAAGTCTCACACCCTATTT	
<i>Babesia caballi</i>	BCAF	TTCGCTTCGCTTTTTGTTTTACT	659
	BCAR	GTCCCTCTAAGAAGCAAACCCAA	

ELETROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE

As preparações de DNA amplificadas foram submetidas à eletroforese horizontal, em gel de agarose 2%, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo, em tampão de corrida Tris-borato-EDTA (TBE). Um volume de 10 µL de cada amostra, acrescido de 2 µL de tampão de amostra (glicerol 40%, azul de bromofenol 0,02%), foi aplicado no gel. A corrida eletroforética foi realizada a 50V/100mA durante 90 minutos e, para a determinação do tamanho dos produtos amplificados, foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base (100pb ladder⁴). Os produtos da PCR foram visualizados e fotografados em transiluminador de luz ultravioleta, acoplado a um analisador de imagens⁵.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em virtude de pesadas restrições no trânsito internacional e da limitação na participação nos esportes equestres de animais infectados, o desenvolvimento de métodos diagnósticos mais específicos e sensíveis para a babesiose equina, principalmente no Brasil, onde a doença ocorre de forma endêmica, é de fundamental importância.

No presente estudo foram avaliadas quatro metodologias distintas de extração de DNA, empregando-se amostras de sangue controle de *T. equi* e *B. caballi*. Não foi observada a presença de DNA em nenhuma das amostras controle após a realização do método de extração de DNA pelo CHELEX 100 (Figura 1). Porém, ao amplificar o DNA das duas espécies, observaram-se evidências de produtos amplificados, sendo maior para *T. equi* (Figura 2). Por outro lado, quando da extração de DNA empregou-se o kit DNAzol®, bons resultados foram obtidos para *T. equi*. Entretanto, para *B. caballi* nenhum produto de amplificação foi observado (Figura 2). Da mesma forma, nenhum produto de amplificação nos materiais extraídos pelo método do DNAzol® foi observado (Figura 3). Acredita-se que isto possa estar relacionado ao fato de que ao final do processo de extração de DNA, certa quantidade de hemoglobina encontrava-se misturada ao

material genético, inibindo desta forma a ação da enzima taq polimerase (LOPAREV et al., 1991).

Quanto à sensibilidade do ensaio, melhor resultado foi obtido quando o DNA foi extraído pelo método do fenol-clorofórmio, fato evidenciado pela presença de bandas mais intensas de DNA, indicando uma maior presença de material genético (Figuras 1 e 2). Assim, a extração de DNA pelo fenol-clorofórmio pode ser utilizada com segurança nos ensaios da PCR, reduzindo-se, dessa forma, os custos da técnica, principalmente no que se refere à aquisição de kits de extração de DNA. Posnett et al. (1991) relatam que a extração de DNA pelo fenol pode acarretar em perda de DNA e, conseqüentemente, em resultados falso-negativos, e sugerem o armazenamento de amostras a 4°C para influenciar no êxito da PCR, uma vez que as várias etapas de lavagem do sangue poderiam acarretar na eliminação de parasitos extracelulares. No entanto, parece não ser o caso deste estudo, em que as amostras foram rapidamente armazenadas a -70°C e as amostras controle apresentaram resultados positivos.

Foram utilizados como *primers* os oligonucleotídeos BEQF/BEQR e BCAF/BCAR, os quais codificam para a sequência de DNA da região 16S do rRNA de *T. equi* e *B. caballi* e flanqueiam um fragmento espécie-específico de 664pb e 659pb, respectivamente. A identificação das amostras amplificadas, posicionadas no gel de agarose, deve ser cautelosa, pois, devido à proximidade entre os pesos moleculares dos produtos (664pb e 659pb para *T. equi* e *B. caballi* respectivamente) os resultados e o diagnóstico do agente podem ser interpretados erroneamente.

A presença de bandas inespecíficas, observada em algumas amostras em que o DNA foi submetido à amplificação para *T. equi* e *B. caballi*, pode ser atribuída à atividade da enzima taqui polimerase ou mesmo à excessiva quantidade de DNA utilizada nas reações de amplificação. Nicolaiewsky et al. (2001), ao realizarem ensaios para avaliação da sensibilidade do “nested” PCR para a detecção de *T. equi*, também observaram a presença de bandas inespecíficas em altas concentrações de DNA parasitário, que iam desaparecendo conforme a quantidade de DNA reduzia.

Todos os animais testados apresentaram resultados negativos para a detecção de *T. equi* e *B. caballi*. No entanto, produtos de amplificação espécie-específicos foram detectados nos controles positivos da PCR, demonstrando

4 Invitrogen

5 Eagle Eye II, Stratagene

que tanto o processo de extração quanto as condições de amplificação estavam adequadas para *T. equi*, validando, portanto, os resultados obtidos no presente estudo. Adicionalmente, todas as amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro e todas apresentaram DNA extraído. Deve-se levar em conta nesse resultado, primeiramente o fato de os animais serem aparentemente saudáveis, não manifestando nenhum sinal clínico característico de babesiose e ainda nunca terem sido tratados contra esse tipo de parasitose e, em segundo lugar, a possibilidade de os animais serem portadores assintomáticos, tanto da *T. equi* quanto da *B. caballi*, apresentando uma parasitemia em níveis abaixo dos detectados por este protocolo de PCR. Bashiruddin et al. (1999) demonstraram que este sistema de PCR é capaz de detectar DNA de *T. equi* em sangue de equino naturalmente infectado com parasitemia equivalente a 0,000083%. Entretanto, somente detectou-se de DNA de *T. equi* e *B. caballi* nos equinos a campo de animais que eram positivos na detecção direta por esfregaço sanguíneo. Adicionalmente, a sensibilidade deste teste para a detecção da *T. equi* é maior do que a observada para *B. caballi* (BASHIRUDDIN et al., 1999).

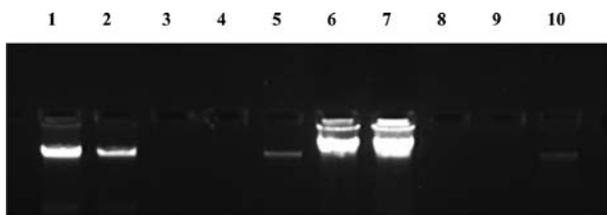


FIGURA 1 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos da extração de DNA de *Theileria equi* (linhas 1-5) e *Babesia caballi* (linhas 6-10) obtidos pelos seguintes métodos de extração: fenol-clorofórmio, CHELEX 100 e DNAzol®, a partir de sangue controle. Linhas 1 e 6, DNA extraído com fenol-clorofórmio em 200µL de sangue; Linhas 2 e 7, DNA extraído com fenol-clorofórmio em 500µL de sangue; Linhas 3 e 8, DNA extraído com CHELEX 100 em 200µL de sangue; Linhas 4 e 9, DNA extraído com CHELEX 100 em 500µL de sangue; Linhas 5 e 10, DNA extraído com DNAzol® em 200µL de sangue.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21

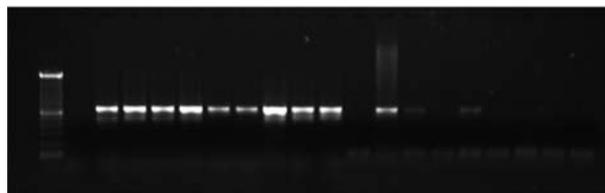


FIGURA 2 – Eletroforese em gel de agarose de produtos amplificados pela técnica da PCR a partir dos DNA de *Theileria equi* e *Babesia caballi* extraídos de sangue controle. Linha 1, Marcador de peso molecular (100bp DNA ladder); Linha 2, Controle negativo (água); Linha 3, DNA de *T. equi* (extração com fenol-clorofórmio) não diluído; Linha 4, 1:50; Linha 5, 1:100; Linha 6, DNA de *T. equi* (extração com CHELEX 100) não diluído; Linha 7, 1:50; Linha 8, 1:100; Linha 9, DNA de *T. equi* (extração com DNAzol®) não diluído; Linha 10, 1:50; Linha 11, 1:100; Linha 12, Controle negativo (água); Linha 13, DNA de *B. caballi* (extração com fenol-clorofórmio) não diluído; Linha 14, 1:50; Linha 15, 1:100; Linha 16, DNA de *B. caballi* (extração com CHELEX 100) não diluído; Linha 17, 1:50; Linha 18, 1:100; Linha 19, DNA de *B. caballi* (extração com DNAzol®) não diluído; Linha 20, 1:50; Linha 21, 1:100.

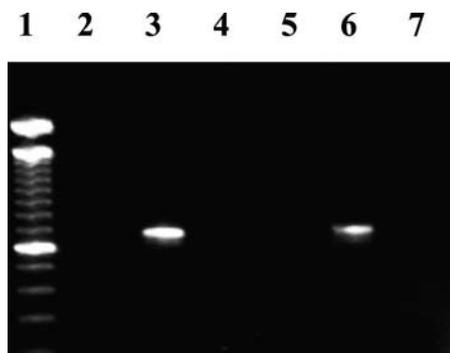


FIGURA 3 – Eletroforese em gel de agarose de produtos amplificados pela técnica da PCR a partir de DNA extraído de sangue controle. Linha 1, Marcador de peso molecular (100bp DNA ladder); Linha 2, Controle negativo (água); Linha 3, DNA de *T. equi* (extração com fenol-clorofórmio); Linha 4, DNA de *B. equi* extração com DNAzol®; Linha 5, Amostra de sangue proveniente do Hospital Veterinário da UNESP de Jaboticabal (extração com DNAzol®); Linha 6, DNA de *T. equi* (extração com o kit GFX); Linha 7, Amostra de sangue proveniente do Hospital Veterinário da UNESP de Jaboticabal (extração com o kit GFX).

CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo demonstram que tanto os protocolos de amplificação para *T. equi* e *B. caballi* quanto a metodologia utilizada na eletroforese em gel de agarose são adequados para o diagnóstico da babesiose equina. Adicionalmente, verificou-se que a metodologia de extração de DNA pelo fenol-clorofórmio é bastante vantajosa em relação aos kits de extração. A reação em cadeia da polimerase (PCR) mostrou ser realmente um teste inovador e muito eficiente para o diagnóstico da babesiose equina, devendo ser realizada com muito critério, desde a extração do DNA até a realização da PCR, pois os materiais podem ser facilmente contaminados, prejudicando assim os resultados do teste.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo financiamento do projeto (Processo FAPESP nº – 00/08955-0).

ARTIGO RECEBIDO: Junho/2006
APROVADO: Fevereiro/2007

REFERÊNCIAS

- BASHIRUDDIN, J. B., CAMMA, C., REBÊLO, E. Molecular detection of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horse blood by PCR amplification of part of the 16S rRNA gene. **Veterinary Parasitology** v.84, p.75-83, 1999.
- BOSE, R., JORGENSEN, W. K., DALGLIESH, R. J., FRIEDHOFF, K. T., DE VOS, A. J. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Veterinary Parasitology** v.57, p.61-74, 1995.
- BRUNING, A. Equine piroplasmosis an update on diagnosis, treatment and prevention. **Braslian Veterinary Journal**. v.152, 2, p.139-51, 1996.
- DE WAAL, D. T., POTGIER, F. T. The transtadial transmission of *Babesia caballi* by *Rhipicephalus evertsi evertsi*. Onderstepoort. **Journal of Veterinary Research**, v.54, p.561-8, 1987.
- DE WAAL, D. T. The transovarial transmission of *Babesia caballi* by *Hyalomma truncatum*. Onderstepoort. **Journal of Veterinary Research**, v.57, p.99-100, 1990.
- DE WAAL, D. T. Equine piroplasmosis: a review. **Braslian Veterinary Journal**. n.148, p.6-14, 1992.
- FIGUEROA, J. V., CHIEVES, L. P., JOHNSON, G. S., BUENING, G. M. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. **Veterinary Parasitology**, v.50, p.69-81, 1993.
- FRIEDHOFF, K. T. Transmission of *Babesia*. In: RISTIC, M. **Babesiosis of domestic animals and man**. Florida: C.R.C. Press, 1988. p.23-52.
- FRIEDHOFF, K. T., TENTER, A. M., MULLER, I. Haemoparasites of equines: impact on international trade of horses. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v.9, n.4, p.1187-1194, 1990.
- GUIMARÃES, A. M., LIMA, J. D., RIBEIRO, M. F., CAMARGOS, E. R., BOZZI, I. A. Ultrastructure of sporogony in *Babesia equi* in salivary glands of adult female *Boophilus microplus* ticks. **Parasitology Research**. v.84(1), p.69-74, 1998.
- HENNING, M. W. Biliary fever in horses (equine piroplasmosis). In. **Animal diseases in South Africa**. 3rd ed. South Africa: University of Pretoria, 1956. p.461-74, 1956.
- HIRATA, H. IKADAI, H., YOKOYAMA, N., XUAN, X., FUJISAKI, K., SUZUKI, N., MIKAMI, T., IGARASHI I. Cloning of a truncated *Babesia equi* gene encoding an 82-kilodalton protein and its potential use in an enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.4, p.1470-1474, 2002.
- HIRATA, H. XUAN, X., YOKOYAMA, N., NISHIKAWA, Y., FUJISAKI, K., SUZUKI, N., IGARASHI, I. Identification of a specific antigenic region of the P82 protein of *Babesia equi* and its potential use in serodiagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.2, p.547-551, 2003.
- HOLBROOK, A. A. Biology of equine piroplasmose. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.155, p.453-61, 1969.
- LOPAREV, V. N., CARTAS, M. A., MONKEN, C. E., VELPANDI, A., SRINIVASAN, A. An efficient and simple method of DNA extraction from whole blood and cell lines to identify infectious agents. **Journal of Virological Methods**, v.34, n.1, p.105-112, 1991.
- MEHLHORN, H., SCHEIN, E. Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein 1998. **Parasitology Research**, v.84, n.6, p. 467-475, 1998.
- NICOLAIEWSKY, T.B. RICHTER, M. F., LUNGE, V. R.,

CUNHA, C. W., DELAGOSTIN, O., IKUTA, N., FONSECA, A. S., da SILVA, S. S., OZAKI, L. S. Detection of *Babesia equi* (Laveran, 1901) by nested polymerase chain reaction. **Veterinary Parasitology**, v.101, n.1, p.9-21, 2001.

PFEIFER BARBOSA, I., BOSE, R., PEYMANN, B., FRIEDHOFF, K. T. Epidemiological aspects of equine babesiosis in a herd of horses in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.58(1-2), p.1-8, 1995.

POSNETT, E. S., FEHRSEN, J., DE WAAL, D. T., AMBROSIO, R. E. Detection of *Babesia equi* in infected horses and carrier animals using a DNA probe. **Veterinary Parasitology**, v.39, n.1-2, p.19-32, 1991.

RISTIC, M. **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Ration: C.R.C. Press, 1988. p. 198-208.

STAILER, D., FRIERICHS, W. M., LEATCH, G., KUTTLER, K. L. Transmission of equine babesiosis and bovine anaplasmosis by *Democentor albipiotus* (Packard) (Acari: Ixodidae). **Journal of the New York. Etmotological Society**, v.88, p.75, 1980.

STILLER, D., COAN, M. E. Recent developments in elucidating tick vector relationships for anaplasmosis and equine piroplasmosis. **Veterinary Parasitology**, v.57, p.97-108, 1995.

VAN HEERDEN, J. Equine babesiosis in South Africa: a report of two cases. **Equine Veterinary Education**, v.8, n.1, p.3-5, 1996.

XUAN, X. NAGAI, A., BATTSETSEG, B., FUKUMOTO, S., MAKALA, L. H., INOUE, N., IGARASHI, I., MIKAMI, T., FUJISAKI, K. Diagnosis of equine piroplasmosis in Brazil by serodiagnostic methods with recombinant antigens. **Jounal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v.63, n.10, p.1159-1160, 2001.

WALSH, P.S., METZGER, D.A., HIGUCHI, R. CHELEX 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. **Biotechniques**, v.10, p.506-13, 1991.

WEILAND, G. Species-specific serodiagnosis of equine piroplasma infections by means of complement fixation test (CFT), immunofluorescence (IIF), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Veterinary Parasitology**, v.20, n.1-3, p.43-48, 1986.

WRIGHT, I. G., GOODGER, B. V. Pathogenesis of Babesiosis. In: RISTIC, M. **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Ration: C.R.C. Press, 1988. p. 99-118.