

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

TESE

**Agentes da Theileriose e da Anaplasmosse
Granulocítica em Equídeos de Microrregiões do
Estado do Rio De Janeiro**

Tiago Marques dos Santos

2011



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AGENTES DA THEILERIOSE E DA ANAPLASMOSE GRANULOCÍTICA
EM EQUÍDEOS DE MICRORREGIÕES DO ESTADO DO RIO DE
JANEIRO**

TIAGO MARQUES DOS SANTOS

Sob a Orientação do Professor
Carlos Luiz Massard

e Co-orientação do Professor
Fernando Queiroz de Almeida

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em**
Ciências, no Curso de Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias, Área de
Concentração em Sanidade Animal

Seropédica, RJ
Março de 2011

636.1089

S237a

T

Santos, Tiago Marques dos, 1979-.
Agentes da theileriose e da
anaplasmosse granulocítica em
equídeos de microrregiões do estado
do Rio de Janeiro / Tiago Marques dos
Santos - 2011.

90 f.: il.

Orientador: Carlos Luiz Massard.

Tese (doutorado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro,
Curso de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias.

Inclui bibliografia.

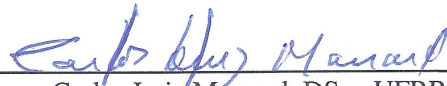
1. Eqüídeo - Doenças - Teses. 2.
Theileriose - Teses. 3. Theileriose
- Diagnóstico - Teses. I. Massard,
Carlos Luiz, 1947-. II.
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro. Curso de Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias. III.
Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

TIAGO MARQUES DOS SANTOS

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências no
Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Sanidade Animal.

TESE APROVADA EM 01 / 03 / 2011

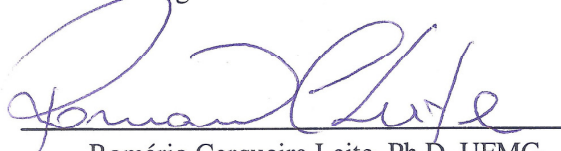


Carlos Luiz Massard. DS.c. UFRRJ

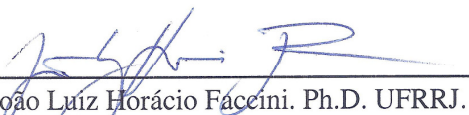
(Orientador)



Guido Fontgalland Coelho Linhares Ph.D. UFG.



Romário Cerqueira Leite. Ph.D. UFMG.



João Luiz Horácio Faccini. Ph.D. UFRRJ.



Cristianc Divan Baldani. DS.c. UNESP.

DEDICATÓRIA

Dedico esta obra

À Deus, que me proporcionou a vida;

Aos meus pais, Luis Antônio dos Santos e Eva Marques Pedrosa dos Santos, pela dedicação, amor, carinho, apoio e atenção que tiveram comigo em todos os momentos da minha vida;

Aos meus irmãos, André Marques dos Santos e Luiz Antônio dos Santos Junior, que me apoiaram em todos os momentos;

A minha linda e maravilhosa esposa, Eliana de Souza Marques dos Santos, por estar junto comigo em todos os momentos desta caminhada;

E aos meus amigos, que de muitas formas, contribuíram diretamente e indiretamente para que eu pudesse chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), pelo conhecimento adquirido nessa instituição durante a graduação e mestrado, o qual me auxiliou na aprovação no Doutorado do Curso Pós-graduação em Ciências Veterinária (CPGCV).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pela concessão da bolsa de estudos, que foi fundamental nesta jornada.

Ao Professor, orientador e amigo, Dr. Carlos Luiz Massard, pelos ensinamentos, apoio, incentivos, conselhos e pela convivência durante esses quatro anos.

Ao Professor, co-orientador e amigo, Dr. Fernando Queiroz de Almeida, pelo apoio oferecido durante esses quatro anos.

A Professora Dr. Cristiane Divan Baldani, pelo apoio durante as análises laboratoriais e finalização da tese e pela amizade durante a realização do doutorado.

Ao Professor Dr. Leandro Azevedo Santos, pelo apoio em ceder o Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas para execução de parte das análises e pela ótima convivência.

Aos Professores da UFRRJ, que contribuíram para minha formação tanto profissional quanto de cidadão.

Aos companheiros da equipe de trabalho e amigos, Erica Cristina Rocha Roier, Huarrisson Azevedo Santos, Marcus Sandes Pires, Joice Aparecida Rezende Vilela, Usha Vshist, Aline Falqueto Duarte, Claudia Bezerra da Silva, Larissa Martins de Brito Moraes, Antonio Amélia dos Santos Mucalane Tembue, Diogo Cruz Camarinha, Andressa Guimarães, José Eduardo Dias, Marcos Pinheiro Franque, Priscilla Barbosa Andery, Juliana Macedo Raimundo, pelo precioso tempo de convivência e dedicação na realização deste trabalho.

Aos amigos do CPGCV e do Alojamento da Pós-Graduação da UFRRJ, pelos bons tempos de convivência e de aprendizado.

Às pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

A TODOS VOCÊS, MUITO OBRIGADO!!!!!!!!!!

BIOGRAFIA

Tiago Marques dos Santos, nasceu em Ituiutaba/MG no dia 09 de julho de 1979. É filho de Luis Antônio dos Santos e Eva Marques Pedrosa dos Santos. Entre os anos de 1987 a 1990, estudou na Escola Municipal de 1º Grau Monteiro Lobato, município de Pontes e Lacerda/MT, na qual cursou até a 4ª série. Em 1991, estudou na Escola XV de Abril, na cidade de Pontes e Lacerda/MT, onde concluiu o 1º grau no ano de 1993. Em 1994, iniciou o curso Técnico em Agropecuária na Escola Agrotécnica Federal de Cáceres, Cáceres/MT, concluindo o curso em 1996.

Em março de 1999, iniciou o curso de Zootecnia na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Em 2000, transferiu-se para o Curso de Medicina Veterinária na mesma universidade. Durante a graduação, foi bolsista de Iniciação Científica da UFRRJ, FAPERJ e do CNPq de 2000 a 2005, sob orientação do professores Dr. Fernando Queiroz de Almeida e Dr. Carlos Luiz Massard. Em 2005, concluiu a graduação em Medicina Veterinária pela UFRRJ.

Em 2005, iniciou o Mestrado em Ciências Veterinárias pela UFRRJ, sob a orientação do professor Dr. Fernando Queiroz de Almeida. Em fevereiro de 2007, concluiu o Mestrado e ingressou no Doutorado pelo CPGCV da UFRRJ, sob a orientação do professor Dr. Carlos Luiz Massard. Durante o doutorado, foi bolsista da CAPES nos dois primeiros anos do curso. A partir daí, foi contemplado com a Bolsa Nota 10 da FAPERJ.

Em março de 2009, foi aprovado em Concurso Público de Provas e Títulos para Professor Substituto no curso de Medicina Veterinária da UFRRJ na área de Patologia Clínica e Terapêutica Clínica, exercendo até dezembro de 2010. Como Professor Substituto ministrou a disciplina de Terapêutica Clínica e auxiliou nas disciplinas de Patologia Clínica, Clínica Médica I e Obstetrícia, do Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária da UFRRJ.

Desde a graduação até o presente momento, publicou artigos científicos em revistas, participou de eventos científicos, nos quais apresentou e publicou resumos em anais dos eventos. Participa ativamente nos Grupo de Pesquisa “Diagnóstico, Epidemiologia e Caracterização de Hemoparasitoses, Hemoparasitos e Seus Vetores Relacionados a Animais Domésticos no Estado do Rio de Janeiro”, sob coordenação do professor Dr. Carlos Luiz Massard e do grupo “Produção e Saúde dos Equinos”, sob coordenação do professor Dr. Fernando Queiroz de Almeida. Atua na área de Sanidade Animal, com ênfase em doenças parasitárias e seus vetores e também em nutrição clínica.

RESUMO GERAL

SANTOS, Tiago Marques dos. **Agentes da theileriose e da anaplasmosse granulocítica em equídeos de microrregiões do estado do Rio de Janeiro**. 2011. 90p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

Este trabalho foi realizado nas microrregiões de Itaguaí e Serrana no estado do Rio de Janeiro para estudar os agentes da theileriose e da anaplasmosse granulocítica equina. Amostras de soro e sangue foram submetidas à reação de imunofluorescência indireta (RIFI), reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) e a análise hematológica. A prevalência geral para *T. equi* foi de 81,09% (n=579), com maior prevalência ($p<0,05$) para microrregião de Itaguaí (85,43%), quando comparado a Serrana (76,92%). A região, altitude, nível da propriedade e origem dos equinos foram associados ($p<0,05$) com a soropositividade para *T. equi*. Equinos criados na microrregião de Itaguaí apresentaram 11% mais chance (RP=1,11; $p=0,003$) de terem contato com *T. equi* comparado aqueles criados na microrregião Serrana. Além disso, quando são criados a altitudes abaixo de 500m apresentaram 10% de chance a mais abaixo de 500m (RP=1,10; $p=0,014$) de se tornarem soropositivos. Equinos criados em propriedades de nível ruim (RP=1,13; $p=0,018$) e nascidos na propriedade (RP=1,10; $p=0,008$) apresentaram mais chance de terem contato com *T. equi*. A frequência de equinos soropositivos para *A. phagocytophilum* foi de 17% (n=17) das amostras examinadas no município de Seropédica. Apenas a idade apresentou associação ($p=0,044$) com a soropositividade dos equinos para *A. phagocytophilum*. Das 350 amostras avaliadas pela RT-PCR, 0,86% (n=3) apresentaram amplificação específica para o gene *msp2*. As amostras positivas apresentaram valores médios do C_T de $35,09\pm 1,48$ ciclos e de T_m de $78,56\pm 0,53^\circ\text{C}$, semelhante a do controle positivo, de $78,45\pm 0,32^\circ\text{C}$. As microrregiões de Itaguaí e Serrana são endêmicas para theileriose equina e de estabilidade enzoótica para *T. equi*. Apenas os fatores relacionados à área de coleta influenciam a soropositividade dos equinos para *T. equi* nas microrregiões estudadas. A presença de anticorpos anti-*A. phagocytophilum* e a evidência molecular da infecção por esse agente em equinos do município de Seropédica, no estado do Rio de Janeiro, sugere a circulação de *A. phagocytophilum* nessa região.

Palavras-chave: Equídeos, *Theileria equi*, *Anaplasma phagocytophilum*, Epidemiologia, Diagnóstico sorológico e molecular.

ABSTRACT GENERAL

SANTOS, Tiago Marques dos. **Agents of theileriosis and granulocytic anaplasmosis in equids of microregions in the State of Rio de Janeiro.** 2011. 90p. Tesis (Doctor in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

This study was carried out in the microregions of Itaguaí and Serrana, State of Rio de Janeiro in order to study of granulocytic anaplasmosis and theileriosis equine agents. Blood and serum samples were subjected to indirect fluorescent antibody test (IFAT), real time polymerase chain reaction (RT-PCR) and hematological analysis. The overall prevalence for *T. equi* was 81.09% (n=579), with higher prevalence ($p<0.05$) for Itaguaí microregion (85.43%), when compared to Serrana (76.92%). The region, altitude, level of farm and origin of horses were associated ($p<0.05$) with seropositivity for *T. equi*. Horses reared in the Itaguaí microregion had 11% more likely (PR=1.11, $p=0.003$) of having contact with *T. equi* compared to those reared in the Serrana microregion. Moreover, when are reared at altitudes below 500m showed 10% chance less (PR=1.10; $p=0,014$) of becoming seropositive. Horses reared in poor level farms (PR=1.13, $p=0.018$) and born on the farm (PR=1.10, $p=0.008$) showed more chance of having contact with *T. equi*. The main ticks found attached in horses were *Amblyomma cajennense* and *Dermacentor (Anocentor) nitens*. The frequency of seropositive horses for *A. phagocytophilum* was 17% (n=17) of the samples tested in the Seropédica county. No association ($p>0.05$) was observed among the studied factors and seropositivity of horses to *A. phagocytophilum*. Of 350 samples tested by RT-PCR, 0.86% (n=3) showed specific amplification for *msp2* gene. The positive samples showed average C_T value of 35.09 ± 1.48 cycles and T_m of $78.56\pm 0.53^\circ\text{C}$, similar to the positive control, $78.45\pm 0.32^\circ\text{C}$. The Itaguaí and Serrana microregions are endemic for equine theileriosis and of enzootic stability for *T. equi*. Only factors related to collection area influenced the seropositivity of horses for *T. equi* in the microregions studied. The presence of anti-*A. phagocytophilum* antibodies and molecular evidence of infection by this pathogen in horses of Seropédica municipality in the Rio de Janeiro state, suggests the circulation of *A. phagocytophilum* in this region.

Key words: Equids, *Theileria equi*, *Anaplasma phagocytophilum*, Epidemiology, Sorological and molecular diagnosis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Prevalência de anticorpos anti- <i>T. equi</i> em equídeos das microrregiões Serrana e de Itaguaí no estado do Rio de Janeiro e fatores relacionados com a área de coleta.....	22
Tabela 2.	Prevalência de anticorpos anti- <i>T. equi</i> em equídeos nas microrregiões Serrana e de Itaguaí do estado do Rio de Janeiro e fatores relacionados aos animais.....	24
Tabela 3.	Prevalência de anticorpos anti- <i>T. equi</i> em equídeos nas microrregiões Serrana e de Itaguaí do estado do Rio de Janeiro e fatores relacionados ao parasitismo por carrapatos e <i>Stomoxys calcitrans</i>	27
Tabela 4.	Razão de prevalência (RP) entre a frequência de anticorpos anti- <i>Theileria equi</i> através da RIFI e fatores associados à soropositividade dos equinos.....	28
Tabela 5.	Frequência de anticorpos anti- <i>A. phagocytophilum</i> em equinos do município de Seropédica no estado do Rio de Janeiro e fatores relacionados à soropositividade.....	64
Tabela 6.	Eritrograma, proteína plasmática total e fibrinogênio de equinos soropositivos para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> através da reação de imunofluorescência indireta.....	67
Tabela 7.	Leucograma de equinos soropositivos e soronegativos a anticorpos anti- <i>Anaplasma phagocytophilum</i> através da reação de imunofluorescência indireta.....	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Localização geográfica das coletas de dados (pontos em verde) nas microrregiões de Itaguaí, com os municípios de Itaguaí, Mangaratiba e Seropédica; e Serrana com os municípios de Petrópolis e Teresópolis, no estado do Rio de Janeiro.....	19
Figura 2.	Reação de imunofluorescência indireta. Soro controle negativo (a) e amostra de soro equino demonstrando fluorescência específica para <i>Theileria equi</i> na diluição de 1:80 (b).....	21
Figura 3.	Número de equídeos infestados por <i>Amblyomma cajennense</i> e/ou <i>Dermacentor (Anocentor) nitens</i> nas microrregiões de Itaguaí e Serrana do estado do Rio de Janeiro.....	29
Figura 4.	Número de equídeos infestados e grau de infestação por <i>Amblyomma cajennense</i> nas microrregiões de Itaguaí e Serrana do estado do Rio de Janeiro.....	29
Figura 5.	Número de equídeos infestados e grau de infestação por <i>Dermacentor (Anocentor) nitens</i> nas microrregiões de Itaguaí e Serrana do estado do Rio de Janeiro.....	30
Figura 6.	Número de equídeos infestados por <i>Stomoxys calcitrans</i> nas microrregiões de Itaguaí e Serrana do estado do Rio de Janeiro.....	31
Figura 7.	Localização geográfica das coletas de dados (pontos em verde) nas microrregiões de Itaguaí, com os municípios de Itaguaí, Mangaratiba e Seropédica, no estado do Rio de Janeiro.....	60
Figura 8.	Reação de imunofluorescência indireta em lâminas contendo cultura de células HL60 infectadas com <i>Anaplasma phagocytophilum</i> . Soro controle negativo (a) e amostra de soro equino demonstrando fluorescência específica para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> na diluição de 1:80 (b).....	62
Figura 9.	Curva de amplificação da PCR em tempo real para o gene <i>msp2</i> de <i>Anaplasma phagocytophilum</i> . Controles positivo (linha vermelha) com C_T médio de 14,55 e amostra de equino positiva (linha verde) com C_T de 33,82 (a). Controles positivo (linha vermelha) com C_T médio de 15,92 e amostras de equino positivas (linha amarela e azul) com C_T de 34,75 e 36,17 (b).....	69
Figura 10.	Curvas de dissociação dos produtos amplificados na PCR em tempo real para o gene <i>msp2</i> de <i>Anaplasma phagocytophilum</i> . Controle positivo (linha vermelha) com T_m de 78,22 °C e amostras de equino positivas (linha amarela e azul) com T_m de 78,06 °C e 79,11 °C (a). Controle positivo (linha vermelha) com T_m de 78,67 °C e amostra de equino positiva (linha verde) com T_m de 78,52°C (b).....	70
Figura 11.	Gel de agarose (2%) com produtos da amplificação do fragmento de 122pb do gene <i>msp2</i> de <i>Anaplasma phagocytophilum</i> . PM: Peso molecular de 100pb; C-: Controle negativo; A1, A2 e A3: Amostras de equino positivas na PCR em tempo real; C+: Controle positivo.....	70

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO I - Fatores associados à <i>Theileria equi</i> em equídeos das microrregiões de Itaguaí e Serrana no estado do Rio de Janeiro	3
RESUMO	4
ABSTRACT	5
1 INTRODUÇÃO	6
2 REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1 Evolução histórica de Babesia equi para <i>Theileria equi</i>	7
2.2 Classificação de <i>Theileria equi</i>	7
2.3 Morfologia e ciclo biológico de <i>Theileria equi</i>	8
2.4 Epidemiologia.....	8
2.4.1 Transmissão de <i>Theileria equi</i>	8
2.4.2 Distribuição geográfica de <i>Theileria equi</i>	9
2.4.3 Fatores associados à infecção por <i>Theileria equi</i>	13
2.5 Patogenia	14
2.5.1 Sinais clínicos de theileriose equina	14
2.5.2 Alterações hematológicas e patológicas em infecção por <i>Theileria equi</i>	15
2.6 Diagnóstico de theileriose equina	15
2.6.1 Exame microscópico de esfregaço de sangue	15
2.6.2 Métodos sorológicos	16
2.6.3 Métodos moleculares	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Descrição da região estudada.....	18
3.2 Estudo epidemiológico e amostragem.....	18
3.3 Questionário epidemiológico.....	19
3.4 Coleta de sangue e carrapatos	20
3.5 Reação de imunofluorescência indireta.....	20
3.6 Análises estatísticas.....	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5 CONCLUSÕES	32
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	33
CAPÍTULO II - Evidência sorológica e molecular de <i>Anaplasma phagocytophilum</i> em equinos da microrregião de Itaguaí no estado do Rio de Janeiro	45
RESUMO	46
ABSTRACT	47
1 INTRODUÇÃO	48
2 REVISÃO DE LITERATURA	49
2.1 Evolução histórica de <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	49
2.2 Classificação de <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	50
2.3 Morfologia e aspectos biológicos de <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	50
2.4 Diversidade antigênica de <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	50
2.5 Variação genética de <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	51
2.6 Epidemiologia	51
2.6.1 Hospedeiros e reservatórios de <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	51
2.6.2 Vetores de <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	53

2.7 Locais primários de multiplicação	53
2.8 Bacteremia e sinais clínicos de anaplasnose granulocítica equina.....	54
2.9 Alterações hematológicas e patológicas em anaplasnose granulocítica equina.....	55
2.10 Persistência da infecção por <i>Anaplasma phagocytophilum</i> e o estado de portador	56
2.11 Diagnóstico de Anaplasnose Granulocítica Equina	57
3 MATERIAL E MÉTODOS	59
3.1 Descrição da região estudada.....	59
3.2 Tamanho da amostra e amostragem.....	59
3.3 Questionário epidemiológico.....	60
3.4 Coleta de sangue e carrapatos	60
3.5 Análises hematológicas.....	61
3.6 Reação de imunofluorescência indireta.....	61
3.7 Extração do DNA e PCR em tempo real.....	62
3.8 Análises estatísticas.....	63
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.1 Estudo soro-epidemiológico de anaplasnose granulocítica equina no município de Seropédica	64
4.2 Evidência molecular de <i>Anaplasma phagocytophilum</i> em equinos na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro	69
5 CONCLUSÕES	72
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
2 CONCLUSÕES GERAIS	85
ANEXO	86
A - Questionário epidemiológico.....	87

1 INTRODUÇÃO GERAL

Theileriose equina é uma doença causada por protozoário de localização intra-eritrocítica denominado *Theileria equi*. Equinos infectados por esse agente podem desenvolver sinais clínicos de febre, anemia, icterícia, hemoglobinúria e fraqueza. Quando não diagnosticada e tratada de forma eficaz pode levar os animais à morte. O principal vetor de *T. equi* no Brasil é o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. No entanto, a transmissão pode ocorrer de forma iatrogênica e por infecção congênita. Theileriose equina é endêmica em diferentes regiões do Brasil e sua importância está relacionada à dispersão de *T. equi* para áreas livres, através do comércio e movimentação de animais durante as competições esportivas, operações militares, leilões e exposições de animais portadores. Alguns países considerados livres da doença, em muitos casos, não estão livres dos carrapatos vetores, portanto, a entrada de um equino portador de *T. equi* pode acarretar infecção aguda em outros animais. Além disso, theileriose equina apresenta elevada morbidade, o que reflete em diminuição do potencial atlético, gastos com medicamentos, abortos e mortalidade, além da possível introdução de animais susceptíveis em área enzoótica.

A anaplasmoose granulocítica equina (AGE) é causada por *Anaplasma phagocytophilum*, um cocobacilo gram-negativo, com tropismo por células granulocíticas, como neutrófilos e eosinófilos. Essa doença foi relatada pela primeira vez no estado da Califórnia, Estados Unidos (GRIBBLE et al., 1969) e posteriormente foi registrada em vários países da Europa e Ásia e, recentemente, a infecção em equinos foi registrada na Guatemala. Além de equinos, *A. phagocytophilum* pode infectar, cães, bovinos, ovinos, gatos, animais selvagens, pequenos roedores e o homem, os quais podem servir como reservatório. Esse agente é transmitido transtadialmente por carrapatos do complexo *Ixodes persulcatus*, além de outros do gênero *Ixodes*. Equinos acometidos com AGE podem apresentar alterações clínicas e hematológicas incluindo febre alta, anorexia, depressão, edema de membros, relutância em se locomover, ataxia, petéquias, icterícia, anemia, trombocitopenia, leucopenia e presença de corpúsculos de inclusão (mórula) no citoplasma de neutrófilos e eosinófilos. A severidade da infecção é influenciada por diversos fatores, como a variante de *A. phagocytophilum* envolvida, outras infecções concomitantes, idade, estado imune e condição geral do hospedeiro, bem como fatores climáticos e de manejo dos animais.

A possibilidade de co-infecção de *T. equi* com outros agentes deve ser considerada, principalmente com *Babesia caballi* e também com *A. phagocytophilum*. A co-infecção com *B. caballi* tem sido registrada em diferentes estudos realizados no Brasil e no mundo. Recentemente, evidência sorológica de infecção por *A. phagocytophilum* em equinos foi registrado no estado de São Paulo, Brasil. No entanto, no Brasil, AGE não é frequentemente incluída no diagnóstico diferencial de theileriose ou babesiose equina e de outras doenças como anemia infecciosa equina e leptospirose. Desta forma, cria-se a necessidade de estudos que comprovem a existência desta enfermidade entre a população de equinos e que forneçam dados que possam ser utilizados na rotina de diagnóstico clínico-laboratorial e em estudos futuros.

O diagnóstico de theileriose equina e AGE pode ser realizado através de métodos diretos e indiretos. O diagnóstico direto pode ser realizado pela visualização do parasito através de microscopia óptica em esfregaço de sangue corado ou através da detecção do DNA genômico do parasito por métodos moleculares. Outros métodos são os sorológicos, dos quais a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), o ensaio enzimático de imuno-adsorção (ELISA) e o teste de

fixação do complemento (TFC) são os mais utilizados. Todos possuem vantagens e desvantagens e devem ser utilizados de maneira racional para que o diagnóstico seja o mais preciso possível.

O presente estudo teve os seguintes objetivos: determinar a prevalência de *T. equi* em equídeos das microrregiões de Itaguaí e Serrana no estado do Rio de Janeiro, através da RIFI; caracterizar as microrregiões como de estabilidade ou instabilidade enzoótica para *T. equi*; identificar fatores associados (espécies de equinos, região de coleta, sexo, idade, altitude, atividade dos equinos, origem, parasitismo por carrapatos e dípteros) à soropositividade dos equídeos para *T. equi*; determinar a frequência de equídeos soropositivos para *A. phagocytophilum* no município de Seropédica, Rio de Janeiro, através da RIFI e identificar fatores associados (sexo, idade, atividade dos equinos, parasitismo por carrapatos e soropositividade para *T. equi*) à soropositividade para este agente; identificar alterações hematológicas em equídeos soropositivos para *A. phagocytophilum*; e avaliar a ocorrência de *A. phagocytophilum* em equídeos da microrregião de Itaguaí através da PCR em tempo real.

CAPÍTULO I

FATORES ASSOCIADOS À *Theileria equi* EM EQUÍDEOS DAS MICRORREGIÕES DE ITAGUAÍ E SERRANA NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

RESUMO

SANTOS, Tiago Marques dos. **Fatores associados à *Theileria equi* em equídeos das microrregiões de Itaguaí e Serrana no estado do Rio de Janeiro.** 2011. 41p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

Este trabalho foi realizado nas microrregiões de Itaguaí e Serrana no estado do Rio de Janeiro com o objetivo de determinar a prevalência de *Theileria equi* através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e identificar fatores associados à soropositividade dos equídeos. Um total de 714 amostras de sangue de equídeos das microrregiões de Itaguaí (n=350) e Serrana (n=364) foram coletadas e o soro utilizado para detecção de anticorpos anti-*T. equi*. A diferença das prevalências entre as microrregiões e a associação dos fatores (espécies, região de coleta, sexo, idade, altitude, atividade, origem, parasitismo por carrapatos e por *Stomoxys calcitrans*) com a presença de anticorpos anti-*T. equi* foi avaliada através do teste de Qui-quadrado em nível de 5% de significância. A razão de prevalência (RP) foi calculada para os fatores que apresentaram associação através do programa Bioestat 4.0. A prevalência de anticorpos anti-*T. equi* em ambas as microrregiões foi de 81,09% (n=579). No entanto, a microrregião de Itaguaí apresentou prevalência para *T. equi* superior ($p < 0,05$) a observada na microrregião Serrana, com 85,43% (n=299) e 76,92% (n=280) dos equinos soropositivos, respectivamente. A região, altitude, nível da propriedade e origem dos equinos foram associados ($p < 0,05$) com a soropositividade para *T. equi*. Equinos criados na microrregião de Itaguaí (RP=1,11; $p = 0,003$) e em altitudes abaixo de 500m (RP=1,10; $p = 0,014$) apresentaram maior chance de se tornarem soropositivos para *T. equi*. Além disso, quando são criados em propriedades de nível ruim (RP=1,13; $p = 0,018$) e nascidos na propriedade (RP=1,10; $p = 0,008$) apresentaram mais chance de terem contato com *T. equi*. A espécie, o sexo, a idade, a atividade, o sistema de criação, o contato com bovinos e o parasitismo por carrapatos e por *S. calcitrans* não apresentaram associação ($p > 0,05$) com a soropositividade dos equinos para *T. equi*. As espécies de carrapatos encontradas parasitando os equídeos foram *Amblyomma cajennense* e *Dermacentor (Anocentor) nitens*, as quais foram mais prevalentes na microrregião de Itaguaí quando comparado a microrregião Serrana. Em ambas as microrregiões, *A. cajennense* apresentou maior distribuição quando comparado a *D. nitens*. O parasitismo por *S. calcitrans* foi mais prevalente em equídeos da microrregião Serrana, 24,9% (n=178), quando comparado aos da microrregião de Itaguaí, 15,5% (n=110). As microrregiões de Itaguaí e Serrana são endêmicas para theileriose equina e de estabilidade enzoótica para *T. equi*. Apenas os fatores relacionados à área de coleta influenciam a soropositividade dos equinos para *T. equi* na área estudada.

Palavras-chave: Equinos, Theileriose equina, Epidemiologia.

ABSTRACT

SANTOS, Tiago Marques dos. **Factors associated to *Theileria equi* in equids of Itaguaí and Serrana microregions in the State of Rio de Janeiro.** 2011. 41p. Tesis (Doctor in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

This study was carried out in Itaguaí and Serrana microregions in the State of Rio de Janeiro and aimed to determine the prevalence of *Theileria equi* by indirect antibody fluorescent test (IFAT) and to identify factors associated to seropositivity of equids. An overall of 714 blood samples of equine from Itaguaí (n=350) and Serrana (n=364) microregions were collected and sera samples were used for detecting anti-*T. equi* antibodies. The difference in prevalence between microregions and the factors associated (species, region, sex, age, altitude, activity, origin, ticks and *Stomoxys calcitrans* parasitism) with presence of anti-*T. equi* antibodies were evaluated using the Chi-square and Fisher's exact test at 5% significance. The prevalence ratio (PR) was calculated for the associated factors using the BioStat 4.0. The prevalence of anti-*T. equi* antibodies in both microregions was 81.09% (n=579). However, Itaguaí microregion demonstrated higher prevalence for *T. equi* (p<0.05) when compared to Serrana microregion, once 85.43% (n=299) and 76.92% (n=280) of horses were seropositive, respectively. The region, altitude, level of farm and origin of horses were associated (p<0.05) with seropositivity for *T. equi*. Horses reared at Itaguaí microregion (PR=1.11, p=0.003) and in altitudes below 500m (PR=1.10; p=0,014) showed more likely to become seropositive for *T. equi*. Furthermore, when reared in poor level farms (PR=1.13, p=0.018) and born on the farm (PR=1.10, p=0.008) horses showed more likely of having contact with *T. equi*. The species, sex, age, activity, breed system, contact with cattle and ticks and *S. calcitrans* parasitism showed no association (p>0.05) with seropositivity of horses for *T. equi*. The main tick species found parasitizing horses were *Amblyomma cajennense* and *Dermacentor (Anocentor) nitens*, which were more prevalent in the Itaguaí microregion compared to Serrana. In both microregions, *A. cajennense* showed greater distribution when compared to *D. nitens*. The parasitism by *S. calcitrans* was more prevalent in horses in the Serrana microregion, 24.9% (n=178), compared to Itaguaí, 15.5% (n=110). The microregions studied are endemic for equine theileriosis and considered enzootic stability for *T. equi*. Only factors related to collection area influenced the seropositivity of horses for *T. equi* in the microregions studied.

Key words: Horses, Equine theileriosis, Epidemiology.

1 INTRODUÇÃO

Theileriose equina, também conhecida como piroplasmose equina, é uma doença causada por *Theileria equi*, um parasito intra-eritrocítico que infecta equídeos. Esse agente é transmitido biologicamente por carrapatos ixodídeos dos gêneros *Dermacentor*, *Hyalomma* e *Rhipicephalus* (THOMPSON, 1969). No Brasil, *T. equi* é transmitido transestadialmente e intra-estadialmente por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (GUIMARÃES et al., 1998; UETI et al., 2005, 2008). Além da forma biológica, *T. equi* pode ser transmitida iatrogenicamente através de sangue infectado (TENTER; FRIEDHOFF, 1986), pela via transplacentária (ALLSLOP et al., 2007) e de forma congênita (PHIPPS; OTTER, 2004; SANTOS et al., 2008).

Em equídeos, os principais sinais clínicos de theileriose são febre, hemólise intravascular, anemia, icterícia, hemiglobinúria, edema de membros, depressão e em alguns casos pode ocorrer a morte (DE WALL, 1992). A gravidade dos sinais clínicos é variável, e em muitos casos a recuperação espontânea pode ocorrer sem sinais clínicos evidentes, especialmente em áreas endêmicas (RIBEIRO et al., 1995).

A importância econômica da theileriose equina está relacionada na dispersão do agente etiológico para áreas livres, através do comércio e movimentação de equinos durante as competições esportivas, operações militares, leilões e exposições de animais portadores (FRIEDHOFF, 1990). Alguns países considerados livres da doença, em muitos casos, não estão livres dos carrapatos vetores, portanto a entrada de um animal positivo crônico pode acarretar infecção aguda. O maior impacto econômico se reflete na morbidade, diminuição do potencial atlético, gastos com medicamentos, abortos e mortalidade, além da possível introdução de animais susceptíveis em área enzoótica (BOTTEON et al., 2005).

A doença é amplamente distribuída pelo mundo e apresenta caráter endêmico em muitas regiões de clima tropical e subtropical (DE WAAL, 1992). Essa distribuição está intimamente relacionada a áreas de maior concentração dos carrapatos vetores (FRIEDHOFF, 1988). No Brasil, theileriose equina é endêmica e a identificação de fatores de risco e/ou associados à infecção com *T. equi* pode ter papel importante na adoção de medidas de controle. Além disso, pode sugerir evidências epidemiológicas sobre os mecanismos pelos quais *T. equi* se dissemina na população de hospedeiros.

Estudos tem demonstrado associação da infestação por carrapatos (KERBER et al., 2009), idade (RIBEIRO et al., 1999; RÜEGG et al., 2007; KOUAM et al., 2010), sistema de criação (BOTTEON et al., 2002; MORETTI et al., 2010), atividade, área geográfica, período do ano e categorias (SHKAP et al., 1998; RÜEGG et al., 2007; KOUAM et al., 2010; MORETTI et al., 2010) com a infecção por *T. equi*. No entanto, outros fatores podem estar associados à infecção, pois as características epidemiológicas da doença podem diferir entre regiões.

O presente estudo teve como objetivos determinar a prevalência de *T. equi* em equídeos das microrregiões de Itaguaí e Serrana no estado do Rio de Janeiro, através da RIFI, caracterizar as microrregiões como de estabilidade ou instabilidade enzoótica para *T. equi* e identificar fatores associados (espécies de equinos, região de coleta, sexo, idade, altitude, atividade dos equinos, origem, parasitismo por carrapatos e dípteros) à soropositividade dos equídeos para *T. equi*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Evolução histórica de *Babesia equi* para *Theileria equi*

A descrição do gênero *Babesia* se iniciou com Babés em 1888. Este autor descobriu microrganismos em eritrócitos de bovinos na Romênia e associou-os com hemoglobinúria bovina ou febre das “águas vermelhas”. Posteriormente, Babés também encontrou organismos similares em eritrócitos de ovinos. Em 1893 o agente da febre do Texas dos bovinos nos EUA recebeu o nome de *Pyrosoma bigeminum* e mostrou ser transmitido por carrapato (SMITH; KILBORNE, 1893). Este parece ter sido o primeiro relato de transmissão de um protozoário por um artrópode. Naquele mesmo ano, Starcovici (1893) propôs a criação do gênero *Babesia* em homenagem a Babés por ter sido o primeiro a ter visualizado estes hemoparasitos. Como o gênero *Pyrosoma* foi pré-ocupado, *Babesia* passou a ser o nome correto para o gênero. Alguns outros nomes foram propostos desde então, como *Piroplasma* o mais conhecido. O nome “piroplasma” se origina pelo fato dos parasitos, após sua multiplicação, adquirem formas semelhantes à pêra.

A doença em equinos foi descrita, primeiramente, por Theiler (1901) e Laveran (1901). Estes autores examinaram esfregaços de sangue capilar de equinos da África do Sul e caracterizaram o agente etiológico como *Piroplasma equi*. No ano seguinte, THEILER (1902) comprovou a existência da diferença etiológica entre a febre biliar, causada por vírus e piroplasmose equina, causada por protozoários. Em 1910, Nutall e Strickland propuseram a designação de *Nuttalia equi* para o protozoário descrito como *P. equi*, em função das características morfológicas do parasito serem diferentes das demais espécies do gênero *Piroplasma*, até então conhecidas. Entretanto, trabalhos posteriores de nomenclatura e sistemática classificaram as espécies desse parasito dentro do gênero *Babesia*. O termo piroplasmose, originário do gênero *Piroplasma*, é atualmente considerado sinonímia.

A posição sistemática de *B. equi* no gênero *Babesia* foi questionada por vários estudos, os quais apontaram diferenças desta espécie com as demais do gênero. É sabidamente conhecido que parasitos do gênero *Babesia* são transmitidos transtadiamente, no entanto, transmissão transovariana não foi ainda relatada para *B. equi* (SIGRIST, 1983). Além dessa diferença, *B. equi* realiza esquizogonia em linfócitos (SCHEIN et al., 1981), o que não se observa para outras espécies do gênero *Babesia*. E finalmente, apresenta resistência aos compostos babesicidas, o que sugere um metabolismo distinto (MEHLHORN; SCHEIN, 1984). Inicialmente, *B. equi* foi classificada como espécie de *Babesia* com estágios intralinfocíticos (MEHLHORN; SCHEIN, 1993). No entanto, *B. equi* já era denominada de *Theileria equi* por Uilenberg, (1986), sendo finalmente alocada no gênero *Theileria* por Mehlhorn e Schein (1998).

2.2 Classificação de *Theileria equi*

- Reino: Protista;
- Sub-reino: Protozoa Goldfuss, 1818;
- Filo: Apicomplexa Levine, 1970;
- Classe: Sporozoea Leuckart, 1879;
- Sub-classe: Piroplasmae Levine, 1961;
- Ordem: Piroplasmida Wenyon, 1926;
- Família: Theileriidae Du Toit, 1918;
- Gênero: *Theileria* Bettencourt, 1907;
- Espécie: *Theileria equi* (LAVERAN, 1901) Mehlhorn e Schein, 1998.

2.3 Morfologia e ciclo biológico de *Theileria equi*

O ciclo biológico de *T. equi* será descrito conforme Mehlhorn e Schein (1998).

Esquizogonia – após a inoculação através da saliva do carrapato, os esporozoítos de formato ovóide ou fusiformes, medindo de 3 a 4 x 1 a 2µm, penetram em linfócitos do hospedeiro vertebrado, onde ocorre a formação de macro e micro-esquizontes, os quais darão origem a cerca de 200 merozoítos por célula infectada. Os merozoítos medindo de 1,5 a 2µm penetram nos eritrócitos, arredondam e iniciam a reprodução assexuada por divisão binária. Desse processo de reprodução originam os estágios eritrocíticos piriformes, medindo de 2 a 3µm de comprimento. Em vários eritrócitos, a divisão assexuada dá origem a quatro formas piriformes medindo cerca de 2µm de comprimento e aparecendo juntas como uma "cruz de malta". Após a ruptura dos eritrócitos, os merozoítos penetram em outros eritrócitos, se tornam esféricos e inicia outra fase de reprodução assexuada. No entanto, alguns dessas formas que penetraram nos eritrócitos se tornam esféricas/ovóides, atingindo um diâmetro de cerca de 2 a 3µm. São formas semelhantes às observadas em parasitos da malária e são chamados de gamontes.

Gamogonia – após a ingestão dos gamontes pelos carrapatos eles persistem inalterados no intestino do carrapato durante os primeiros 12 dias. Por volta de 48 a 72 horas após a infestação dos carrapatos estes gamontes crescem rapidamente, alcançando diâmetros de cerca de 3 a 4µm. Muitos, ou talvez, todos os gamontes, iniciam a reprodução nuclear e formação de saliências, semelhante a corpos radiados. Esse estágio multinuclear, com cerca de 5 a 6µm de comprimento, que se divide em estágios mononucleares, medindo de 2 a 3µm de comprimento, são chamados de microgamontes, os quais darão origem aos microgametas. Simultaneamente, alguns estágios esféricos inalterados, em forma de anel, medindo de 1,5 a 2,5µm darão origem aos macrogamontes e consecutivamente aos macrogametas. Os micro e macrogametas formam conglomerações, se fundem para formar os zigotos. Essas formas esféricas são visualizadas entre o 4º e 6º dia após a infestação de carrapatos, após a coloração com o Giemsa, com tamanho que varia de 4 a 6µm. Dentro dos zigotos se forma um único cineto medindo cerca de 14µm de comprimento, chegando a uma largura de 4 a 7µm em sua extremidade anterior. Entre o 5º e 7º dia da infestação, alguns desses cinetos são vistos livres na hemolinfa do carrapato, considerando que o carrapato termina sua alimentação entre o 6º e 9º dias após a infestação.

Esporogonia – a penetração dos cinetos nas células da glândula salivar do carrapato se inicia, principalmente, entre o 7º e 8º dia após a infestação. Inicialmente, grandes massas esporogônicas multinucleares (esporontes) se formam no interior das células hospedeiras hipertrofiadas. Esses esporontes se dividem em vários esporoblastos multinucleares esféricos, com 6 a 15µm de diâmetro, na periferia dos quais os esporozoítos de formato ovóide a fusiformes se formam. Esse desenvolvimento se completa entre o 6º e 24º dia após o ingurgitamento do carrapato. O tamanho dos esporozoítos varia conforme a espécie de carrapato. Esporozoítos encontrados em carrapatos do gênero *Hyalomma* são maiores do que aqueles observados em *R. (B.) microplus* (MOLTMANN et al., 1983; GUIMARÃES et al., 1998a).

2.4 Epidemiologia

2.4.1 Transmissão de *Theileria equi*

A transmissão biológica de *T. equi* ocorre de forma transtadial pela picada de carrapatos infectados com esse agente, os quais inoculam esporozoítos, estágio infectante de *T. equi*, nos hospedeiros através da saliva (UILENBERG, 2006). Dentre os carrapatos envolvidos na transmissão de *T. equi* estão os dos gêneros *Dermacentor*, *Hyalomma* e *Rhipicephalus* (THOMPSON, 1969). Nos EUA e Brasil, *R. (B.) microplus* é a espécie de carrapato envolvida

na transmissão de *T. equi* (GUIMARÃES et al., 1998b; UETI et al., 2005). Ninfas de *R. (B.) microplus* se infectam com *T. equi* durante a alimentação em um equino com infecção aguda ou crônica e, após a mudança de estágio e migração para um novo hospedeiro, podem transmitir *T. equi* a equinos livres do parasito (UETI et al., 2005). Segundo esses autores, a parasitemia durante o período de alimentação do carrapato no hospedeiro influencia a eficiência da infecção do vetor. No entanto, carrapatos infectados em condições de baixas parasitemias como ocorrem em equinos portadores, desenvolvem níveis elevados de infecção por formas evolutivas de *T. equi* na glândula salivar (UETI et al., 2008). Isso indica que a replicação no carrapato compensa qualquer diferença inicial na dose infectante e excede o limiar para transmissão.

Além da transmissão transestadial, Ueti et al., (2008) relataram a capacidade de machos de *R. (B.) microplus* transmitirem *T. equi* intra-estadialmente, a partir de equinos com infecção aguda e crônica. O comportamento alimentar e de busca por hospedeiro de machos adultos de *R. (B.) microplus* justificam a importância da transmissão intra-estadial de *T. equi* (LABRUNA et al., 2001). Embora *R. (B.) microplus* seja um carrapato monoxeno, onde larvas, ninfas e adultos podem ingurgitarem e mudarem de estágio em um único hospedeiro, os machos adultos alimentam intermitentemente com movimentos entre hospedeiros em busca de fêmeas de carrapatos.

A transmissão transovariana, comum em espécies do gênero *Babesia*, não foi confirmada para *T. equi*. Estudos sugerem a possibilidade desta forma de transmissão, uma vez que o DNA de *T. equi* foi detectado em ovos provenientes de fêmeas de *R. (B.) microplus* infectadas (BATTSETSEG et al., 2002; UETI et al., 2008). Embora a infecção dos ovos de *R. (B.) microplus* foi observada, não houve transmissão por qualquer um dos estágios evolutivos (larvas, ninfas e adultos) da geração subsequente. Segundo Ueti et al. (2008), isso não reflete a falta de aquisição inicial de *T. equi* pelas fêmeas adultas de *R. (B.) microplus* ou a falha na passagem transovariana, já que mais de 10.000 larvas de carrapatos derivadas de ovos positivos na PCR não foram capazes de transmitir *T. equi*.

Além da transmissão biológica por carrapatos, *T. equi* pode ser transmitido de forma iatrogênica ou acidental, através de sangue infectado. Dessa forma, fômites contaminados e picadas de dípteros hematófagos são incriminados como possíveis vias de infecção (GERSTENBERG et al., 1998), porém, não há confirmação científica do papel de dípteros hematófagos na transmissão deste hemoparasito (FRIEDHOFF, 1988). A transmissão transplacentária foi anteriormente sugerida com base em observações de fetos abortados, infectados com *T. equi* (DU PLESSIS; BASSON, 1966) e em casos clínicos de babesiose em neonatos (DONATIEN et al., 1924; GUIMARÃES et al., 1954; ERBSLOH, 1975). Recentemente, a infecção transplacentária ou congênita por *T. equi* foi observada por Phipps e Otter (2004), Allslop et al. (2007) e Santos et al. (2008). No entanto, não foi constatada por (KUMAR et al., 2008). Admitindo-se a possibilidade dessa forma de infecção, novos estudos são necessários no sentido de estabelecer o papel da infecção congênita na cadeia epidemiológica da theileriose equina.

2.4.2 Distribuição geográfica de *Theileria equi*

Theileriose equina é uma doença cosmopolita, comum em áreas tropicais e subtropicais do mundo, bem como em algumas regiões de clima temperado (DE WAAL, 1992). A ampla distribuição geográfica desta doença está intimamente relacionada às áreas de maior concentração de seus vetores (FRIEDHOFF, 1988).

Na Europa, *T. equi* foi registrada em vários países, nos quais o agente apresenta

distribuição conforme a região estudada. Na região Sul da Itália, Mancianti et al. (2000) registraram prevalência de anticorpos anti-*T. equi* em 19% (n=84) dos equinos avaliados pela RIFI, nos quais foram evidenciados sinais clínicos sugestivos de theileriose. Nesta mesma região, resultados semelhantes já haviam sido observados por Savini et al. (1997). Recentemente, na região Central e Norte da Itália, Moretti et al. (2010) registraram prevalência de anticorpos anti-*T. equi* em 12% (n=51) dos equinos, através da RIFI. Nesse estudo, o DNA de *Theileria* sp. foi detectado em 9,4% (n=39) dos equinos. Na Espanha, o primeiro caso de theileriose equina foi registrado por Cordeiro Dell Campillo et al. (1974). A partir daí, outros estudos foram desenvolvidos na região Sul da Espanha, nos quais foram registrados frequência de anticorpos anti-*T. equi* superiores a 60% (HABELLA et al., 1989; COLETO, 1999). Mais recentemente, na região Noroeste da Espanha, Camacho et al. (2005) registraram 40% (n=24) de soropositividade para *T. equi* em equinos. Na Alemanha, Boch (1985) registrou prevalência de anticorpos anti-*T. equi* em 5,6% (n=18) dos equinos avaliados pela RIFI. Na Suíça, o primeiro caso autóctone de theileriose equina foi descrito por Gottstein et al. (1994) citado por Sigg et al. (2010). Recentemente, estudo realizado na Suíça registrou soroprevalência para *T. equi* em 4,4% (n=4) e em 1,7% (n=26) dos equinos, respectivamente, nascidos naquele país e nos importados de países como Alemanha, França, Espanha, Portugal, Áustria, Itália, Hungria, República Checa, Polônia, Bélgica, Holanda, Dinamarca e Irlanda (SIGG et al., 2010). Na Grécia, Kouam et al. (2010) observaram prevalência para *T. equi* em 11% (n=60) dos equídeos avaliados pela cELISA. Na Turquia, Öncel et al. (2007) encontraram 25% (n=27) das amostras de equinos soropositivas para *T. equi* quando testadas pela RIFI. Posteriormente, Sevinic et al. (2008) registraram prevalência de anticorpos anti-*T. equi* em 17,7% (n=85) dos equinos testados pelo cELISA.

A Ásia, com exceção da Sibéria, é enzoótica para *T. equi* (FRIEDHOFF, 1988). A infecção é comum na China e na Coreia. O Japão é considerado área livre da doença, uma vez que theileriose clínica não foi registrado no país. No entanto, Ikadai et al. (2002) analisaram 2019 soros de equinos do Japão, entre 1971-1973, e detectaram 2,2% (n=44) de amostras positivas para *T. equi* pelo ELISA. Esses autores sugerem que outros estudos sejam conduzidos para avaliar a população mais recente de equinos daquele país, uma vez que, grande número de equinos tem sido importado de países onde a doença é endêmica e existem os carrapatos vetores (YOSHIHARA, 1997). Na província de Xinjiang, na China, Xuan et al. (2002) registraram 40% (n=28) de equinos soropositivos para *T. equi*. Posteriormente, Huang et al. (2003) detectaram 47,6% (n=30) de equinos soropositivos para *T. equi* na província de Jilin, através do Western-blotting. Ainda no continente asiático, Xuan et al. (2001a) analisaram amostras de soros de equinos da Mongólia e registraram 90% (n=36) de positividade para *T. equi* pela aglutinação em látex. Prevalências semelhantes foram relatadas por Avarzed et al. (1997) através da RIFI, com 88,2% de animais soropositivos para *T. equi*. Posteriormente, Boldbaatar et al. (2005) realizaram estudo epidemiológico em diferentes regiões da Mongólia e detectaram prevalência de 72,8% (n=185) de equinos soropositivos para *T. equi* utilizando antígeno recombinante no ELISA. Nesse mesmo ano, o DNA de *T. equi* foi detectado em 25,6% (n=10) das amostras de equino testadas pelo método da PCR multiplex (ALHASAN et al., 2005). Recentemente, Rüegg et al., (2007) registraram prevalência de *T. equi* em 66,5% (n=328) e 78,8% (n=393) dos equinos avaliados através da PCR e RIFI, respectivamente. Na região norte de Israel, Shkap et al. (1998), registraram prevalência de *T. equi* em 33,7% (n=122) dos equinos pelo cELISA.

Na África, estudos soro-epidemiológicos têm evidenciado alta prevalência de theileriose em equídeos, inclusive em zebras (RETIEF, 1964; DE WAAL et al., 1988; FRIEDHOFF et al., 1990). Littlejohn e Walker (1979) verificaram que a taxa de incidência anual da piroplasmose

equina é de 1,88% no Zimbabwe e África do Sul, no entanto, é provável que modificações nessa taxa de incidência tenham ocorrido até o momento. Em estudo realizado por Gummow et al. (1996) no norte e leste da Província do Cabo, África do Sul, examinaram 176 amostras de soro de equinos Puro Sangue através da RIFI e encontraram prevalência de anticorpos anti-*T. equi* que variaram de 41 a 61 % em três distritos estudados. Amostras de soro de equinos do nordeste da Província de Free State foram testadas pela RIFI e apresentaram 97,3% (n=90) de positividade para *T. equi* (MOTLOANG et al., 2008). No entanto, em apenas 5,4% (n=5) das amostras detectou-se o DNA de *T. equi*. Recentemente, na África do Sul, Bhoora et al. (2010) detectaram o DNA de *T. equi* em 80% (n=33) das amostras de equinos analisadas pelo PCR em tempo real, sendo que 83% (n=34) dos equinos apresentaram anticorpos anti-*T. equi* quando analisadas pela RIFI.

Na América do norte, os EUA e Canadá são considerados livres de *T. equi*, com exceção do estado da Flórida (HOLBROOK, 1969). Acredita-se que *T. equi* foi introduzido na Flórida por volta de 1958 quando cerca de 50 equinos foram importados de Cuba, no entanto, em função das medidas de quarentena a doença permaneceu localizada (SIPPEL et al., 1962).

Na América Latina, a theileriose equina é enzoótica, com exceção das regiões do sul do Chile e Argentina (FRIEDHOFF et al., 1990). Diversos estudos sorológicos anti-*T. equi* foram realizados em equinos da Argentina (DURRIEU; CIPOCELLI, 1972; BAKOS, 1981; COLMAN et al., 1982; AGUIRRE et al., 2004), Porto Rico (HOLBROOK et al., 1972), Peru (CARPIO, 1972), Chile (URCELAY et al., 1973; RUDOLPH et al., 1975;), Colômbia (TENTER et al., 1988) e Guatemala (TEGLAS et al., 2005).

No Brasil, a theileriose equina foi descrita pela primeira vez por Carini (1910) em equinos no Estado de São Paulo através do diagnóstico clínico e laboratorial. Posteriormente, ainda em São Paulo, a doença foi novamente registrada em animais de corrida com quadro agudo de theileriose (GUIMARÃES et al., 1950). No Rio de Janeiro, o primeiro caso clínico da doença foi registrado por Dupont e Barreiros Terra (1952) através dos sinais clínicos e visualização do parasito em esfregaço de sangue corado pelo Leishmann. A partir do registro da doença no Brasil, vários estudos soro-epidemiológicos foram realizados em diferentes regiões do país. A primeira detecção de anticorpos anti-*T. equi*, no Brasil, foi registrada por Tenter e Friedhoff (1986) após testarem 25 amostras de soros procedentes de equinos do Rio de Janeiro através do TFC e da RIFI e observaram, respectivamente, 68% (n=17) e 72% (n=18) de equinos positivos para *T. equi*.

No Rio de Janeiro, em estudo realizado na UFRRJ, município de Seropédica, Pfeifer Barbosa et al. (1995) utilizaram a RIFI como método de diagnóstico e detectaram frequência de 90,6% (n=110) e 100% (n=121) de equídeos soropositivos para *T. equi*, respectivamente, nos meses de abril e outubro de 1991. Na região Fluminense, município de Itaguaí, atualmente pertencente à microrregião de Itaguaí, Bittencourt e Massard (1997) observaram prevalência de 84,6% (n=66) para *T. equi* pelo TFC. Posteriormente, Botteon et al. (2002) observaram prevalência de 73,6% (n=89) de positividade em equinos criados em municípios da região Metropolitana do Rio de Janeiro sob diferentes sistemas de criação, no entanto, utilizaram a RIFI como método de diagnóstico. No ano seguinte, Mesquita Neto (2003) observou prevalência de *T. equi* em 90,2% (n=74) em equinos de uso militar no Regimento Escola de Cavalaria do Exército Brasileiro. Nesse mesmo ano, Laranjeira (2003) observou prevalência de 93,2% (n=233) em equinos de diferentes regiões do estado do Rio de Janeiro.

Em estudo realizado por Da Costa Pereira et al. (2004) avaliaram amostras de equinos Puro Sangue Inglês (PSI), mantidos temporariamente no Jockey Club do Rio de Janeiro, através

do TFC e registraram anticorpos anti-*T. equi* em 18,1% (n=40) dos equinos. Posteriormente, Da Costa Pereira et al. (2005) examinaram equinos PSI de três estabelecimentos equestres localizados nos municípios de Petrópolis, Teresópolis e Nova Friburgo pelo TFC e observaram 21% (n=52) de positividade para *T. equi*. Também estudando a prevalência de *T. equi* em equinos da raça PSI procedentes de um estabelecimento esportivo localizado no município de Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Da Costa Pereira et al. (2007) utilizaram o TFC e observaram soropositividade em 5,6% (n=4) dos equinos avaliados durante três anos consecutivos. Recentemente, Santos et al. (2009) detectaram reação positiva para *T. equi* em 74,7% (n=59), 60,8% (n=48) e em 75,9% (n=60) das amostras de equinos de diferentes municípios da região Metropolitana do Rio de Janeiro testadas, respectivamente, pela RIFI, TFC e pelo ELISA.

Em Minas Gerais, Ribeiro e Lima (1989) registraram prevalência de 80,1% (n=245) de anticorpos anti-*T. equi* em equinos através da RIFI. Em outro estudo, Ribeiro et al. (1999) detectaram anticorpos anti-*T. equi* em 60,6% (n=242) dos equinos abatidos em dois matadouros nos municípios de Campo Belo e Araguari no estado de Minas Gerais.

Em São Paulo, Heuchert et al. (1999) testaram 752 amostras de soros coletadas de 140 equinos pela RIFI e pelo TFC, das quais encontraram prevalência de anticorpos anti-*T. equi* em 29,8% (n=224) e 17,6% (n=132), respectivamente. Posteriormente, na região nordeste do estado de São Paulo, Baldani et al. (2004) observaram prevalência de anticorpos anti-*T. equi* em aproximadamente 75% (n=68) dos equinos. Recentemente, Kerber et al. (2009) utilizaram o TFC e o ELISA competitivo (cELISA) e observaram prevalência de anticorpos anti-*T. equi*, respectivamente, em 28,5% (n=166) e em 26,6% (n=155) dos equinos de 40 propriedades situadas em diferentes municípios do estado de São Paulo.

Segundo Linhares (1994), a microrregião de Goiânia, Goiás apresenta estabilidade enzoótica para *T. equi*, uma vez que registrou prevalência de anticorpos anti-*T. equi* em 94,7% (n=485) dos equinos examinados pela RIFI naquela região. Adicionalmente, Xuan et al. (2001b) examinaram soros de equinos provenientes dos Estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul pelo teste de aglutinação em látex e encontram 81% (n=38) de positividade para *T. equi*.

Outros estudos foram realizados com amostras de diferentes estados do Brasil. Dentre eles, Kerber et al. (1999) analisaram amostras de soro de equinos provenientes dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul. Através do TFC registraram prevalência para *T. equi* em 42,5% (n=195) e em 18,4% (n=48) dos equinos, respectivamente, em áreas tropicais e subtropicais. Mais recentemente, Heim et al. (2007) examinaram amostras de equinos provenientes de Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Bahia, que foram abatidos em um matadouro localizado no município de Araguari, estado de Minas Gerais. Nesse estudo, a prevalência observada pela RIFI foi de 91% (n=443) para *T. equi*, além disso, o DNA de *T. equi* foi detectado em 59,7% (n=291) dos equinos através do PCR multiplex em tempo real.

A região Sul do Brasil também é considerada endêmica para *T. equi*, como observado em diversos estudos. No Sul do Estado do Rio Grande do Sul, Cunha et al. (1996) testaram amostras de soros de equinos do Jockey Club de Pelotas e de dois haras da região pela RIFI e observaram prevalência de 57,9% (n=77) de anticorpos anti-*T. equi*. Nessa mesma região, Nizoli et al. (2008) observaram prevalência de anticorpos anti-*T. equi* em 22,1% (n=25) dos equinos criados no município de Bajé quando testados pela RIFI. Esses autores também detectaram o DNA de *T. equi* em 15% (n=17) dos equinos avaliados através da PCR nested. Estudo realizado por Golynski et al. (2008) demonstrou que 35,8% (n=136) e 31,6% (n=120) dos equinos avaliados na região norte do estado do Rio Grande do Sul apresentavam anticorpos anti-*T. equi*,

respectivamente, pela RIFI e ELISA. No estado de Santa Catarina, Souza et al. (2000) observaram, através da RIFI, prevalência de anticorpos anti-*T. equi* em 50,4% (n=200) dos equinos nascidos e criados no Planalto Catarinense.

2.4.3 Fatores associados à infecção por *Theileria equi*

A identificação de fatores de risco e/ou associados à infecção com *T. equi* pode auxiliar na adoção de medidas específicas de prevenção e controle, as quais minimizariam a introdução ou dispersão deste hemoparasito entre diferentes regiões. Além disso, pode sugerir evidências epidemiológicas sobre os mecanismos pelos quais *T. equi* se dissemina na população de hospedeiros.

A distribuição de theileriose equina está associada com a presença dos carrapatos vetores (DE WALL, 1992). A prevalência de anticorpos anti-*T. equi* apresentou associação ($p < 0,0001$) com equinos criados em áreas tropicais e subtropicais e com a adoção ou não de medidas para o controle de carrapatos em propriedades (KERBER et al., 1999). Segundo esses autores, a falta do controle de carrapatos demonstrou ser um fator de risco para soropositividade anti-*T. equi* (OR=10,6). Equinos criados nessas condições apresentaram 52,5% de probabilidade de serem soropositivos para *T. equi*, no entanto, o controle de carrapatos reduziu essa probabilidade para 9,4%. Recentemente, Kerber et al. (2009) observaram que a presença de ao menos um equino positivo para *T. equi* em uma propriedade, pelo TFC e cELISA, está associado ($p < 0,001$) com o alto nível de infestação por *Dermacentor (Anocentor) nitens* e *Amblyomma cajennense* (mais que 10 carrapatos adultos por animal). Nesse mesmo estudo, somente o alto nível de infestação por *A. cajennense* apresentou associação ($p = 0,0001$) com mais que 30% dos equinos positivos para *T. equi*. A presença de *R. (B.) microplus* não mostrou associação ($p > 0,20$) com nenhum resultado sorológico para *T. equi*. A associação observada entre a presença de equinos positivos para *T. equi* e a infestação por *A. cajennense* é uma surpresa, uma vez que este carrapato não demonstrou ser um vetor competente deste agente (DENNING, 1988). No entanto, Rüegg et al. (2007) não observaram associação ($p > 0,05$) da proporção de equinos soropositivos pela RIFI com a infestação por carrapatos.

Diversos estudos têm demonstrado associação ($p < 0,05$) da idade dos equinos com a soropositividade para *T. equi* (RIBEIRO et al., 1999; RÜEGG et al., 2007; KOUAM et al., 2010). Equinos com idade acima de cinco anos apresentaram 2,24 vezes mais chance de terem contato com *T. equi* quando comparado aos animais mais jovens (KOUAM et al., 2010). No entanto, outros estudos não registraram associação ($p > 0,05$) da idade com a frequência de equinos soropositivos para *T. equi* (SHKAP et al., 1998; SOUSA et al., 2000; BOTTEON et al., 2002; KARATEPE et al., 2009; MORETTI et al., 2010).

Em relação ao sexo dos equinos, também existem resultados discordantes na literatura. Estudos relatam que o sexo dos equinos não apresenta associação ($p > 0,05$) com a infecção ou presença de anticorpos anti-*T. equi* (SHKAP et al., 1998; SOUZA et al., 2000; BOTTEON et al., 2002; KOUAM et al., 2010). Por outro lado, fraca associação ($p < 0,047$; OR=1,498) foi observada, onde as fêmeas apresentaram maior frequência de anticorpos anti-*T. equi* quando comparada aos machos, pela RIFI (MORETTI et al., 2010).

O sistema de criação dos equinos também demonstra associação com a soropositividade para *T. equi*. Equinos criados em sistema confinado apresentam menor ($p < 0,05$) frequência de anticorpos anti-*T. equi* quando comparado aqueles criados em sistema semiconfinado e extensivo, respectivamente, com 45,2% (n=19); 87,1% (n=27) e 89,6% (n=43) de animais soropositivos (BOTTEON et al., 2002). Recentemente, Moretti et al. (2010) também demonstraram associação

($p < 0,01$; $OR = 2,44$) com o sistema de criação. Nesse estudo, equinos criados a pasto apresentaram maior probabilidade de serem infectados.

Outros fatores que apresentam associação ($p < 0,05$) com a resposta sorológica para *T. equi* são: a atividade dos equinos (esporte, passeio, trabalho), a localização das propriedades, o período do ano; as espécies (equinos, muare e pôneis) e as categorias (garanhões, éguas e equinos castrados) (SHKAP et al., 1998; RÜEGG et al., 2007; KOUAM et al., 2010; MORETTI et al., 2010).

2.5 Patogenia

2.5.1 Sinais clínicos de theileriose equina

Theileriose equina é uma doença que acomete os equídeos (equinos, jumentos, muare e zebras), a qual pode assumir caráter agudo, subagudo ou crônico. O período de incubação varia de dois a dez dias até 21 dias, dependendo do carrapato vetor (MEHLHORN; SCHEIN, 1998). Embora os sinais clínicos de theileriose equina sejam variáveis, os mais frequentemente observados em casos agudos são febre ($\geq 40^{\circ}C$), acompanhada de transpiração; anemia; mucosas hipocoradas a icterica, e algumas vezes hemorrágicas; taquicardia; depressão; fraqueza; anorexia; desidratação; edema; lacrimejamento; aumento do tempo de preenchimento capilar e hemoglobinúria (DE WALL, 1992; HAILAT et al., 1997; AMBAWAT et al., 1999; ZOBBA et al., 2008; ALSAAD, 2010).

Em casos subagudos, os animais apresentam graus variados de anorexia, mal-estar, perda de peso, temperatura corporal elevada ou até mesmo normal, pulso e frequência respiratória aumentada (DE WALL, 1992). Este mesmo autor relata que a febre em casos de theileriose subaguda é, às vezes, intermitente. A coloração das mucosas varia de rosa pálido ou amarelo pálido a amarela brilhante. Petéquias ou equimoses também podem ser visualizadas nas mucosas. Os equinos podem apresentar sinais de cólica tais como bater a pata, olhar para o flanco e permanecerem deitados (HAILAT et al., 1997). Pode ocorrer constipação e, frequentemente é seguido por diarreia. A urina apresenta coloração que varia de amarelo-escuro a castanho, mas em alguns casos a urina apresenta coloração marrom avermelhada como resultado dos pigmentos de hemoglobina e de bilirrubina (TAYLOR et al., 1969). Casos não tratados ou negligenciados de theileriose equina podem se tornarem graves com quadro de anemia e fraqueza generalizada. Pode ocorrer edema da parte distal dos membros, no entanto, não se observa edema de cabeça e da região peitoral e abdominal (SIPPEL et al., 1962). Segundo De Wall (1992) infecções simultâneas por vírus e helmintos podem explicar alguns sinais clínicos atípicos observados algumas vezes.

Theileriose equina na sua forma crônica normalmente se apresenta com uma história de sinais clínicos inespecíficos como inapetência, queda de desempenho e redução na massa corporal (DE WALL, 1992; HAILAT et al., 1997).

A infecção por *T. equi* em éguas portadoras é apontada como a causa mais comum de aborto em equinos (DE WALL, 1992). Fetos abortados mostram lesões características de theileriose equina (ALLSOPP et al., 2007) e assume-se que, uma vez que *T. equi* atravessa a barreira placentária e infecta o feto, ou ocorre o aborto ou o potro nasce com theileriose neonatal. Theileriose neonatal em potros é caracterizada por fraqueza ao nascer ou apatia, seguido do desenvolvimento de anemia, icterícia grave e mal-estar logo após, ou antes, da ingestão do colostro (ERBSLÖH, 1975). Potros acometidos se tornam progressivamente letárgicos e, por fim, são incapazes de permanecerem em pé ou de amamentarem. Febre geralmente está presente e petéquias podem ser visualizadas nas mucosas. Alguns potros se apresentam aparentemente

normais ao nascimento, mas sinais clínicos são observados cerca de dois a três dias após o nascimento.

2.5.2 Alterações hematológicas e patológicas em infecção por *Theileria equi*

Os estudos demonstram haver redução no número de hemácias, de plaquetas, na concentração de hemoglobina e no volume globular em equinos infectados por *T. equi* (DE WALL et al., 1987; HAILAT et al., 1997; CUNHA et al., 1998; ZOBBA et al., 2008). A anemia, característico de theileriose equina, é do tipo normocítica e normocrômica (ALSAAD, 2010). Esse mesmo autor também observou redução no tempo de coagulação sanguínea, tempo de protrombina e tromboplastina parcial ativada em potros com theileriose aguda.

Infecções agudas são caracterizadas por neutropenia e linfocitopenia, no entanto pode-se observar pancitopenia, leucopenia, anemia e trombocitopenia, ou somente trombocitopenia com moderada redução na concentração de hemoglobina e até mesmo parâmetros hematológicos dentro da normalidade (ZOBBA et al., 2008). No entanto, há aumento no número de leucócitos como resultado do aumento dos linfócitos em equinos com infecção aguda (HAILAT et al., 1997).

Observa-se redução no nível plasmático de fibrinogênio, na concentração de íons ferro e fósforo, além de hiperbilirrubinemia, hipoalbuminemia e alteração no perfil hepático com aumento na atividade da alanina-aminotransferase (ALT) e aspartato-aminotransferase (ALT) (TAYLOR et al., 1969; HAILAT et al., 1997; ZOBBA et al., 2008).

Alterações patológicas graves incluem anemia, icterícia, edema do tecido subcutâneo e subseroso, graus variados de emaciação, hepato e esplenomegalia, rins aumentado com coloração vermelho-amarronzado, ascite, hidrotórax e hidropericárdio com hemorragias no epí e endocárdio, congestão e edema dos pulmões e aumento de linfonodos (DE WALL, 1992; HAILAT et al., 1997).

Exames histopatológicos revelam congestão e edema dos pulmões, degeneração centrolobular do fígado e necrose do tipo coagulativa com estase biliar, bem como nefrose caracterizada por degeneração hidrópica e gordurosa do epitélio tubular renal. Observa-se também evidente proliferação de células do sistema mononuclear fagocitário no fígado, rins, pulmões e linfonodos (DE WALL, 1992; HAILAT et al., 1997). Também foi descrito a presença de trombos nos vasos sanguíneos do fígado e pulmões (MAHONEY et al., 1977; HAILAT et al., 1997).

2.6 Diagnóstico de theileriose equina

2.6.1 Exame microscópico de esfregaço de sangue

Theileriose equina é uma doença extremamente importante, tanto mundialmente quanto no Brasil, uma vez que as condições epidemiológicas para a disseminação de *T. equi* são amplamente favoráveis no Brasil. O maior impacto econômico se reflete na morbidade, diminuição do potencial atlético, gastos com medicamentos, abortos e mortalidade, além da possível introdução de animais susceptíveis em área enzoótica ou de animais portadores em áreas livres (DE WALL, 1992; BOTTEON et al., 2005).

Dessa forma, o diagnóstico e identificação do agente são extremamente importantes não somente para a adoção de medidas de controle adequadas, mas também para a realização de estudos epidemiológicos envolvendo *T. equi*. O diagnóstico é baseado no exame clínico, em exames laboratoriais, na epidemiologia do(s) carrapato(s) vetor(s) naquela região e pesquisa parasitológica direta. Além disso, o diagnóstico indireto é muito utilizado e se baseia na detecção de anticorpos específicos contra *T. equi* (BRÜNNING, 1996).

A pesquisa parasitológica direta, realizada por meio do exame de esfregaço sanguíneo em microscopia óptica e visualização do parasito dentro das hemácias, constituem-se no método mais antigo e mais rotineiramente utilizado para o diagnóstico de theileriose equina. Esse método é altamente eficaz durante a fase aguda da doença, no entanto, na fase crônica, na qual equinos são portadores de *T. equi* a visualização do agente é difícil (SHEIN, 1988). Assim, esse método é altamente específico, no entanto, apresenta baixa sensibilidade quando comparado aos demais testes.

Outro método de detecção direta do parasito, o cultivo *in vitro* de *T. equi*, pode ser considerado como uma alternativa complementar aos métodos sorológicos utilizados para o diagnóstico dessa doença, uma vez que permite identificar o parasito, especialmente em equinos assintomáticos e com baixa parasitemia (ZWEYGARTH et al., 1997; HOLMAN et al., 1998). Constitui-se num método altamente sensível que pode ser usado para avaliar os efeitos do tratamento quimioterápico e para isolar amostras a campo para posterior caracterização. Entretanto, uma das desvantagens é o tempo requerido para a execução da técnica, sendo necessário o mínimo de 15 dias para o diagnóstico. De acordo com Zweygarth (1995), é possível detectar parasitos de *T. equi* já no segundo dia após o início do cultivo, mesmo em animais portadores e com parasitemias inferiores a 0,1% ou 0,2%. A confirmação de portadores crônicos de *T. equi* também pode ser realizada com eficiência pelo cultivo *in vitro* em animais sem antecedentes de theileriose clínica ou exposição ao parasita (HOLMAN et al., 1998). Zweygarth et al. (1997) demonstraram resultado positivo para *T. equi*, ao teste de cultivo, em 60% (n=36) de amostras negativas ao exame microscópico.

2.6.2 Métodos sorológicos

A identificação direta de *T. equi* por exame microscópico de esfregaço de sangue é importante somente durante a fase aguda da doença na qual há parasitemia em nível facilmente detectável. Durante a fase latente da infecção a visualização do parasito é difícil e, o resultado negativo obtido pelo exame microscópico não exclui a possibilidade de infecção (ALI et al., 1996). Em função da baixa sensibilidade do diagnóstico baseado no exame microscópico em esfregaço de sangue, vários métodos sorológicos são utilizados para o diagnóstico de theileriose equina como o TFC, a RIFI e o ELISA. Esses métodos são muito utilizados em estudos epidemiológicos, devido possuírem elevada sensibilidade e especificidade. Além disso, são indicados como método de avaliação de programas de controle, resposta a testes de vacinação e de medicamentos (WEILAND, 1986).

O TFC foi o primeiro teste sorológico aplicado para detecção de anticorpos anti-*T. equi* e, desde 1969, tem sido considerado o teste oficial para o diagnóstico da piroplasmose equina pelo “United States Department of Agriculture” (USDA) (FRIEDHOFF, 1982). Entretanto, a Organização Internacional de Epizootias (OIE) determinou que a RIFI ou mesmo o ELISA podem ser utilizados em substituição ao TFC. De acordo com Soule et al. (1984) e Brüning (1996), o TFC não detecta infecções crônicas e pode apresentar resultados falso-negativos. Isso se deve a presença de IgG(T), a qual não fixa complemento e é bastante encontrada em equinos (MCGUIRE et al., 1971). Experimentalmente, anticorpos fixadores do complemento não são detectados com menos de quatro semanas após a inoculação (KUTTLER et al., 1986).

A RIFI é amplamente utilizada em estudos soro-epidemiológico, uma vez que apresenta maior sensibilidade e especificidade na detecção de anticorpos anti-*T. equi* quando comparada ao TFC (DONNELLY et al., 1980; BALDANI et al., 2007). Embora a RIFI seja mais sensível que o TFC e raramente ocorram resultados falso-negativos (TENTER; FRIEDHOFF, 1986), a

padronização é difícil, considerando a subjetividade do leitor em avaliar os resultados (BRÜNING, 1996).

Segundo Brüning (1996), o primeiro método ELISA para diagnóstico de *T. equi* foi desenvolvido por Götz (1982). Naquela ocasião, o método apresentou maior sensibilidade quando comparado ao TFC, no entanto, baixa especificidade, evidenciada pela presença de reação cruzada entre *T. equi* e *Babesia caballi*. Resultados semelhantes foram observados posteriormente por outros autores (BÖSE; PEYMANN, 1994). Segundo esses autores, a baixa especificidade foi atribuída ao uso de antígenos brutos nos testes, principalmente eritrócitos infectados com ambos os piroplasmaídeos de equinos. No entanto, vários estudos que buscam identificar antígenos recombinantes que possam ser utilizados para aumentar a especificidade do método ELISA já foram desenvolvidos (KNOWLES et al., 1991a; BRÜNING et al., 1997; TANAKA et al., 1999; XUAN et al., 2001b,c; HIRATA et al., 2002, HIRATA et al., 2003; HUANG et al., 2006) e, provavelmente, novos serão realizados. Outra técnica, a de *Western Blotting*, tem sido utilizada como confirmatória do ELISA, uma vez que apresenta elevada especificidade (PFEIFER BARBOSA et al., 1995).

2.6.3 Métodos moleculares

Levando em consideração a baixa sensibilidade do exame microscópico de esfregaço de sangue, principalmente na fase latente da doença, e a limitação dos métodos sorológicos por detectarem apenas anticorpos e/ou a possibilidade de reações cruzadas com outros agentes, a utilização dos métodos moleculares como ferramenta de diagnóstico assume grande importância.

Segundo Hodgkinson (2006), o estímulo para o desenvolvimento de uma ferramenta molecular utilizada para detecção da infecção de equinos por piroplasmas foi a incapacidade das técnicas existentes, incluindo métodos hematológicos e imunológicos, em detectar com precisão a infecção em equinos exportados para áreas livres da doença.

Os primeiros passos para desenvolver um teste molecular no início da década de 90 contaram com sondas de DNA espécies-específicas, desenhadas para detectar parasitos em amostras de sangue de animais experimentalmente e naturalmente infectados e em animais portadores (POSNETT; AMBRÓSIO, 1989; POSNETT et al., 1991). No entanto, as técnicas baseadas na hibridização através de sondas de DNA foram substituídas pela PCR, uma vez que essa apresenta maior especificidade e menor custo quando comparado a hibridização (OHTA et al., 1995).

Vários estudos, até então, têm utilizados a ferramenta molecular de diagnóstico, baseado na PCR, para a detecção do DNA de piroplasmas (FAHRIMAL et al., 1992; FIGUEROA et al., 1993; CALDER et al 1996; BASHIRUDDIN et al., 1999). A sensibilidade desse método para detecção do DNA de *T. equi* tem mostrado ser superior àquela apresentada pelos métodos de detecção em exame microscópico de esfregaço de sangue corado ou até mesmo por sondas de DNA (RAMPERSAD et al., 2003; NICOLAIEWSKY et al., 2001; BASHIRUDDIN et al., 1999). No entanto, esses métodos ainda são relativamente demorados e requerem procedimentos um pouco complexos, como a nested PCR e/ou a hibridização para alcançar maior sensibilidade.

Portanto, há a necessidade de desenvolver técnicas mais simples, com base na PCR, que possam ser apropriadas para o uso no diagnóstico de rotina. Dessa forma, estudos mais recentes tem desenvolvido novos métodos moleculares de diagnóstico como a PCR multiplex (ALHASSAN et al., 2005) e a PCR em tempo real utilizando o sistema TaqMan (KIM et al., 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição da região estudada

O estudo foi realizado em duas microrregiões da mesorregião metropolitana do Rio de Janeiro (Figura 1).

- **Microrregião de Itaguaí** (Municípios de Itaguaí, Mangaratiba e Seropédica)

Itaguaí: 22°51'08'' latitude Sul; 43°46'31'' longitude Oeste; altitude: 13 metros.

Mangaratiba: 22°57' 36" latitude Sul; 44°02'27'' longitude Oeste; altitude: 18 metros.

Seropédica: 22°44'38'' latitude Sul; 43°42'27'' longitude Oeste; altitude: 26 metros.

O clima da microrregião de Itaguaí é caracterizado como tropical com estação seca e chuvas no verão (Aw) segundo classificação de Köppen-Geiger (PEEL et al., 2007). Este clima apresenta temperatura média do mês mais frio do ano >18°C e temperatura média máxima acima de 25°C. Estação de inverno bem definida.

- **Microrregião Serrana** (Municípios de Petrópolis e Teresópolis)

Petrópolis: 22°30'18'' latitude Sul; 43°10'44'' longitude Oeste; altitude: 809 metros.

Teresópolis: 22°24'43'' latitude Sul; 42°57'57'' longitude Oeste; altitude: 910 metros.

O clima da microrregião Serrana é considerado temperado úmido com inverno seco e verão temperado (Cwb) segundo classificação de Köppen-Geiger (PIEEL et al., 2007). Também se encontra a denominação de clima tropical de altitude. Este clima apresenta temperatura média nos três meses mais frios do ano de 10°C e nos meses mais quentes acima de 22°C. A temperatura média anual é de 18°C. As estações de verão e inverno são bem definidas.

3.2 Estudo epidemiológico e amostragem

O estudo epidemiológico foi do tipo transversal. Para a determinação do tamanho da amostra utilizou-se a prevalência esperada para *T. equi* de 80%, com base em estudos realizados na região metropolitana do Rio de Janeiro (PFEIFER BARBOSA et al., 1995; BITTENCOURT; MASSARD, 1997; BOTTEON et al., 2002; MESQUITA NETO, 2003; LARANJEIRA, 2003). O grau de confiança utilizado foi de 95% e margem de erro admitida de 5%. O número mínimo de amostras individuais de soro estabelecidas para coleta, em cada microrregião, foi de 246 amostras, segundo a equação descrita por Sampaio (2002) a seguir:

$$n = \frac{1,96^2 \times P_{\text{esp}}(1 - P_{\text{esp}})}{d^2}$$

onde: n = tamanho da amostra; P_{esp} = prevalência esperada; d^2 = precisão absoluta desejada.

Após a determinação do número mínimo de amostras a serem coletadas, a seleção das propriedades foi realizada por conveniência não probabilística. Após o consentimento do proprietário ou responsável, as amostras foram coletadas ao acaso. Em situações em que o número de equinos foi inferior a 10, a coleta foi realizada de todos os animais. Por outro lado, quando o número de animais foi superior a 10 a coleta se restringiu a 10% da população de equinos.

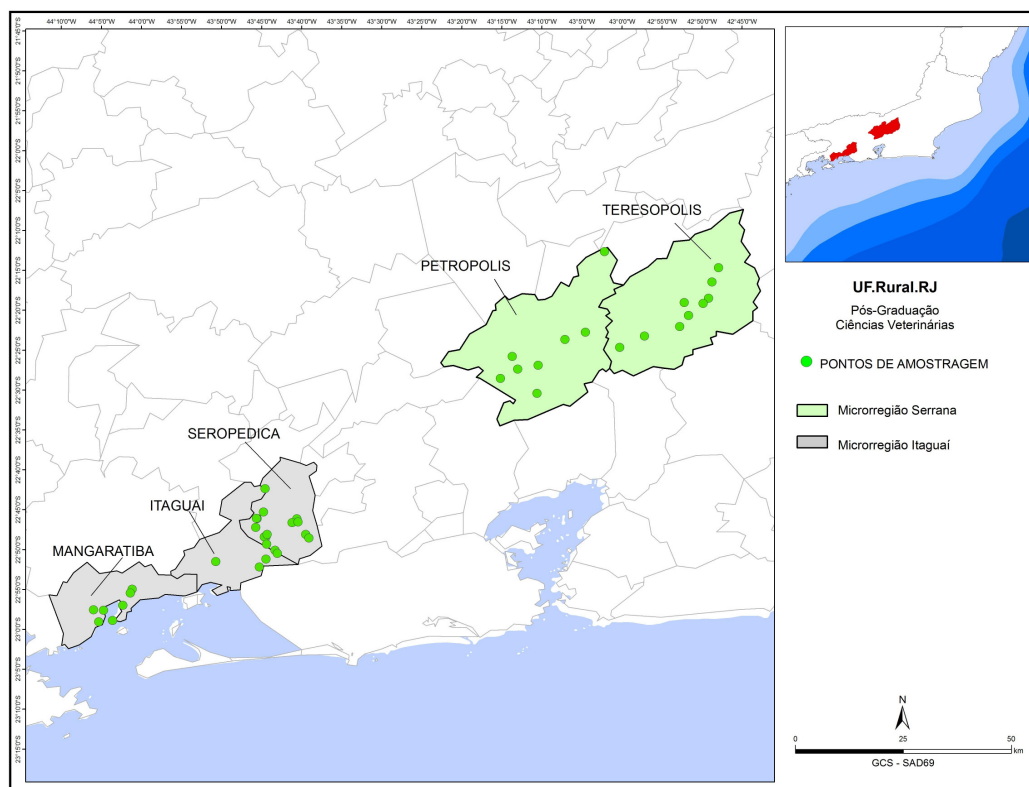


Figura 1. Localização geográfica das coletas de dados (pontos em verde) nas microrregiões de Itaguaí, com os municípios de Itaguaí, Mangaratiba e Seropédica; e Serrana com os municípios de Petrópolis e Teresópolis, no estado do Rio de Janeiro.

As coletas foram realizadas nas microrregiões de Itaguaí e Serrana, no período de janeiro a maio de 2009. Para que a amostragem nas microrregiões fosse melhor distribuída, foram coletadas amostras de 714 equídeos (equinos e muare) em 80 propriedades (31 localizadas na microrregião de Itaguaí e 49 localizadas na microrregião Serrana). Inicialmente, todos os animais foram examinados e posteriormente submetidos a coleta de sangue e carrapatos, quando presentes. Dos 714 animais examinados, 364 pertenceram à microrregião Serrana [Petrópolis (n=192) e Teresópolis (n=172)] e 350 à microrregião de Itaguaí [Itaguaí (n=116); Mangaratiba (n=90) e Seropédica (n=144)]. Em cada local de coleta a altitude foi registrada e os pontos georreferenciados com a utilização de receptores de Sistema de Posicionamento Global (GPS). O sistema de referência utilizado foi *South American Datum 1969 (SAD69)*. Para a geração do mapa de localização da área do estudo utilizou-se o *software ARC GIS® 9 da ESRI* (Figura 1).

3.3 Questionário epidemiológico

Antes da coleta de material dos equinos os proprietários ou funcionários responsáveis foram informados sobre o estudo, sua importância e se a coleta de sangue e carrapatos dos equinos poderia ser realizada. Após autorização, foi aplicado um questionário (Anexo) com o objetivo de avaliar os possíveis fatores associados (espécies de equinos, região de coleta, sexo, idade, altitude, atividade dos equinos, origem, parasitismo por carrapatos e dípteros) com a presença de anticorpos anti-*T. equi*.

3.4 Coleta de sangue e carrapatos

De cada animal foram coletadas amostras de sangue, através da punção da veia jugular, utilizando o sistema à vácuo. As amostras foram coletadas em um tubo de 10mL sem anticoagulante. Os tubos contendo as amostras de sangue foram devidamente identificados e mantidos refrigerados a 4°C até serem conduzidos ao Laboratório de Hemoparasitos e Vetores, situado na Estação para Pesquisa Parasitológica W.O. NEITZ, pertencente ao Departamento de Parasitologia Animal/ Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro situada entre os paralelos 22°41' 22°45' de latitude sul e os meridianos 43°38' 43°42' de longitude oeste de Greenwich. No laboratório, os tubos foram centrifugados a 6000 x g por 10 minutos para separação do coágulo e obtenção do soro. Em seguida, aproximadamente 1,0mL de soro foram acondicionados em microtubos de polipropileno de 1,5mL, devidamente identificados e mantidos a temperatura de -20°C até a realização do diagnóstico sorológico.

Todos os animais foram inspecionados visualmente por todo o corpo, com ênfase na região do pavilhão auricular, da cabeça, do pescoço, do peitoral, das axilas, inguinal e por fim, embaixo da cauda, para identificação de animais infestados por carrapatos. Naqueles animais parasitados, o grau de infestação por cada espécie de carrapato foi categorizado segundo Teglas et al. (2005). Equinos não parasitados, com infestação leve (1 a 20 carrapatos por animal), moderada (21 a 50 carrapatos por animal) e intensa (acima de 50 carrapatos por animal). Posteriormente, foram coletados carrapatos de cada animal e armazenados em álcool isopropílico para identificação de adultos em nível de espécie por meio de chave dicotômica apropriada (BARROS-BATTESTI et al., 2006). Além disso, a infestação por dípteros foi registrada.

3.5 Reação de imunofluorescência indireta

O substrato antigênico utilizado na RIFI foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Imunoparasitologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da Universidade Estadual Paulista. O antígeno foi composta da amostra Jaboticabal de *T. equi* (Acesso no GenBank nº. AF255730) (BALDANI et al., 2007). Resumidamente, as hemácias foram lavadas com solução salina estéril a 0,85% e a papa de hemácias resultante foi ajustada para a obtenção de uma concentração aproximada de 30 hemácias parasitadas por campo. Após secagem em temperatura ambiente, as lâminas contendo o extrato antigênico foram armazenadas a -20°C, até o momento do uso. Para realização do teste, as lâminas contendo o extrato antigênico foram incubadas com cada soro teste, diluído 1:80, em câmara úmida a 37°C por 45 minutos. Após três lavagens em solução salina tamponada (PBS), as lâminas foram incubadas com anti-imunoglobulina G de equino conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (Sigma-Aldrich®) na diluição 1:32 e observadas em microscópio equipado para fluorescência (Hund Wetzlar, modelo H600/12, Alemanha). Foram consideradas positivas as amostras de soro que apresentaram fluorescência específica para *T. equi* na diluição de 1:80 (Figura 2).

Foi utilizado como controle negativo da RIFI soro proveniente de equino livre de infecção por *T. equi* e *B. caballi*, confirmado pelo resultado negativo através da RIFI e pelo exame microscópico de esfregaço sanguíneo. Como controle positivo, utilizou-se soro de equino experimentalmente infectado com a amostra Jaboticabal de *T. equi*.

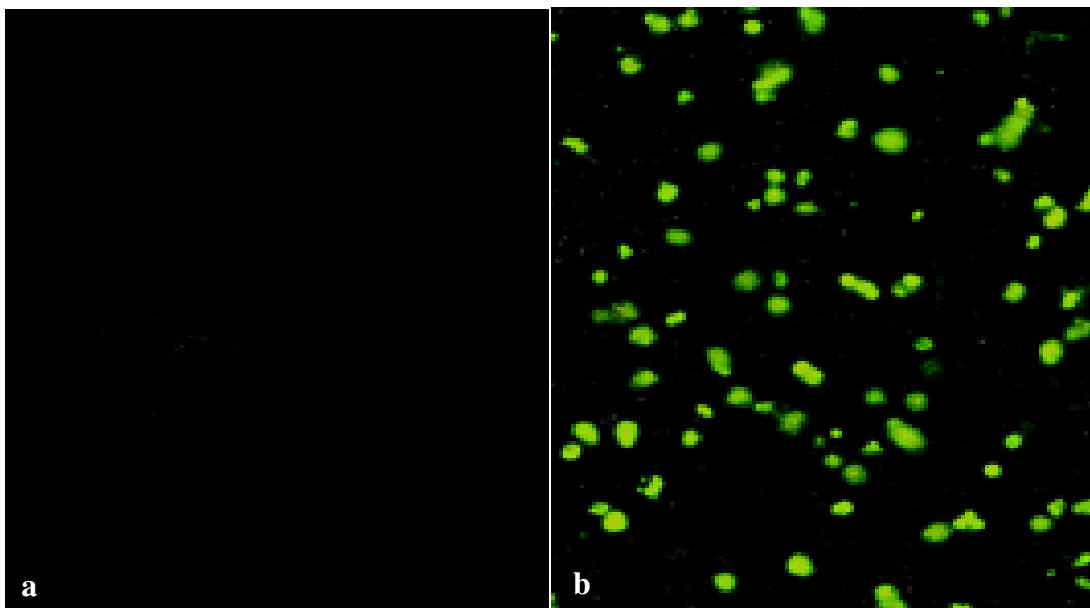


Figura 2. Reação de imunofluorescência indireta. Soro controle negativo (a) e amostra de soro equino demonstrando fluorescência específica para *Theileria equi* na diluição de 1:80 (b).

3.6 Análises estatísticas

Para a análise estatística dos dados, os animais foram agrupados nas seguintes categorias: área de coleta (microrregiões e seus municípios); altitude (<500m, ≥500<800m e ≥800 a 1004m); espécies (equina e muar), sexo, faixa etária (<6 meses, 6-12 meses, 1-3 anos, 3-5 anos, 5-10 anos e >10 anos); atividade (esporte, exposição, passeio, trabalho, reprodução e potros com atividade não determinada); sistema de criação (confinado, semiconfinado e extensivo); contato com bovinos (ausente ou presente) e origem (interna ou externa à propriedade). Além dessas categorias, as propriedades foram agrupadas em quatro níveis com base em diferentes características relacionadas à estrutura da propriedade e ao manejo sanitário dos animais, como se segue: Nível ótimo (animais criados em baias e piquetes, recebem alimentação composta de volumoso e ração, existe controle de carrapatos sistemático, os animais não apresentam infestação por carrapatos e há assistência veterinária constante); Nível bom (idem anterior, exceto que o controle de carrapato não é sistemático e os animais apresentam infestação por carrapatos); nível razoável (animais criados em baias e a pasto, há controle esporádico de carrapatos e animais apresentam infestação por carrapatos, a assistência veterinária também é esporádica); e nível ruim (animais criados apenas a pasto, não há controle de carrapatos, animais apresentam infestações por carrapatos e não há assistência veterinária).

A prevalência de anticorpos anti-*T. equi* nas diferentes microrregiões e a frequência de animais soropositivos nas demais categorias foram calculadas e, possíveis diferenças foram avaliadas através do teste de Qui-quadrado (χ^2) e Exato de Fisher em nível de 5% de significância. A razão de prevalência (RP) foi calculada para os fatores que apresentaram associação ($p < 0,05$) com a presença de anticorpos anti-*T. equi* através do programa Bioestat 4.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A prevalência de anticorpos anti-*T. equi* em equídeos das microrregiões Serrana e de Itaguaí no estado do Rio de Janeiro bem como os fatores relacionados à área de coleta estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Prevalência de anticorpos anti-*T. equi* em equídeos das microrregiões Serrana e de Itaguaí no estado do Rio de Janeiro e fatores relacionados com a área de coleta.

Fator	N	<i>Theileria equi</i>		Valor de <i>p</i>
		N	%	
Prevalência	714	579	81,09	
Microrregião				
Serrana	364	280	76,92 ^b	0,005
Itaguaí	350	299	85,43 ^a	
Município				
Itaguaí	116	104	89,66 ^a	0,021
Seropédica	144	123	85,42 ^a	
Mangaratiba	90	72	80,00 ^a	
Petrópolis	192	147	76,55 ^b	
Teresópolis	172	133	77,33 ^b	
Altitude (m)				
<500	352	300	85,23 ^a	0,021
500<800	163	125	76,69 ^b	
800<1004	199	154	77,39 ^b	
Nível da propriedade				
Ótimo	127	97	76,38 ^b	0,038
Bom	270	210	77,78 ^b	
Razoável	134	114	85,07 ^{ab}	
Ruim	183	158	86,34 ^a	

^aValores, seguidos de letras iguais, nas categorias, não diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado a 5% de significância. N: número de animais examinados pela RIFI; n: número de animais soropositivos.

Através da RIFI observou-se prevalência de anticorpos anti-*T. equi* em 81,09% (n=579) dos equídeos examinados em ambas as microrregiões. Das 80 propriedades selecionadas para coleta, apenas em duas localizadas na microrregião Serrana, os equinos examinados não apresentaram sorologia positiva para *T. equi*. A área de coleta, incluindo as microrregiões com seus respectivos municípios, apresentaram associação com a frequência de anticorpos anti-*T. equi*. A microrregião de Itaguaí apresentou prevalência de *T. equi* superior ($p < 0,05$) a observada na microrregião Serrana, com 85,43% (n=299) e 76,92% (n=280) dos equinos soropositivos, respectivamente. Nenhuma diferença na frequência de animais soropositivos para *T. equi* foi observada entre os municípios, quando avaliados dentro das microrregiões. A RP obtida através da análise univariada dos fatores que apresentaram associação (Tabela 4) revelou que equinos criados na microrregião de Itaguaí, e seus respectivos municípios, apresentaram 11% mais chance (RP=1,11; $p=0,003$) de terem contato com *T. equi* quando comparado àqueles criados na microrregião Serrana.

A prevalência de *T. equi* observada no presente estudo reforça os resultados de estudos anteriores que theileriose equina é endêmica nos municípios pertencentes à mesorregião Metropolitana do Rio de Janeiro (PFEIFER BARBOSA et al., 1995; BITTENCOURT; MASSARD, 1997; BOTTEON et al., 2002; MESQUITA NETO, 2003; LARANJEIRA, 2003). Nesses estudos a prevalência de *T. equi* variou de 73,6 a 100% de positividade, o que pode ser justificado pela diferença no número de animais examinados e o teste sorológico utilizado para diagnóstico. Poucos estudos sobre theileriose equina foram realizados na região Serrana do estado do Rio de Janeiro. Da Costa Pereira et al. (2005) observaram 21% (n=52) de positividade para *T. equi*, pelo TFC, em equinos da raça PSI em três estabelecimentos esportivos localizados nos municípios de Petrópolis, Teresópolis e Nova Friburgo. Posteriormente, equinos PSI de um estabelecimento esportivo de Nova Friburgo foram examinados pelo TFC e observaram 5,6% (n=4) de positividade para *T. equi* em três anos consecutivos (DA COSTA PEREIRA et al., 2007). Nesses dois estudos, a frequência de equinos positivos para *T. equi* está bem abaixo da observada pelo presente estudo na microrregião Serrana. Essa discordância pode ser justificada pelo baixo número de animais utilizados nestes estudos, pela restrição do estudo a estabelecimentos equestres sem abrangência para toda a região Serrana e também pela utilização do TFC como método de diagnóstico. Segundo Tenter e Friedhoff (1986) e Brüning (1996), o TFC é menos sensível que a RIFI e pode apresentar resultados falso-negativos em infecções crônicas por *T. equi*.

Estudos realizados em outros estados brasileiros observaram prevalência de *T. equi* semelhante à do presente estudo, com destaque para Minas Gerais (RIBEIRO; LIMA, 1989), São Paulo (BALDANI et al., 2004), Goiás (LINHARES, 1994) e aos estudos envolvendo mais de um estado (XUAN et al., 2001b; HEIM et al., 2007). No entanto, quando se compara os resultados do presente estudo com aqueles observados na região sul do Brasil (CUNHA et al., 1996; SOUZA et al., 2000; NIZOLI et al., 2008; GOLYNSKI et al., 2008), observa-se maior prevalência para *T. equi* nesse estudo. Essa diferença está relacionada à influência do clima da região sul no ciclo biológico de *R. (B.) microplus*. Em estudo realizado por Brun et al. (1987), observaram três gerações de *R. (B.) microplus* por ano no município de Pelotas/RS. Diferente do observado na região sudeste, na qual observou-se quatro gerações desse carrapato por ano (MAGALHÃES; LIMA, 1991).

A altitude também foi um fator que apresentou associação com a soropositividade dos equinos para *T. equi* ($p=0,021$). Os equinos criados a altitude inferior a 500m apresentaram maior frequência de anticorpos anti-*T. equi* quando comparado àqueles criados em altitude de 500<800m e de 800<1004m, com 85,23% (n=300), 76,69% (n=125) e 77,39% (n=154) de animais soropositivos, respectivamente (Tabela 1). Dessa forma, equinos criados a altitudes acima de 500m apresentaram 10% de chance a menos (RP=0,90; $p<0,05$) de se tornarem soropositivos (Tabela 4). Isso demonstra que o aumento da altitude reduz a possibilidade de infecção dos equinos.

O nível das propriedades mostrou estar associado ($p=0,038$) com a positividade dos equinos para *T. equi*. Equinos criados em propriedades consideradas de nível ótimo e bom apresentaram menor ($p<0,05$) frequência de animais soropositivos quando comparados aqueles criados em propriedades de nível razoável e ruim, respectivamente, com 76,38% (n=97), 77,78% (n=210), 85,07% (n=114) e 86,34% (n=158) de animais positivos. Com base nesses resultados, equinos criados em propriedades consideradas de nível ruim apresentaram 13% mais chance (RP=1,13; $p=0,018$) de terem contato com *T. equi* quando comparado aqueles criados em propriedades de nível razoável, bom ou ótimo (Tabela 4).

A prevalência de anticorpos anti-*T. equi* em equídeos das microrregiões Serrana e de Itaguaí no estado do Rio de Janeiro e os fatores relacionados aos animais podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2. Prevalência de anticorpos anti-*T. equi* em equídeos nas microrregiões Serrana e de Itaguaí do estado do Rio de Janeiro e fatores relacionados aos animais.

Fator	N	<i>Theileria equi</i>		Valor de <i>p</i>
		n	%	
Prevalência	714	579	81,09	
Espécie				
Equina	702	569	84,05 ^a	0,432
Muar	12	10	83,30 ^a	
Sexo				
Macho	416	334	80,29 ^a	0,581
Fêmea	298	245	82,21 ^a	
Faixa etária				
<6 meses	30	27	90,00 ^a	0,166
6-12 meses	32	28	87,50 ^a	
1-3 anos	85	70	82,35 ^a	
3-5 anos	92	73	79,35 ^a	
5-10 anos	276	211	76,45 ^a	
>10 anos	199	170	85,43 ^a	
Atividade				
Esporte	279	229	82,08 ^a	0,375
Exposição	47	40	85,11 ^a	
Passeio	146	111	76,03 ^a	
Trabalho	111	87	78,38 ^a	
Reprodução	108	92	85,19 ^a	
ND (Potro)	23	20	86,96 ^a	
Sistema de criação				
Confinado	52	38	73,08 ^a	0,279
Semiconfinado	498	405	81,33 ^a	
Extensivo	164	136	82,93 ^a	
Contato com bovinos				
Não	521	427	81,96 ^a	0,388
Sim	193	152	78,76 ^a	
Origem				
Interna	218	189	86,70 ^a	0,015
Externa	496	390	78,63 ^b	

^aValores, seguidos de letras iguais, nas categorias, não diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado a 5% de significância. N: número de animais examinados pela RIFI; n: número de animais soropositivos; ND: não determinada.

Não houve associação entre a sorologia e as espécies avaliadas, com 81,1% (n=569) e 83,3% (n=10) de soropositividade observada para equinos e muares, respectivamente. Devido ao

pequeno número de mulas examinados, comparado ao de equinos, o resultado observado no presente estudo não pode ser generalizado até que um número maior desses animais seja incluído em estudos futuros.

O sexo dos animais não apresentou associação com a frequência de anticorpos anti-*T. equi* (Tabela 2). Esse resultado corrobora os já descritos na literatura (SHKAP et al., 1998; SOUZA et al., 2000; BOTTEON et al., 2002; KOUAM et al., 2010). No entanto, fraca associação ($p < 0,047$; OR=1,498) foi observada por Moretti et al. (2010). Nesse estudo os animais foram examinados pela RIFI e as fêmeas apresentaram maior frequência de anticorpos anti-*T. equi* quando comparada aos machos, semelhante ao observado no presente estudo, porém, sem haver qualquer associação.

Anticorpos anti-*T. equi* foram detectados em todas as faixas etárias avaliadas e nenhuma associação com a positividade dos equinos foi observada. Os potros com idade inferior a seis meses foram os que apresentaram maior frequência de anticorpos anti-*T. equi* quando comparado aos animais com idade superior. Isso pode ser justificado, pelo menos em parte, pela presença de anticorpos de origem materna, os quais podem persistir por três a cinco meses (DONNELLY et al., 1982; HEUCHERT et al., 1999). Animais com faixa etária de seis a 12 meses apresentaram 87,5% (n=28) de soropositividade para *T. equi*. Considerando a ausência de anticorpos de origem materna nesse grupo, pode-se sugerir que a primeira infecção por *T. equi* ocorreu nessa faixa etária ou mesmo antes, quando ainda estava presente a imunidade passiva. A partir daí, a frequência de anticorpos manteve-se praticamente uniforme com aumento não significativo nos animais com idade acima de dez anos, 85,42% (n=170). Isso pode explicar a ausência de sinais clínicos de theileriose equina nos animais examinados, já que uma vez infectados com *T. equi* permanecem portadores durante toda vida (FRIEDOFF, 1988; DE WALL, 1992) e são reservatórios importantes de infecção para carrapatos vetores (UETI et al., 2008). A soropositividade acima de 75% observada em animais na faixa etária de seis a 12 meses caracteriza as microrregiões estudadas como de estabilidade enzoótica para *T. equi* (MAHONEY; ROSS, 1972). A ausência de associação da idade com a soropositividade dos animais para *T. equi*, observada no presente estudo, corrobora os resultados encontrados por outros autores (SHKAP et al., 1998; SOUSA et al., 2000; BOTTEON et al., 2002; KARATEPE et al., 2009; MORETTI et al., 2010). No entanto, discorda de outros (RIBEIRO et al., 1999; RÜEGG et al., 2007; KOUAM et al., 2010). Essa discordância de resultados pode ser justificada, pelo menos em parte, pelas diversas formas de categorização da idade constatadas na literatura acima citada. Além disso, a associação da idade com a positividade dos animais para *T. equi* descrita na literatura pode ter ocorrido devido ao número reduzido de animais em algumas categorias, fator que é determinante para análise dos dados.

A atividade, o sistema de criação dos equinos e o contato deles com bovinos não apresentaram associação com a frequência de anticorpos anti-*T. equi* (Tabela 2). No entanto, observou-se aumento não significativo na soropositividade para *T. equi* nos animais utilizados em exposições, 85,1% (n=40), naqueles utilizados para reprodução, 85,19% (n=92), em esportes, 82,08% (n=229) e em potros com atividade ainda não definida, 86,96% (n=20), quando comparados com os utilizados para passeio e trabalho. Os maiores percentuais observados em animais que participam de exposições e de modalidades esportivas se justificam, tanto pelo estresse causado no treinamento para as provas quanto no deslocamento para competições (HAILAT et al., 1997). Já naqueles destinados à reprodução, a justificativa pode ser a maior exposição desses animais a infestações por carrapatos, uma vez que são criados, em sua maioria, no sistema semiconfinado ou extensivo.

Mesmo não havendo diferença em relação ao sistema de criação, também observou tendência de aumento na positividade dos equinos criados no sistema semiconfinado e extensivo quando comparado aos criados confinado, com 81,33% (n=405), 82,93% (n=136) e 73,08% (n=38), respectivamente. Isso se justifica pelo fato de 75,6% (n=124) e 13,9% (n=69) dos animais criados, respectivamente, no sistema extensivo e semiconfinado terem maior contato com bovinos (dados não mostrados) e consequentemente com *R. (B.) microplus*. Esse carrapato é o único vetor biológico conhecido capaz de transmitir *T. equi*, tanto pela forma transestadial como intra-estadial, no Brasil e nos EUA (GUIMARÃES et al., 1998b; UETI et al., 2005, 2008). A importância do contato de equinos com bovinos está relacionado a dependência existente entre o parasitismo por *R. (B.) microplus* em equinos e a presença de bovinos na mesma área (LABRUNA et al., 2001). No entanto, o contato de equinos com bovinos não apresentou associação com a soropositividade para *T. equi*, provavelmente, em função da área estudada ser de estabilidade enzoótica para esse agente. Além disso, outras formas de transmissão são possíveis, como através de fômites contaminados, de forma congênita ou transplacentária (PHIPPS; OTTER, 2004; ALLSLOP et al., 2007; SANTOS et al., 2008) e ainda pela picadas de dípteros hematófagos (GERSTENBERG et al., 1998), porém, sem confirmação. Resultados semelhantes foram observados por Botteon et al. (2002), uma vez que esses autores observaram 89,58% (n=43) e 87,09% (n=27) de soropositividade para *T. equi* para equinos criados, respectivamente, no sistema extensivo e semiconfinado. No entanto, observaram diferença ($p < 0,05$) na soropositividade quando compararam aos equinos confinados, com 45,24% (n=19). Essa diferença não foi observada no presente estudo, o que pode ter sido influenciado pelo número reduzido de animais avaliados nesse grupo (n=52) quando comparado aos demais.

A origem dos equinos apresentou associação ($p=0,015$) com a soropositividade para *T. equi*. Equinos nascidos na propriedade apresentaram frequência de anticorpos anti-*T. equi* superior a observada naqueles de origem externa, com 86,7% (n=189) e 78,63% (n=390), respectivamente (Tabela 2). A RP demonstrou que os animais nascidos na propriedade apresentaram 10% de chance a mais (RP=1,10; $p=0,008$) de se tornarem soropositivos para *T. equi* quando comparados aos de origem externa, ou seja, introduzidos na propriedade. Essa diferença pode representar características particulares das propriedades estudadas como, por exemplo, medidas adotadas para o controle de carrapatos ou outras que possam oferecer risco de infecção dos animais. Como se trata de uma área endêmica para a theileriose equina e de estabilidade enzoótica para *T. equi*, equinos introduzidos de outras regiões ou até mesmo países podem ainda não terem sido infectados.

Os carrapatos coletados parasitando os equinos foram identificados como sendo das espécies *A. cajennense*, *D. (A.) nitens* e *R. (B.) microplus*. Essa última espécie foi encontrada somente em dois equinos e não foi incluída na análise. Primeiramente, avaliou-se a positividade dos equinos para *T. equi* em função da presença ou não de ao menos uma das espécies acima parasitando os equinos. O parasitismo foi observado em 82,54% (n=279) dos animais, no entanto, não houve associação com a soropositividade (Tabela 3). Posteriormente, a positividade dos equinos foi avaliada em função do grau de infestação por *A. cajennense* e por *D. nitens*, separadamente, e nenhuma associação ($p > 0,05$) também foi observada. Em ambas as situações, percebe-se aumento não significativo na frequência de animais soropositivos à medida que o grau de infestação pelos carrapatos se intensifica. Infestação de moderada a intensa, por *D. nitens* e *A. cajennense* foi observada, respectivamente, em 17,09% (n=122) e em 14,16% (n=101) dos animais soropositivos para *T. equi*.

Tabela 3. Prevalência de anticorpos anti-*T. equi* em equídeos nas microrregiões Serrana e de Itaguaí do estado do Rio de Janeiro e fatores relacionados ao parasitismo por carrapatos e *Stomoxys calcitrans*.

Fator	N	<i>Theileria equi</i>		Valor de p
		n	%	
Prevalência	714	579	81,09	
Carrapatos				
Ausente	376	300	79,79 ^a	0,399
Presente	338	279	82,54 ^a	
Grau de infestação (<i>Amblyomma cajennense</i>)				
Ausente	376	300	79,79 ^a	0,576
Leve	220	178	80,91 ^a	
Moderada	76	65	85,53 ^a	
Intensa	42	36	85,71 ^a	
Grau de infestação (<i>Dermacentor nitens</i>)				
Ausente	487	391	80,29 ^a	0,536
Leve	78	66	84,62 ^a	
Moderada	97	82	84,54 ^a	
Intensa	52	40	76,92 ^a	
<i>Stomoxys calcitrans</i>				
Ausente	425	343	80,71 ^a	0,824
Presente	289	236	81,67 ^a	

^aValores, seguidos de letras iguais, nas categorias, não diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado a 5% de significância. N: número de animais examinados pela RIFI; n: número de animais soropositivos.

A constatação do parasitismo pelas três espécies de carrapatos no presente estudo corrobora os resultados observados em estudos realizados no Brasil (BORGES; LEITE, 1998; PFEIFER et al., 1992; LINHARES, 1994; HEUCHERT et al., 1999; LABRUNA et al., 2001; DA COSTA PEREIRA et al., 2005; KERBER et al., 2009). Diferente do observado no presente estudo, houve associação ($p < 0,001$) da positividade para *T. equi*, pelo TFC e cELISA, com o baixo nível de infestação por *D. nitens* (menos de dez carrapatos por animal) e com o alto nível de infestação por *A. cajennense* (mais que 10 carrapatos adultos por animal) (KERBER et al., 2009). Essa discordância pode ser justificada pela diferente categorização do grau de infestação realizada por esses autores, a qual foi composta de apenas três graus de parasitismo, além da análise ter sido agrupada por propriedades e não por animal, como no presente estudo. Além disso, *D. nitens* e *A. cajennense* não são capazes de transmitir *T. equi* (DENNING, 1988), o que justifica a ausência de associação com a soropositividade dos equinos observada no presente estudo e no estudo realizado por Rüegg et al. (2007).

Além do parasitismo por carrapatos, 81,67% (n=236) dos animais estavam sendo parasitados por *Stomoxys calcitrans*. No entanto, não houve associação da frequência de anticorpos anti-*T. equi* com o parasitismo por essa mosca. Dípteros hematófagos são incriminados como possíveis vetores mecânicos de *T. equi* (GERSTENBERG et al., 1998), porém, sem nenhuma confirmação científica, o que provavelmente justifica a ausência de associação observado no presente estudo.

Tabela 4. Razão de prevalência (RP) entre a frequência de anticorpos anti-*Theileria equi* através da RIFI e fatores associados à soropositividade dos equinos.

Fator	N	<i>Theileria equi</i>		RP	IC a 95%	Valor de <i>p</i>
		n	%			
Microrregião						
Serrana	364	280	76,92	1		
Itaguaí	350	299	85,43	1,11	1,03 a 1,19	0,003
Município						
Petrópolis	192	147	76,55	1		
Teresópolis	172	133	77,33	1,01	0,90 a 1,13	0,481
Itaguaí	116	104	89,66	1,17	1,06 a 1,29	0,003
Seropédica	144	123	85,42	1,12	1,01 a 1,24	0,030
Mangaratiba	90	72	80,00	1,04	0,92 a 1,19	0,311
Altitude (m)						
<500	352	300	85,23	1		
500<800	163	125	76,69	0,90	0,82 a 0,99	0,012
800<1004	199	154	77,39	0,91	0,83 a 0,99	0,014
Nível da propriedade						
Ótimo	127	97	76,38	1		
Bom	270	210	77,78	1,02	0,91 a 1,14	0,428
Razoável	134	114	85,07	1,11	0,99 a 1,26	0,052
Ruim	183	158	86,34	1,13	1,01 a 1,27	0,018
Origem						
Externa	496	390	78,63	1		
Interna	218	189	86,70	1,10	1,03 a 1,18	0,008

N: número de animais examinados pela RIFI; n: número de animais soropositivos; IC: intervalo de confiança.

Exceto a origem dos animais, os fatores que influenciaram significativamente a soropositividade dos equinos para *T. equi* foram aqueles relacionados com a área de coleta. Isso demonstra claramente que as microrregiões de Itaguaí e Serrana apresentam características edafoclimáticas distintas, as quais estariam influenciando na epidemiologia da theileriose equina nessas regiões.

Com base nessa observação, as microrregiões foram avaliadas em função da presença ou ausência de carrapatos e *S. calcitrans* parasitando os animais, bem como do grau de infestação por carrapatos nos animais examinados. Na Figura 3 observa-se que o número de animais infestados por pelo menos uma das espécies de carrapatos, ou *A. cajennense* ou *D. (A.) nitens*, foi maior na microrregião de Itaguaí, 35,2% (n=251), quando comparado com a microrregião Serrana, 12,2% (n=87). Mesmo não havendo associação da soropositividade dos animais com a presença de carrapato, observa-se claramente que a microrregião de Itaguaí possui características que permitem melhores condições para a manutenção da população de carrapatos.

Posteriormente, o grau de infestação dos equinos por *A. cajennense* foi avaliado nas duas microrregiões (Figura 4). Observou-se maior número de equinos da microrregião Serrana não infestados por *A. cajennense* quando comparado aos da microrregião de Itaguaí, com, respectivamente, 38,8% (n=277) e 13,9% (n=99) de animais examinados. Além disso, um número maior de animais da microrregião de Itaguaí apresentou grau de infestação mais elevado do que o observado nos equinos da microrregião Serrana.

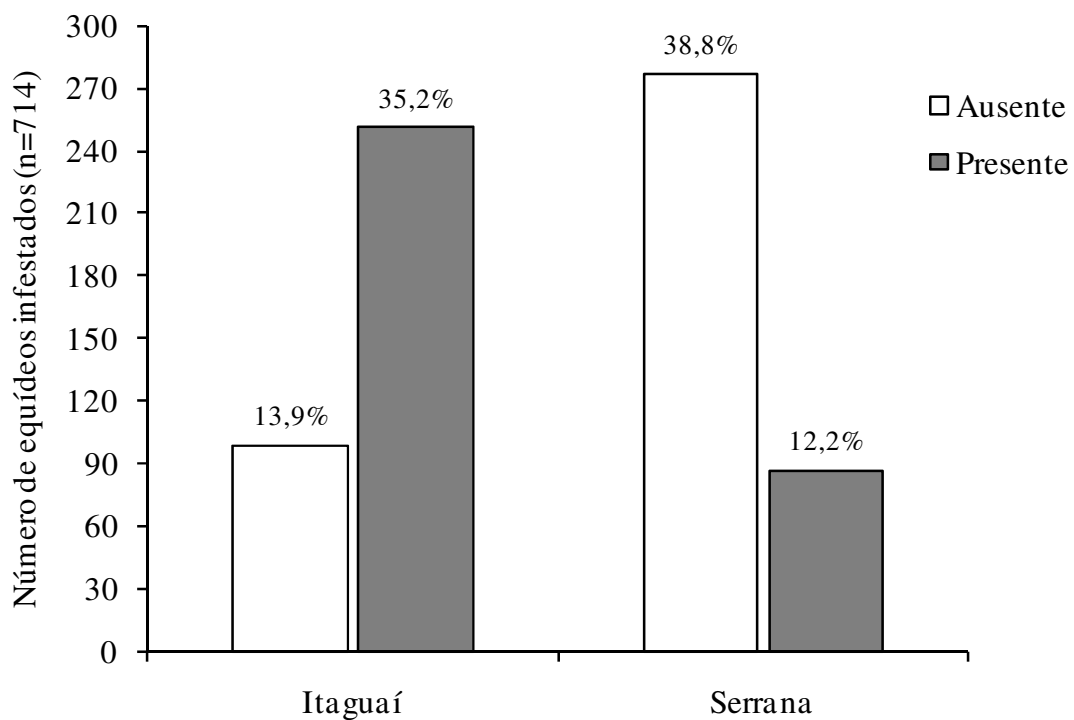


Figura 3. Número de equídeos infestados por *Amblyomma cajennense* e/ou *Dermacentor (Anocentor) nitens* nas microrregiões de Itaguaí e Serrana do estado do Rio de Janeiro.

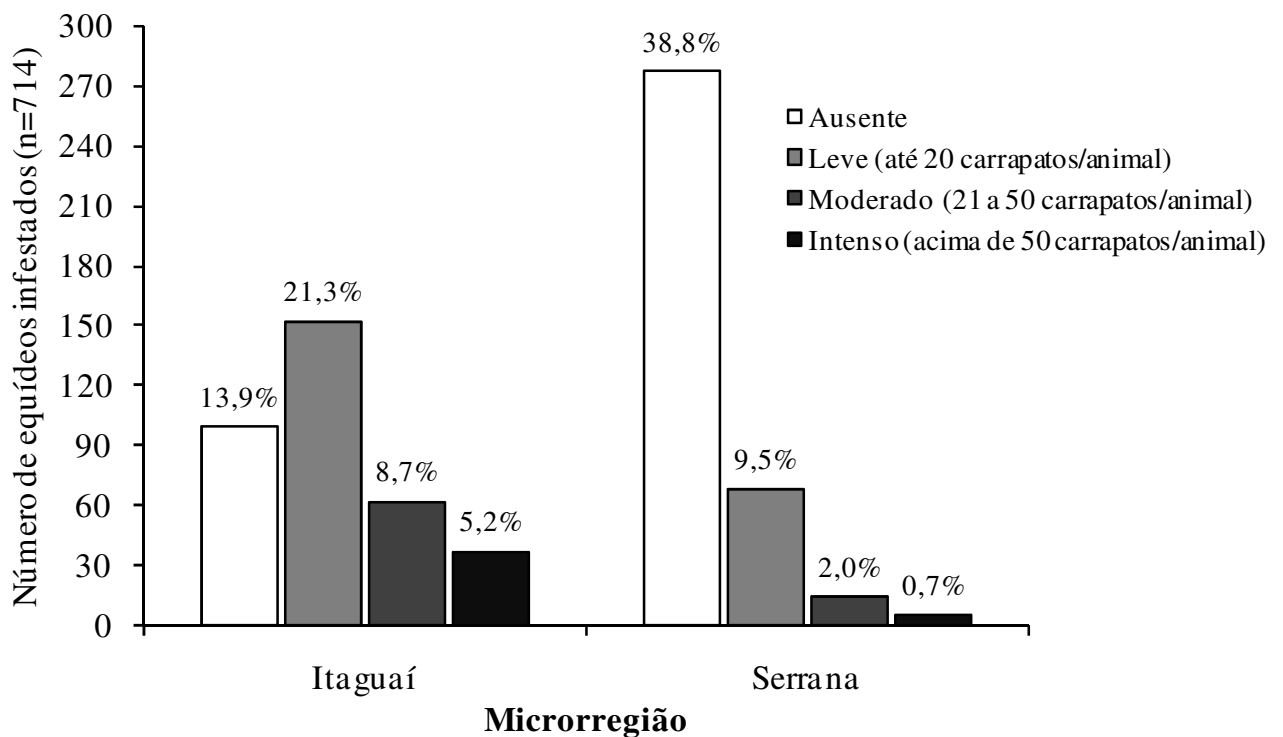


Figura 4. Número de equídeos infestados e grau de infestação por *Amblyomma cajennense* nas microrregiões de Itaguaí e Serrana do estado do Rio de Janeiro.

Resultado muito semelhante ao observado para *A. cajennense* também foi constatado para *D. (A.) nitens* (Figura 5). No entanto, pode-se observar que o número de animais não parasitados por *D. (A.) nitens* foi maior que o observado por *A. cajennense*, em ambas as microrregiões. A distribuição dos animais em função do grau de infestação também foi semelhante, exceto os 12,5% (n=89) de animais da microrregião de Itaguaí com grau de infestação moderado.

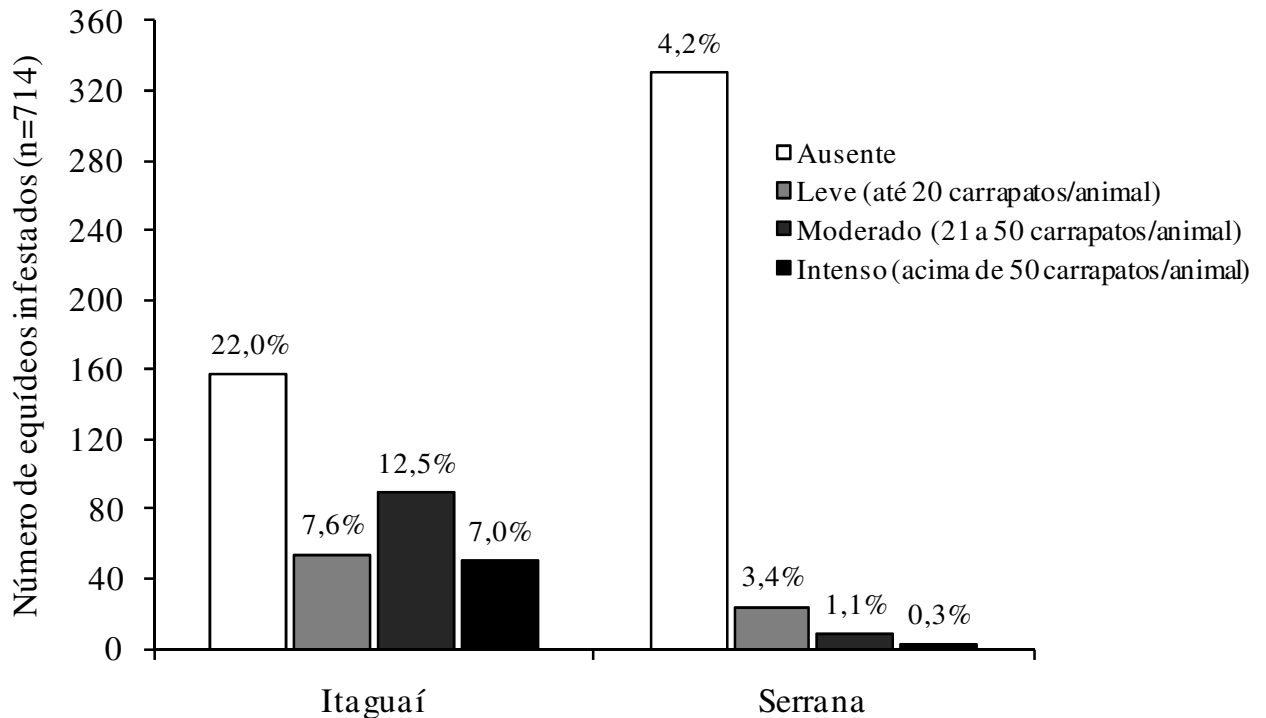


Figura 5. Número de equídeos infestados e grau de infestação por *Dermacentor (Anocentor) nitens* nas microrregiões de Itaguaí e Serrana do estado do Rio de Janeiro.

A infestação por *S. calcitrans* foi mais evidente nos animais da microrregião Serrana quando comparado aos da microrregião de Itaguaí, com, respectivamente, 24,9% (n=178) e 15,5% (n=110) dos animais infestados (Figura 6). Isso se justifica pela grande quantidade de matéria orgânica que é utilizada em hortaliças, cultura característica do município de Teresópolis, ambiente favorável ao desenvolvimento das fases larvares de *S. calcitrans* (COOK et al., 1999).

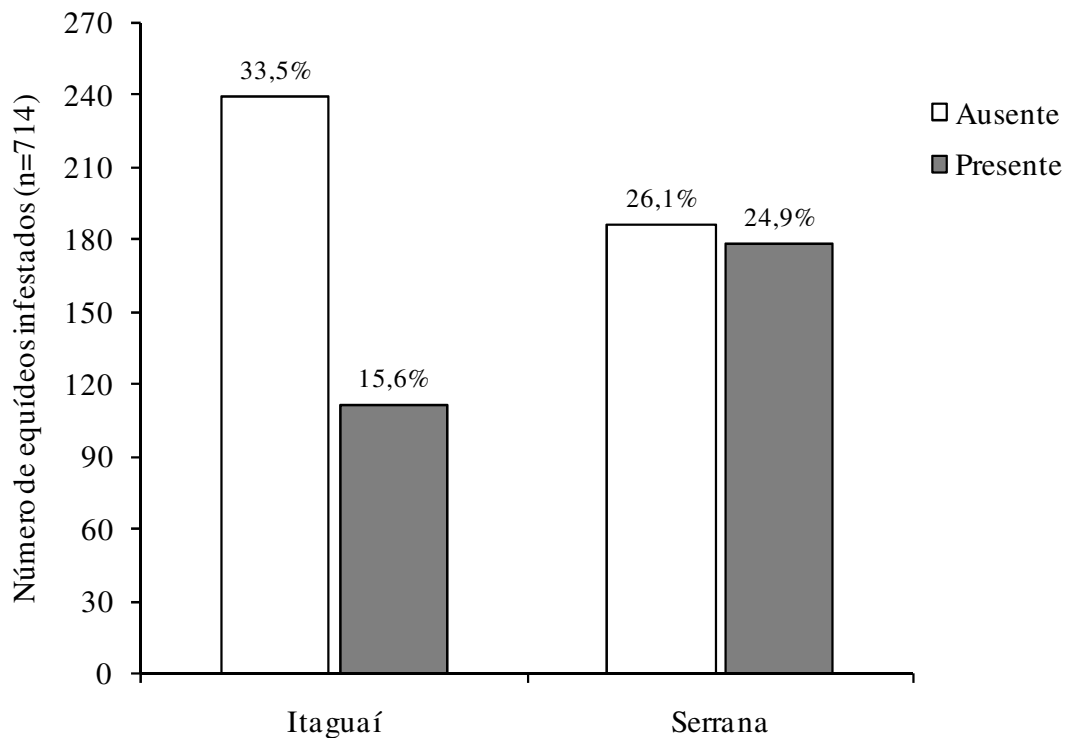


Figura 6. Número de equídeos infestados por *Stomoxys calcitrans* nas microrregiões de Itaguaí e Serrana do estado do Rio de Janeiro.

Esses resultados demonstram maior distribuição de *A. cajennense* nas microrregiões estudadas, o que justifica o maior número de animais infestados por esse carrapato em ambas as regiões, quando comparado com a infestação por *D. (A.) nitens*. Segundo Kerber et al. (2009), a associação estatística entre a abundância de *A. cajennense* e a presença de mais que 30% dos equinos positivos para *T. equi* sugere que esse carrapato poderia atuar como vetor desse agente em condições naturais. Segundo esses autores, essa indicação epidemiológica está reforçada pelo fato dos equinos examinados serem jovens, com idade entre seis e 24 meses, nunca terem saído da área da propriedade e nunca terem recebido transfusão de sangue ou plasma. Além disso, nenhuma das fazendas tinha bovinos há pelo menos 36 meses, período superior ao da idade dos equinos examinados. Essa observação não pode ser aplicada ao presente estudo, uma vez que muito dos animais examinados aqui apresentam idade superior a 24 meses. Além disso, muitos equinos já saíram da área da propriedade por algum motivo. No entanto, não se pode descartar a possibilidade de *A. cajennense* e, até mesmo *D. (A.) nitens* e *S. calcitrans*, atuarem como vetor de *T. equi*, o que justificaria, pelo menos em parte, a condição de estabilidade enzoótica das microrregiões estudadas.

5 CONCLUSÕES

A prevalência de *T. equi* é maior na microrregião de Itaguaí quando comparada a microrregião Serrana. No entanto, ambas as microrregiões são endêmicas para theileriose equina e consideradas de estabilidade enzoótica para *T. equi*.

Equinos criados na microrregião Serrana, em altitudes abaixo de 500 metros, em propriedades consideradas de nível ruim e que são de origem interna (nascidos na propriedade) apresentam maior chance de serem infectados por *T. equi*. Isso demonstra que apenas os fatores relacionados à área de coleta influenciam a soropositividade dos equinos para *T. equi* nas microrregiões estudadas.

Nas microrregiões de Itaguaí e Serrana a espécie animal, o sexo, a idade, a atividade dos equinos, o sistema de criação, o contato dos equinos com bovinos e a infestação por carrapatos não apresentam associação com a soropositividade para *T. equi*.

Amblyomma cajennense está mais amplamente distribuído nas microrregiões Serrana e de Itaguaí, quando comparado com *D. (A.) nitens*. No entanto, ambos os carrapatos são responsáveis por infestações de moderadas a intensas em equinos, principalmente na microrregião de Itaguaí.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE, D.H.; CAFRUNE, M.M.; RADA, M.; TORIONI de ECHAIDE, S. Babesiosis Clínica en Equinos de Cerrillos, Salta, Argentina. **RIA**, v.33, n.3, p.123-133, 2004.
- ALHASSAN, A. et al. Development of a single-round and multiplex PCR method for the simultaneous detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in horse blood. **Veterinary Parasitology**, v.129, n.1-2, p.43-49, 2005.
- ALI, S.; SUGIMOTO, C.; ONUMA, M. Equine Piroplasmosis. **Journal Equine Science**, v.7, n.4, p.67-77, 1996.
- ALLSOP, M.T.E.P.; LEWIS, B.D.; PENZHORN, B.L. Molecular evidence for transplacental transmission of *Theileria equi* from carrier mares to their apparently healthy foals. **Veterinary Parasitology**, v.148, n.2, p.130-136, 2007.
- ALSAAD, K.M.; ALSAAD, E.A.; AL-DERAWIE, H.A. Clinical and diagnostic study of equine babesiosis in drought horses in some areas of Basrah Province. **Research Journal of Animal Science**, v.4, n.1, p.16-22, 2010.
- AMBAWAT, H.K.; MALHOTRA, D.V.; KUMAR, S.; DHAR, S. Erythrocyte associated haemato-biochemical changes in *Babesia equi* infection experimentally produced in donkeys. **Veterinary Parasitology**, v.85, n.4, p.319-324, 1999.
- AVARAZED, A. De Waal DT, IGARASHI, I.; SAITO, A.; OYAMADA, T.; TOYODA, Y.; SUZUKI, N. Prevalence of equine piroplasmosis in central Mongolia. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, Pretoria, v.64, n.2, p.141-145, 1997.
- BAKOS, E. Prevalencia de la piroplasmosis equina (*Babesia equi*) en la provincia del Chaco, por medio de la inmunodifusión. **Gaceta Veterinaria**, v.43, n.364, p.773-774, 1981.
- BALDANI, C.D.; MACHADO, R.Z.; BOTTEON, P.T.L.; TAKAKURA, F.S.; MASSARD, C.L. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of IgG antibodies against *Babesia equi* in horses. **Ciência Rural**, v.34, n.5, p.1525-1529, 2004.
- BALDANI, C.D.; MACHADO, R.Z.; RASO, T.F.; PINTO, A.A. Serodiagnosis of *Babesia equi* in horses submitted to exercise stress. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n.4, p.179-183, 2007.
- BARROS-BATTESTI, D.M.; ARZUA, M.; BECHARA, G.H. 2006. **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies**. ed. VOX/ICTTD-3/BUTANTAN, 1th ed., pp. 223. São Paulo, SP.
- BASHIRUDDIN, J.B.; CAMMA, C.; REBELO, E. Molecular detection of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horse blood by PCR amplification of part of the 16S rRNA gene. **Veterinary Parasitology**, v.84, n.1-2, p.75-83, 1999.
- BATTSETSEG, B., LUCERO, S.; XUAN, X.; CLAVERIA, F. G.; INOUE, N.; ALHASSAN, A.; KANNO, T.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; MIKAMI, T.; FUJISAKI, K. Detection of natural infection of *Boophilus microplus* with *Babesia equi* and *Babesia caballi* in Brazilian horses using nested polymerase chain reaction. **Veterinary Parasitology**, v.107, n.4, p.351-357, 2002.

- BHOORA, R.; QUAN, M.; FRANSSEN, L.; BUTLER, C.M.; VAN DER KOLK, J.H.; GUTHRIE, A.J.; ZWEYGARTH, E.; JONGEJAN, F.; COLLINS, N.E. Development and evaluation of real-time PCR assays for the quantitative detection of *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses from South Africa. **Veterinary Parasitology**, v.168, n.3-4, p.201–211, 2010.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L. Aspectos epidemiológicos da babesiose equina na Microregião Fluminense do Grande Rio-Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v.4, n.1, p.13-17, 1997.
- BOCH, J. *Babesia* infections in horses, cattle and dogs in southern Germany. **Tierarztl Prax, Suppl.** 1, p.3-7, 1985.
- BOLDBAATAR, D. et al. Epidemiological study of equine piroplasmiasis in Mongolia. **Veterinary Parasitology**, v.127, n.1, p.29-32, 2005.
- BORGES, L.M.F.; LEITE, R.C. Ixodological populations of the ears of equines in Minas Gerais and Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v.50, n. 1, p.87-89, 1998.
- BÖSE, R.; PEYMAN, B. Diagnosis of *Babesia caballi* infections in horses by enzyme-linked immunosorbent assay and western blot. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.24, n.3, p.341-346, 1994.
- BOTTEON, P.T.L.; BOTTEON, R.C.C.M.; REIS, T.P.; MASSARD, C.L. Babesiose em cavalos atletas portadores. **Ciência Rural**, v.35, n.5, p.1136-1140, 2005.
- BOTTEON, P.T.L.; MASSARD, C.L.; BOTTEON, R.C.C.M.; LOSS, Z.G.; LINHARES, G.F.C. Seroprevalência de *Babesia equi* em três diferentes sistemas de criação de equinos. Rio de Janeiro-Brasil. **Parasitologia Latinoamericana**, v.57, n.3-4, p.141-145, 2002.
- BRÜNING, A. Equine piroplasmiasis an update on diagnosis, treatment and prevention. **The British Veterinary Journal**, v.152, n.2, p.139-151, 1996.
- BRUM, J.G.W.; COSTA, P.R.P.; RIBEIRO, P.B.; GONZALES, J.C. Flutuação sazonal de *B. microplus* (Canestrini, 1887) no município de Pelotas, RS. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.39, n.6, p.891-896, 1987.
- BRUNING, A. et al. Monoclonal antibodies against *Babesia caballi* and *Babesia equi* and their application in serodiagnosis. **Veterinary Parasitology**, v.68, n.1-2, p.11-26, 1997.
- CALDER, J.A.; REDDY, G.R.; CHIEVES, L.P.; COURTNEY, C.H.; LITTELL, R.; LIVENGOOD, J.R.; NORVAL, R.A.; SMITH, C.; DAME, J.B. Monitoring *Babesia bovis* infections in cattle by using PCR-based tests. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.11, p.2748–2755, 1996.
- CAMACHO, A.T; GUITIAN, F.J; PALLAS, E; GESTAL, J.J; OLMEDA, A.S; HABELA, M.A; TELFORD, S.R; SPIELMAN, A. *Theileria (Babesia) equi* and *Babesia caballi* infections in horses in Galicia, Spain. **Tropical Animals Health and Production**, v.37, n.4, p.293-302, 2005.
- CARINI, A. Sobre uma piroplasmose equina observada em São Paulo. **Arquivo da Sociedade de Medicina Cirúrgica de São Paulo**, v.1, n.1, p.63-66, 1910.

CARPIO, J. Primer hallazgo de babesiosis equina por *Babesia equi*. **Revista de Investigaciones Agropecuária**, v.1, n.1, p.177-183, 1972.

COLETO, L. Equine babesiosis: a diseases linked to the extensive horse raising and the pasture land of Extremadure ('dehesa'). **Cahiers Options Méditerranéennes**, v.39, n.9, p.273-276, 1999.

COLMAN, O.L.R.; BOBADILLA DE MENDOZA, N.Y.; BRUNEL, C.M.; BULMAN, M. Primera cita de la tasa de prevalencia serológica de babesiosis (piroplasmosis) equina (*Babesia equi*, Laveran 1901) en la provincia de Formosa (República Argentina) con el simultáneo análisis comparativo de la tasa de anemia infecciosa equina (AIE). **Revista Militar Veterinaria**, v.30, n.1, p.29-34, 1982.

COOK, D.F.; DADOUR, I.R.; KEALS, N.J. Stable fly, house fly (Diptera: Muscidae), and other nuisance fly development in poultry litter associated with horticultural crop production. **Journal of Economic Entomology**, v.92, n.6, p.1352-1357, 1999.

CORDERO del CAMPILLO, M.; ORDÁZ ALVAREZ, J.; ROJO VÁZQUEZ, F.A.; ESCUDERO DIAZ, A. Equine babesia infection in Spain. **Trabajos de la Estación Agrícola Experimental de León**, v.11, n.1, p.11-22, 1974.

CUNHA, C.W.; DA SILVA, S.S.; PIMENTEL, C.A.; DAPPER, E. Avaliação da frequência de equinos soropositivos a *Babesia equi* no Jóquei Clube de Pelotas e em dois haras da zona sul do Rio Grande do Sul, RS. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.5, n.2, p. 119-122, 1996.

CUNHA, C.W.; SILVA, S.S.; OSÓRIO, B.L.; DUTRA, C.L. Alterações hematológicas e sorológicas em eqüinos experimentalmente infectados com *Babesia equi*. **Ciência Rural**, v.28, n.2, p.283-6, 1998.

DA COSTA PEREIRA, M.A.V.; MASSARD, C.L.; FACCINI, J.L.H.; SIQUEIRA, L.F.G. Ocorrência de *Babesia eqüi* (LAVERAN,1901) e *Babesia caballi* (NUTTALL & STRICKLAND,1912) em Eqüinos da raça PSI de Pequenos Estabelecimentos Eqüestres. **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**, v.71, n.4, p.405-409, 2004.

DA COSTA PEREIRA, M.A.V.; MASSARD, C.L.; VITA, G.F. Babesiose equina: Enzootia em Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.102, n.561-562, p.165-167, 2007.

DA COSTA PEREIRA, M.A.V.; MASSARD, C.L.; FACCINI, J.L.H.; SIQUEIRA, L.F.G. Variação da sorotitulação ao teste de fixação de complemento para *Babesia equi* e *Babesia caballi* em eqüinos da região serrana do Rio de Janeiro. **Ars Veterinaria**, v.21, n.3, p.338-343, 2005.

DE WAAL, D.T. Equine piroplasmosis: a review. **British Veterinary Journal**, v.148, n.1, p.6-14, 1992.

DE WAAL, D.T., VAN HEERDEN, J., VAN DEN BERG, S.S., STEGMANN, G.F., POTGIETER, F.T., Isolation of pure *B. equi* and *B. caballi* organisms in splenectomized horses from endemic areas in South Africa. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.55, n.1, p.33-35, 1988.

DE WAAL, D.T.; HEERDEN, J.V.; POTGIETER, F.T. An investigation into the clinical pathological changes and serological response in horses experimentally infected with *B. equi* and *B. caballi*. **Onderstepoort. Journal of Veterinary Research**, v. 55, n. 4, p.33-35, 1987.

DENNIG, F. **Erfolgreiche Versuche zur Übertragung von Babesia equi durch Anocentor nitens und Amblyomma cajennense**. Hannover, 1988. 122 f. Thesis - Hannover Scholl of Veterinary Medicine.

DONATIEN, A.L.; LESTOQUARD, F.; SAUSEAU, E.; MAUBARET, P. Transmission de *Piroplasma caballi* de la mère au fœtus. **Bulletin Société Pathologie Exotique**, v.27, n.1, p.433-435, 1924.

DONNELLY, J. JOYNER, L.P.; GRAHAM-JONES, O.; ELLIS, C.P. A comparison of the complement fixation and immunofluorescent antibody tests in a survey of the prevalence of *B. equi* and *B. caballi* in horses in the sultanate of Oman. **Tropical Animal Health Production**, v.12, n.1, p.50-60, 1980.

DONNELLY, J.; PHIPPS, L.P.; WATKINS, K.K. Evidence of maternal antibodies to *Babesia equi* and *Babesia caballi* in foals of seropositive mares. **Equine Veterinary Journal**, Newmarket, v.14, n.2, p.126-128, 1982.

DU PLESSIS, J. L.; BASSON, P. A. Babesiosis in aborted equine foetuses: a report on two cases in South Africa. **Journal of the South African Veterinary Medical Association**, v. 37, n.1, p.267-269, 1966.

DUPONT, O.; BARREIROS-TERRA, A.B. Nutaliose eqüina. **Veterinária**, Rio de Janeiro, v.6, n.2, p.3-7, 1952.

DURRIEU, E.; CIPOCELLI, A.V. Piroplasmosis equina. **Gaceta Veterinaria**, Buenos Aires, v.34, n.269, p.568-581, 1972.

ERBSLOH, J.K. Babesiosis in the newborn foal. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.23, n.1, p.725-726, 1975.

FAHRIMAL, Y.; GOTT, W.L.; JAMER, D.P. Detection of *Babesia bovis* carrier cattle by using polymerase chain reaction amplification of parasite DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, n.6, p.1374-1379, 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, n.1-2, p.69-81, 1993.

FRIEDHOFF, K.T. Piroplasmas of horses--impact on the international horse trade. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, v.95, n.19, p.368-74, 1982.

FRIEDHOFF, K.T. Transmission of *Babesia*. In: RISTIC, M. **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton: CRC Press, p. 23-52, 1988.

FRIEDHOFF, K. T.; TENTER, A. M.; MULLER, I. Haemoparasites of equines: impact on international trade of horses. **Revue Scientifique et Technique**, v.9, n 4, p.1187-1194, 1990.

GERSTENBERG, C.; ALLEN, W. R.; PHIPPS, L. P. Mechanical transmission of *Babesia equi* infection in a British herd of horses. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON EQUINE INFECTIOUS DISEASES, 8, 1998. **Proceedings...** Dubai, Newmarket. R & W Publications, 1998. p.217-222.

GOLYNSKI, A.A.; FERNANDES, K.R.; BALDANI, C.D.; GOLYNSKI, A.L.; MADEIRO, A.S.; MACHADO, R.Z.; BOTTEON, P.T.L.; MASSARD, C.L. Estudo soroepidemiológico da *Babesia equi* em equinos do estado do Rio Grande do Sul, Brasil, determinado pelos testes de imunofluorescência indireta e Elisa. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, Supl. 1, p.317-321, 2008.

GÖTZ, F. **Suitability of ELISA, IFAT, IHA and CFT for detecting *Babesia equi* infections.** 1982. 39f. Tese (Doutorado) - Universidade de Munique, Munique, 1982.

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, n.1, p.69-74, 1998a.

GUIMARÃES, A.M.; LIMA, J.D.; RIBEIRO, M.F. Sporogony and experimental transmission of *Babesia equi* by *Boophilus microplus*. **Parasitology Research**, v.84, n.4, p.323-327, 1998b.

GUIMARÃES, L.M.; ARAÚJO, T.L.; LACERDA, P.M.G. Ocorrência de nutaliose em equinos puro sangue de corrida, em SP. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária de São Paulo**, v.4, n.20, p.357-362, 1950.

GUIMARÃES, L.M.; ARAÚJO, T.L.; SALLES-GOMES, C.E. Nutaliose congênita em equinos Puro Sangue de corrida no Estado de São Paulo. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária de São Paulo**, v.5, n.20, p.183-187, 1954.

GUMMOW, B; DE WET, C.S; DE WAAL, D.T. A sero-epidemiological survey of equine piroplasmiasis in the northern and eastern Cape Provinces of South Africa. **Journal of South African Veterinary Association**, v.67, n.4, p.204-8, 1996.

HABELA, M.; REINA, D.; NIETO, C.; VERDUGO, S.G.; NAVARRETE, I. Epidemiología de La babesiosis equina em Extremadura: estudio preliminar. **Medicina Veterinaria**, v.6, n.1, p.1-7, 1989.

HAILAT, N.Q.; LAFI, S.Q.; AL-DARRAJI, A.M.; AL-ANI, F.K. Equine babesiosis associated with strenuous exercise: clinical and pathological studies in Jordan. **Veterinary Parasitology**, v.69, n.1-2, p.1-8, 1997.

HEIM, A.; PASSOS, L.F.; RIBEIRO, M.F.B.; COSTA-JÚNIOR, L.; BASTOS, C.V.; CABRAL, D.D.; HIRZMANN, J.; PFISTER, K. Detection and molecular characterization of *Babesia caballi* and *Theileria equi* isolates from endemic areas of Brazil. **Parasitology Research**, v.102, n.1, p.63-68, 2007.

HEUCHERT, C.M.; DE GIULLI JR, V.; DE ATHAIDE, D.F.; BÖSE, R.; FRIEDHOFF, K.T. Seroepidemiologic studies on *Babesia equi* and *Babesia caballi* infections in Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.85, n.1, p.1-11, 1999.

- 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**, Washington, v.41, n.2, p.547-551, 2003.
- HODGKINSON, J.E. Molecular diagnosis and equine parasitology. **Veterinary Parasitology**, v.136, n.2, p.109-116, 2006.
- HOLBROOK, A.; FRERICHS, W.M.; ALLEN, P.C. Laboratory diagnosis of equine piroplasmiasis. In: INTERNATIONAL CONFERENCE EQUINE INFECTIOUS DISEASES, 3., 1972, Paris. **Proceedings...** Paris: [s.n.] p.467-475, 1972.
- HOLBROOK, A.A. Biology of equine piroplasmiasis. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.155, n.2, p.453-454, 1969.
- HOLMAN, P.J.; BECU, T.; BAKOS, E.; POLLEDO, G.; CRUZ, D.; WAGNER, G.G. *Babesia equi* field isolates cultured from horse blood using a microcentrifuge method. **The Journal of Parasitology**, v.84, n.4, p.696-699, 1998.
- HUANG, X.; XUAN, X.; YOKOYAMA, N.; KATAYAMA, Y.; ANZAI, T.; IGARASHI, I. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant antigen for the serodiagnosis of equine *Babesia* infections. **Veterinary Parasitology**, v.140, n.1-2, p.158-161, 2006.
- HUANG, X. et al. High-level expression and purification of a truncated merozoite antigen-2 of *Babesia equi* in *Escherichia coli* and its potential for immunodiagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.3, p.1147-1151, 2003.
- IKADAI, H.; NAGAI, A.; XUAN, X.; IGARASHI, I.; TSUGIHIKO, K.; TSUJI, N.; OYAMADA, T.; SUZUKI, N.; FUJISAKI, K. Seroepidemiologic studies on *Babesia caballi* and *Babesia equi* infections in Japan. **Journal of Veterinary Medicine and Science**, v.64, n.4, p.325-328, 2002.
- KARATEPE, B.; KARATEPE, M.; ÇAKMAK, A.; KARAER, Z.; ERGÜN, G. Investigation of seroprevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in Nigde province, Turkey. **Tropical Animal Health Production** v.41, n.1, p.109-113, 2009.
- KERBER, C.E.; FERREIRA, F.; PEREIRA, M.C. Control of equine piroplasmiasis in Brazil. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.66, n.2, p.123-127, 1999.
- KERBER, C.E.; LABRUNA, M.B.; FERREIRA, F.; DE WAAL, D.T.; KNOWLES, D.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of equine Piroplasmiasis and its association with tick infestation in the State of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, n.4, p.1-8, 2009.
- KIM, C.M.; BLANCO, L.B.C.; ALHASSAN, A.; ISEKI, H.; YOKOYAMA, N.; XUAN, X.; IGARASHI, I. Diagnostic real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria equi* from equine blood samples. **Veterinary Parasitology**, v.151, n.2-4, p.158-163, 2008.

- KNOWLES, D.P.; PERRYMAN, L.E.; KAPPMAYER, L.S.; HENNAGER, S.G. Detection of equine antibody to *Babesia equi* merozoite protein by a monoclonal antibody based competitive inhibition enzyme linked immunosorbent assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n.9, p.2056-2058, 1991a.
- KOUAM, M.K.; KANTZOURA, V.; GAJADHAR, A.A.; THEIS, J.H.; PAPADOPOULOS, E.; THEODOROPOULOS, G. Seroprevalence of equine piroplasms and host-related factors associated with infection in Greece. **Veterinary Parasitology**, v.169, n.3-4, p.273-278, 2010.
- KUMAR, S.; KUMAR, R.; GUPTA, A.K.; DWIVEDI, S.K. Passive transfer of *Theileria equi* antibodies to neonate foals of immune tolerant mares. **Veterinary Parasitology**, v.151, n.1, p.80-85, 2008.
- KUTTLER, K.L.; GIPSON, C.A.; GOFF, W.L.; JOHNSON, L.W. Experimental *Babesia equi* infection in mature horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.47, n.8, p.1668-1670, 1986.
- LABRUNA, M.B.; KERBER, CE.; FERREIRA, F.; FACCINI, J.L.H.; DE WALL, D.T.. GENARI, S.N. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the State of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.97, n.1, p.1-14, 2001.
- LARANJEIRA, P.V.E.H. **Estudos da Prevalência da Babesia equi (Laveran, 1901) em Equinos em Regiões Mesográficas do Estado do Rio de Janeiro**. 2003. 59f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Instituto de Veterinária Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2003.
- LAVERAN, A. Contribution a l'etude du *Piroplasma equi*. **Comptes Rendus des Seances de La Société de Biologie**, v.12, n.1, p.385-389, 1901.
- LINHARES, G.F.C. **Aspectos biológicos e epidemiológicos das babesioses de equídeos com ênfase à microrregião de Goiânia, Go, Brasil**. 1994. 105f. Tese (Doutorado em Parasitologia Veterinária) – Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1994.
- LITTLEJOHN, A.; WALKER, E.M. Some aspects of the epidemiology of equine babesiosis. **Journal of the South African Veterinary Association**, v.50, n.4, p.308-313, 1979.
- MAGALHÃES, F.E.P.; LIMA, J.D. Controle estratégico de do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) em bovinos da região de Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.43,n.5, p.423-431, 1991.
- MAHONEY, D.F.; ROSS, D.R. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. **Australian Veterinary Parasitology**, v.48, n.5, p.292-298, 1972.
- MAHONEY, D.F.; WRIGHT, I.G. FRERICHS, W.M. The identification of *Babesia equi* in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v.53, n.10, p.461-464, 1977.
- MANCIANTI, F.; NARDONI, S.; CECCONI, M.; BONANNO, L. Prevalenza di anticorpi anti-babesia in cavalli da corsa della Toscana. **Ippologia**, v.1, n.1, p.29-33, 2000.
- MCcGUIRE, T.C.; VAN HOOSIER, G.L.; HENSON, J.B. The complement-fixation reaction in equine infectious anemia: demonstration of inhibition by IgG(T). **Journal of Immunology**, v.107, n.6, p.1738-1744, 1971.

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.

MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. The piroplasms: a long story in short or “Robert Koch has seen it”. **European Journal of Protistology** v.29, n.1, 279–293, 1993.

MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. The piroplasms: life cycle and sexual stages. **Advances in Parasitology**, v. 23, n.1, p.37-103, 1984.

MESQUITA NETO, F.D. **Estudo retrospectivo da Babesiose equina por *Babesia equi* (Laveran, 1901) em equinos de uso militar: avaliação de casos clínicos e bioquímica sérica.** 2003. 41p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2003.

MOLTMANN, U.G.; MEHLHORN, H.; SCHEIN, E.; REHBEIN, G.; VOIGT, W.P.; ZWEYGARTH, E. Fine structure of *Babesia equi* Laveran, 1901 within lymphocytes and erythrocytes of horses: an in vivo and in vitro study. **The Journal of Parasitology**, v.69, n.1, p.111-120, 1983.

MORETTI, A.; MANGILI, V.; SALVATORI, R.; MARESCA, C.; SCOCCIA, E.; TORINA, A.; MORETTA, I.; GABRIELLI, S.; TAMPIERI, M.P.; PIETROBELLI, M. Prevalence and diagnosis of *Babesia* and *Theileria* infections in horses in Italy: A preliminary study. **The Veterinary Journal**, v.184, n.3, p.346–350, 2010.

MOTLOANG, M.Y.; THEKISOE, O.M.; ALHASSAN, A.; BAKHEIT, M.; MOTHEO, M.P.; MASANGANE, F.E.; THIBEDI, M.L.; INOUE, N.; IGARASHI, I.; SUGIMOTO, C.; MBATI, P.A. Prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in horses belonging to resource-poor farmers in the north-eastern Free State Province, South Africa. **The Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.75, n.2, p.141-146. 2008.

NICOLAIEWSKY, T.B. et al. Detection of *Babesia equi* (Laveran, 1901) by nested polymerase chain reaction. **Veterinary Parasitology**, v.101, n.1, p.9-21, 2001.

NIZOLI, L.Q.; GÖTZE, M.M.; FÉLIX, S.R.; SILVA, S.S.; NOGUEIRA, C.E.W. Frequency of seropositive equines for *Theileria equi* in the Southern Rio Grande do Sul State, Brazil. **Parasitologia Latinoamericana**, v.63, n1-4, p.46-50, 2008.

NUTTAL, G.H.F.; STRICKLAND, C. On the occurrence of two species of parasites in equine piroplasmosis or biliary fever. **Parasitology**, London, v.12, n.1, p.65-69, 1910.

OHTA, M.; KAWASU, S.; TSUJI, N. Rapid and sensitive method for detection of newly isolated *Babesia* parasite (*Babesia spp.*) in the anticipated vector-tick using the polymerase reaction technique. **Journal of Protozoology Research**, v.5, n.1, p.108-117, 1995.

ÖNCEL, T.; VURAL, G.; GİCIK, Y.; ARSLAN, M.Ö. Detection of *Babesia (Theileria) equi* (Laveran, 1901) in Horses in the Kars Province of Turkey. **Türkiye Parazitoloji Dergisi**, v.31, n.3, p.170-172, 2007.

PEEL, M.C.; FINLAYSON, B.L.; MCMAHON, T.A. "Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification". **Hydrology and Earth System Sciences**, v.11, n.5, p.1633–1644, 2007.

PFEIFER BARBOSA, I. et al. Epidemiological aspects of equine babesioses in a herd of horses in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.58, n.1-2, p.1-8, 1995.

PFEIFER BARBOSA, I.; FRIEDHOFF, K.T.; MASSARD, C.L.; LINHARES, G.F.C. Diagnosis of natural infection with *Babesia caballi* Nuttal & Strickland, 1910 in horses and *Anocentor nitens* Neumann, 1897 in Itaguaí, RJ, Brazil. **Arquivo da Universidade Federal Rural do RJ, Seropédica**, v.15, p.105-107, 1992.

PHIPPS, L. P.; OTTER, A. Transplacental transmission of *Theileria equi* in two foals born and reared in the United Kingdom. **Veterinary Record**, v.154, n.13, p.406-408, 2004.

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.

POSNETT, E.S.; AMBROSIO, R.E. Repetitive DNA probe for detection of *Babesia equi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.34, n.1, p.75-78, 1989.

RAMPERSAD, J.; CESAR, E.; CAMPBELL, M.D.; SAMLAL, M.; AMMONS, D. A field evaluation of PCR for the routine detection of *Babesia equi* in horses. **Veterinary Parasitology**, v.114, n.2, p.81-87, 2003.

RETIEF, G.P. A comparison of equine piroplasmiasis in South Africa and the United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.145, n.1, p.912-916, 1964.

RIBEIRO, M.F.B.; COSTA, J.O.; GUIMARÃES, A.M. Epidemiological Aspects of *Babesia equi* in Horses in Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Research Communications**, v.23, n.6, p.385-390, 1999.

RIBEIRO, M.F.B.; LIMA, J.D. Diagnóstico sorológico da babesiose equina por *Babesia equi* em Minas Gerais. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 1989, [S.I.]. **Anais...**[S.I.]: Sociedade Brasileira de Parasitologia Veterinária, 1989. p. 111.

RUDOLPH, W.; CORREA, J.; ZURITA, L.; MANLEY, W. Equine piroplasmiasis: leucocytic response to *Babesia equi* (LAVERAN, 1901) infection in Chile. **British Veterinary Journal**, v.5, n.5, p.601-608, 1975.

RÜEGG, S.R.; TORGERSON, P.; DEPLAZES, P.; MATHIS, A. Age-dependant dynamics of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in southwest Mongolia based on IFAT and/or PCR prevalence data from domestic horses and ticks. **Parasitology**, v.134, n.7, p.939-947, 2007.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2ª ed. Belo Horizonte: Editora, FEPMVZ, 2002. 265p.

SANTOS, T.M.; FERRAZ, P.N.; MASSARD, C.L. ; BALDANI, C.D. ; BOTTEON, P. T.L.; SANTOS, H.A. ; MACHADO, R.Z. ; ANDRADE, C.M. Estudo comparativo de três métodos de diagnóstico para detecção de anticorpos anti-*Theileria equi* em equinos de áreas endêmicas do estado do Rio de Janeiro. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.46, n.6, p.484-490, 2009.

SANTOS, T.M.; SANTOS, H.A.; MASSARD, C.L. Diagnóstico molecular de babesiose congênita em potros neonatos no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, Supl. 1, p.348-350, 2008.

SAVINI, G.; BATTISTINI, M.L.; SCARAMOZZINO, P.; TITTARELLI, M.; MOLteni, C. Le babesiosi equine – La situazione italiana. **Summa**, v.14, n.1, p.35–40. 1997.

SCHEIN, E. Equine babesiosis. In: RISTIC, M. (Ed.). **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton: CRS Press, 1988. p.197-208.

SCHEIN, E. REHBEIN, G.; VOIGT, W.P.; ZWEYGARTH, E. *Babesia equi* (Laveran 1901) 1. Development in horses and in lymphocyte culture. **Tropenmedizin und Parasitologie**, Stuttgart, v.32, n.4, p.223-227, 1981.

SEVINC, F.; MADEN, M.; KUMAS, C.; SEVINC, M.; EKICI, O.D. A comparative study on the prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in horse sub-populations in Turkey. **Veterinary Parasitology**, v.156, n.3-4, p.173-177, 2008.

SHKAP, V.; COHEN, I.; LEBOVITZ, B.; SAVITSKY.; PIPANO, E.; AVNI, G.; SHOFER, S.; GIGER, U.; KAPMEYER, L.; KNOWLES, D. Seroprevalence of *Babesia equi* among horses in Israel using competitive inhibition ELISA and IFA assays. **Veterinary Parasitology**, v.76, n.4, p.251-259, 1998.

SIGG, L.; GERBER, V.; GOTTSTEIN, B.; DOHERR, M.G.; FREY, C.F. Seroprevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in the Swiss horse population. **Parasitology International**, v.59, n.6, p.313–317, 2010.

SIGRIST, B. 1983. 58p. **Übertragung von Babesia equi durch Hyalomma anatolicum anatolicum und Rhipicephalus turanicus**. Thesis, Hannover School of Veterinary Medicine. 1983.

SIPPEL, W. L.; COOPERRIDER, D. E.; GAINER, J. H.; ALLEN, R. W.; MOUW, J. E. B.; TEIGLAND, M. B. Equine piroplasmiasis in the United States. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v.141, n.6, p.694-698, 1962.

SMITH, T., KILBORNE, F.L. Investigation into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever. **USA Department Agriculture Bureau Animal Industry**, v.1, n.1, p.177-304, 1893.

SOULE, C., PERRET, C., DORCHIES, P. Babesiose equine a *Babesia equi*: comparaison des techniques de fixation du complement d'immunofluorescence Indirecte et d'ELISA. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v.135, n.7, p.419-424, 1984.

SOUZA, A.P.; BELLATO, V.; SARTOR, A.A.; SILVA, A.B. Prevalência de anticorpos anti-*Babesia equi* em equinos no planalto catarinense. **Ciência Rural**, v.30, n.1, p.119-121, 2000.

TANAKA, T.; XUAN, X.; IKADAI, H.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; FUJISAKI, K.; MIKAMI, T.; SUZUKI, N. Expression of *Babesia equi* merozoite antigen-2 by recombinant baculovirus and its use in the ELISA. **International Journal for Parasitology**, v.29, n.11, p.1803-1808, 1999.

TAYLOR, W.M., BRYANT, J.E., ANDERSON, J.B., SILLERS, K.H. Equine piroplasmiasis In the United States – a review. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v.155, n.6, p.915-19, 1969.

- TEGLAS, M.; MATERN, E.; LEIN, S.; FOLEY, P.; MAHAN, S.M.; FOLEY, J. Ticks and tick-borne disease in Guatemalan cattle and horses. **Veterinary Parasitology**, v.131, n.1-2, p.119–127, 2005.
- TENTER, A.M. et al. Prevalence of piroplasmiasis in equines in the Colombian province of Cordoba. **Tropical Animal Health and Production**, v.20, n.2, p.93-98, 1988.
- TENTER, A.M.; FRIEDHOFF, K.T. Serodiagnosis of experimental and natural *Babesia equi* and *B. caballi* infections. **Veterinary Parasitology**, v.20, n.1-3, p.49-61, 1986.
- THOMPSON, P.H. Ticks as vectors of equine piroplasmiasis. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v.155, n.2, p.454-457, 1969.
- UETI, M.W.; PALMER, G.H.; KAPPEMEYER, L.S.; STATDFIELD, M.; SCOLES, G.A.; KNOWLES, D.P. Ability of the vector tick *Boophilus microplus* to acquire and transmit *Babesia equi* following feeding on chronically infected horses with low-level parasitemia. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.8, p.3755-3759, 2005.
- UETI, M.W.; PALMER, G.H.; KAPPEMEYER, L.S.; SCOLES, G.A.; KNOWLES, D.P. Expression of equi merozoite antigen 2 during development of *Babesia equi* in the midgut and salivary gland of the vector tick *Boophilus microplus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.12, p.5803-5809, 2003.
- UETI, M.W.; PALMER, G.H.; SCOLES, G.A.; KAPPEMEYER, L.S.; KNOWLES, D.P. Persistently Infected Horses Are Reservoirs for Intrastadial Tick-Borne Transmission of the Apicomplexan Parasite *Babesia equi*. **Infection and Immunity**, v.76, n.8, p.3525–3529, 2008.
- UILENBERG, G. *Babesia* – a historical overview. **Veterinary Parasitology**, v.138, n.1-2, p.3-10, 2006.
- UILENBERG, G. Highlights in recent research on tick-borne diseases of domestic animals. **Journal of Parasitology**, v.72, n.4, p.485–491, 1986.
- URCELAY, S.; CORREA, J.; RUDOLPH, W. Piroplasmiasis en caballos de carrera estudio sorológico en criaderos de la Provincia de Santiago. **Boletín chileno de parasitología**, v.28, n.1, p.6-9, 1973.
- 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.
- XUAN, X.; IGARASHI, I.; TANAKA, T.; FUKUMOTO, S.; NAGASAWA, H.; FUJISAKI, K.; MIKAMI, T. Detection of antibodies to *Babesia equi* in horses by a latex agglutination test using recombinant EMA-1. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.8, n.3, p.645-646, 2001a.
- XUAN, X.; CHAHAN, B.; HUANG, X.; YOKOYAMA, N.; MAKALA, L.H.; IGARASHI, I.; FUJISAKI, K.; MARUYAMA, S.; SAKAI, T.; MIKAMI, T. Diagnosis of equine piroplasmiasis in Xinjiang province of China by the enzyme-linked immunosorbent assays using recombinant antigens. **Veterinary Parasitology**, v.108, n.2, p.179-182, 2002.

XUAN, X.; LARSEN, A.; IKADAI, H.; TANAKA, T.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; FUJISAKI, K.; TOYODA, Y.; SUZUKI, N.; MIKAMI, T. Expression of *Babesia equi* merozoite antigen 1 in insect cells by recombinant baculovirus and evaluation of its diagnostic potential in an enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.2, p.705-709, 2001c.

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. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.63, n.10, p.1159-1160, 2001b.

YOSHIHARA, T. Equine Piroplasmosis. **Journal of Animal Protozooses**, v.11, n.1, p.1-7, 1997

ZOBBA, R.; ARDU, M.; NICCOLINI, S.; CHESSA, B.; MANNA, L.; COCCO, R.; PINNA PARPAGLIA, M.L. Clinical and laboratory findings in equine piroplasmosis. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.28, n.5, p.301-308, 2008.

ZWEYGARTH, E.; JUST, M.C.; DE WAAL, D.T. In vitro cultivation of *Babesia equi*: detection of carrier animals and isolation of parasites. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.64, n.1, p.51-56, 1997.

ZWEYGARTH, E.; JUST, M.C.; DE WAAL, D.T. Continuous in vitro cultivation of erythrocytic stages of *Babesia equi*. **Parasitology Research**, v.81, n.4, p.355-358, 1995.

CAPÍTULO II

EVIDÊNCIA SOROLÓGICA E MOLECULAR DE *Anaplasma phagocytophilum* EM EQUINOS DA MICRORREGIÃO DE ITAGUAÍ NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

RESUMO

SANTOS, Tiago Marques dos. **Evidência sorológica e molecular de *Anaplasma phagocytophilum* em equinos da microrregião de Itaguaí no estado do Rio de Janeiro.** 2011. 39p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

Este trabalho teve como objetivo determinar a frequência de equinos soropositivos para *Anaplasma phagocytophilum* no município de Seropédica, Rio de Janeiro, através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e identificar fatores associados à soropositividade, alterações hematológicas em equinos soropositivos para *A. phagocytophilum* e avaliar a ocorrência de *A. phagocytophilum* em equinos da microrregião de Itaguaí através da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). Amostras de soro provenientes de 100 equinos do município de Seropédica foram testadas pela RIFI para detecção de anticorpos IgG anti-*A. phagocytophilum*. A associação dos fatores (sexo, idade, atividade e parasitismo por carrapatos) com a presença de anticorpos anti-*A. phagocytophilum* foi avaliada através do teste de Qui-quadrado em nível de 5% de significância. Um total de 350 amostras de capa leucocitária, provenientes da coleta do sangue de equinos da microrregião de Itaguaí foram submetidas à extração de DNA. Posteriormente, as amostras de DNA foram submetidas à RT-PCR pelo sistema SYBR Green para amplificação de um fragmento de 122pb do gene *msp2*. Amostras que apresentaram limiar de detecção (C_T) inferior a 35 ciclos e temperatura de dissociação (T_m) próximas as dos controles positivo foram consideradas positivas. Os produtos amplificados na RT-PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, corados e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta. A frequência de equinos soropositivos para *A. phagocytophilum* foi de 17% (n=17) das amostras examinadas no município de Seropédica. Apenas a idade apresentou associação ($p=0,044$) com a soropositividade dos equinos para *A. phagocytophilum*. Não se observou evidência de alterações nos parâmetros hematológicos em função da soropositividade dos equinos para *A. phagocytophilum*. Das 350 amostras avaliadas pela RT-PCR, 0,86% (n=3) apresentaram amplificação específica para o gene *msp2*. As amostras positivas apresentaram valores médios do C_T de $35,09 \pm 1,48$ ciclos e de T_m de $78,56 \pm 0,53^\circ\text{C}$, semelhante a do controle positivo, de $78,45 \pm 0,32^\circ\text{C}$. Todas as amostras positivas apresentaram bandas de amplificação em gel de agarose com tamanho esperado de 122pb do gene *msp2*. A presença de anticorpos anti-*A. phagocytophilum* e a evidência molecular da infecção por esse agente em equinos do município de Seropédica, no estado do Rio de Janeiro, sugere a circulação de *A. phagocytophilum* nessa região.

Palavras-chave: Equinos, Anaplasrose granulocítica equina, Diagnóstico sorológico e molecular.

ABSTRACT

SANTOS, Tiago Marques dos. **Serological and molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* in horses of Itaguaí microregion in Rio de Janeiro state.** 2011. 39p. Tesis (Doctor in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

This study was carried out to determine the frequency of horses seropositive for *Anaplasma phagocytophilum* in the Seropédica municipality, Rio de Janeiro, by indirect fluorescent antibody test (IFAT) and to identify factors associated to seropositivity, hematological changes in horses seropositive for *A. phagocytophilum* and evaluate the occurrence of this agent in horses of Itaguaí microregion by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). Serum samples from 100 horses of Seropédica municipality were tested by IFAT for detection of IgG anti-*A. phagocytophilum* antibodies. The association of factors (sex, age, activity and ticks parasitism) with seropositive horses was assessed using the Chi-square test at 5% significance. An overall of 350 samples of buffy coats, from the collection of the blood of horses of Itaguaí microregion was submitted to DNA extraction. Subsequently, the DNA samples were tested in the RT-PCR using SYBR Green system for amplifying a fragment of 122bp from the *msp2* gene. Samples that showed cycle threshold (C_T) less than 35 cycles and dissociation temperature (T_m) approaching those of positive controls were considered positive. The products amplified by RT-PCR were subjected to 2% agarose gel electrophoresis, stained and viewed on an ultraviolet transilluminator. The frequency of seropositive horses for *A. phagocytophilum* was 17% (n=17) of the samples tested in the Seropédica county. Only age was associated (p = 0.044) with seropositivity of horses to *A. phagocytophilum*. There was no evidence of changes in hematological parameters due to seropositivity of horses to *A. phagocytophilum*. Of 350 samples tested by RT-PCR, 0.86% (n=3) showed specific amplification for *msp2* gene. The positive samples showed average C_T value of 35.09 ± 1.48 cycles and T_m of $78.56 \pm 0.53^\circ\text{C}$, similar to the positive control, $78.45 \pm 0.32^\circ\text{C}$. All the positive samples showed amplification bands in agarose gel with the expected size of 122bp from the *msp2* gene. The presence of anti-*A. phagocytophilum* antibodies and molecular evidence of infection by this pathogen in horses of the municipality of Seropédica in Rio de Janeiro state, suggests the circulation of *A. phagocytophilum* in this region.

Key words: Horses, Equine granulocytic anaplasmosis, Serological and molecular diagnosis.

1 INTRODUÇÃO

A anaplasmose granulocítica equina (AGE) é causada por *A. phagocytophilum*, um cocobacilo gram-negativo, com tropismo por células granulocíticas, como neutrófilos e eosinófilos (MADIGAN; GRIBBLE, 1987). A espécie *A. phagocytophilum* é transmitida transestadialmente por carrapatos do gênero *Ixodes*. As principais espécies capazes de transmitir o agente são *Ixodes pacificus* e *I. scapularis* nos Estados Unidos (RICHTER et al., 1996; PUSTELA, et al., 2002), *I. ricinus* na Europa (MACLEOD; GORDON, 1993) e *I. persulcatus* e *I. ovatus* na Ásia (ALEKSEEV et al., 1998; OHASHI et al., 2005). Esta bactéria infecta equinos, ruminantes, cães, gatos, pequenos roedores, cervídeos e humanos. Nos EUA, a doença ocorre principalmente nas estações de outono, inverno e primavera, com a maior incidência em março (MADIGAN; GRIBBLE, 1987). A ocorrência sazonal de infecções por *A. phagocytophilum* correlaciona com a ocorrência dos carrapatos vetores (VREDEVOE et al., 1999).

Equinos com AGE podem apresentar sinais clínicos e alterações hematológicas incluindo febre alta, anorexia, depressão, edema de membros, relutância em se locomover, ataxia, petéquias, icterícia, anemia, trombocitopenia, leucopenia e presença de corpúsculos de inclusão (mórula) no citoplasma de neutrófilos e eosinófilos (GRIBBLE, 1969; MADIGAN; GRIBBLE, 1987). A severidade da infecção é influenciada por diversos fatores, como a variante de *A. phagocytophilum* envolvida, outras infecções concomitantes, idade, estado imune e condição geral do hospedeiro, bem como fatores climáticos e de manejo dos animais (STUEN, 2007). No entanto, em grande parte dos casos, a doença em equinos apresenta caráter autolimitante.

O diagnóstico de AGE é baseado nos achados clínicos e laboratoriais, além de outros fatores como infestação por carrapatos, período do ano e localização geográfica (RIKIHISA, 1991). Os testes para o diagnóstico laboratorial incluem hemograma, exame microscópico de esfregaço de sangue ou de capa leucocitária corado com o Giemsa para pesquisa de corpúsculos de inclusão em neutrófilos e eosinófilos, pesquisa de anticorpos da classe IgG através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio enzimático de imuno-adsorção (ELISA) e métodos moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) (MADIGAN et al., 1995).

Essa doença foi relatada pela primeira vez em equinos na Califórnia (GRIBBLE, 1969), e posteriormente foi registrada em países da Europa e Ásia, onde possui caráter endêmico. No Brasil, a presença de anticorpos anti-*A. phagocytophilum* foram registrados em equinos no estado de São Paulo (SALVAGNI et al., 2010) e o DNA desse agente foi detectado em cães do município de Seropédica, no estado do Rio de Janeiro (SANTOS et al., 2011 – **artigo aceito**). A carência de estudos relacionados à *A. phagocytophilum* no Brasil justifica a importância do presente trabalho, uma vez que esse agente, além de infectar uma variedade de espécies de animais domésticos e selvagens, também infecta humanos.

O presente estudo tem como objetivos determinar frequência de equídeos soropositivos para *A. phagocytophilum* no município de Seropédica, Rio de Janeiro, através da RIFI; identificar fatores associados (sexo, idade, atividade dos equinos, parasitismo por carrapatos e soropositividade para *T. equi*) à soropositividade dos equídeos para este agente; identificar alterações hematológicas em equídeos soropositivos para *A. phagocytophilum*; e avaliar a ocorrência de *A. phagocytophilum* em equídeos da microrregião de Itaguaí através da PCR em tempo real.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Evolução histórica de *Anaplasma phagocytophilum*

Anaplasma phagocytophilum foi nomeado por Dumler et al. (2001) substituindo as espécies de bactérias granulocíticas, *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi* e o agente da erliquiose granulocítica humana, após a re-organização das famílias Rickettsiaceae e Anaplasmataceae na ordem Rickettsiales.

Ehrlichia phagocytophila (= *A. phagocytophilum*), agente causador da febre transmitida por carrapatos (FTC) em bovinos, ovinos e caprinos foi descrita por Gordon et al. (1940). Inicialmente recebeu o nome de *Rickettsia phagocytophila* (FOGGIE, 1949 *apud* FOGGIE, 1951), em seguida foi renomeado como *Cytoecetes phagocytophila* (FOGGIE, 1962) para refletir sua predileção por granulócitos e sua semelhança morfológica com *Cytoecetes microti* (TYZZER, 1938). Posteriormente, foi incluída na tribo *Ehrlichieae* da ordem Rickettsiales, como uma espécie separada, *E. phagocytophila* (RISTIC; HUXSOLL, 1984). O primeiro caso reconhecido de FTC como uma doença distinta transmitida por carrapatos ocorreu na Escócia, oito anos antes de sua descrição (MACLEOD, 1932). Posteriormente, novos casos de FTC em bovinos, ovinos e caprinos foram descritos em outras partes do Reino Unido (HUDSON, 1950), Irlanda (COLLINS, et al., 1970), Escandinávia (OVERAS, 1962; TUOMI, 1967a) e outras partes da Europa (BOOL; REINDERS, 1964; HINAIDY, 1973; PFISTER et al., 1987; JUSTE et al., 1989).

A erliquiose granulocítica equina (EGE), causada por *E. equi*, atualmente anaplasmosse granulocítica equina (AGE) foi primeiramente reconhecida como uma doença de equinos na Califórnia (GRIBBLE, 1969) e, em seguida, foi registrada no Colorado, Illinois, Flórida e New Jersey (MADIGAN, 1987). Na Europa, casos de AGE foram registrados no Reino Unido, Dinamarca, Suécia, Suíça e na França (BJOERSDORFF, 1999; KORBUTIAK; SNEIDERS, 1994; BERMANN et al., 2002).

A anaplasmosse granulocítica canina (AGC) causada por *A. phagocytophilum* também foi inicialmente reconhecida nos EUA (MADEWELL; GRIBBLE, 1982), antes de sua descrição na Europa. Até a descoberta da anaplasmosse granulocítica humana (AGH), a qual foi originalmente descrita como erliquiose granulocítica humana (EGH) nos EUA (CHEN et al., 1994), pensava-se que a doença era limitada aos animais domésticos e reservatórios de vida livre (OGDEN, 1998a,b). O reconhecimento que AGH é causada por um agente etiológico semelhante ao agente causador da FTC em ruminantes, da AGE e que ambos apresentam habilidade de invadir e replicar dentro de neutrófilos fez com que grande número de informações relacionadas à biologia molecular e patobiologia desses organismos fossem produzidas. Isto culminou na denominação de todas as três espécies como variantes de *A. phagocytophilum* (DUMLER et al., 2001) baseado em suas similaridades genética e antigênica, predileção por granulócitos e morfologia semelhante. No entanto, a cepa que causa FTC em ruminantes na Europa difere daquela que causa AGH nos EUA e partes da Europa no que se referem a sua distribuição, hospedeiros, manifestações clínicas e gravidade da doença. Nos EUA, ruminantes domésticos parecem não ser susceptíveis a infecção com *A. phagocytophilum* (PUSTERLA et al., 2001) enquanto na Europa FTC é uma doença comum de ruminantes (WOLDEHIWET, 1983).

2.2 Classificação de *Anaplasma phagocytophilum*

- Domínio – *Bactéria* (Haeckel, 1894) C.R. Woese et al. 1990;
- Filo – Proteobacteria Garrity et al., 2005;
- Classe – Alphaproteobacteria Garrity et al., 2006;
- Ordem – Rickettsiales Gieszczykiewicz, 1939;
- Família – Anaplasmataceae Philip 1957;
- Gênero – *Anaplasma* Theiler, 1910;
- Espécie – *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) Dumler et al., 2001.

2.3 Morfologia e aspectos biológicos de *Anaplasma phagocytophilum*

Anaplasma phagocytophilum é uma bactéria gram-negativa, no entanto, não se cora bem com o Gram. Esse agente é melhor visualizado após coloração com Giemsa, Leishman ou outros corantes diferenciais (FOGGIE, 1951). No citoplasma dos granulócitos os organismos estão presentes como macrocolônias (mórulas) em vacúolos intracitoplasmáticos, ambos com tamanhos que variam entre 1,5 a 6,0µm de diâmetro (FOGGIE, 1951; POPOV et al., 1998). *A. phagocytophilum* é pleomórfico, mas usualmente apresenta morfologia que pode variar de cocóide a elipsoidal. Algumas das bactérias se apresentam como estruturas pequenas e densas enquanto outras são corpúsculos grandes e menos densos (TUOMI; VONBONSDORFF, 1966; WOLDEHIWET; SCOTT, 1982a). Ambas as formas se dividem por fissão binária e estruturas “fantasmas” podem estar presentes (WOLDEHIWET; SCOTT, 1982a).

Os agentes das variantes de AGH e AGE são cultivadas em células da linhagem promielocítica humana (HL-60) (GOODMAN et al., 1996), células de linhagens de carrapatos (IDE8 e ISE6) derivadas de embriócitos de *Ixodes scapularis* (MUNDERLOH et al., 1996, 1999) e em células endoteliais de capilares humanos, macacos e bovinos (MUNDERLOH et al., 2004). Variantes de FTC são bem cultivadas em linhagens de células de carrapatos (WOLDEHIWET et al., 2002; WOLDEHIWET; HORROCKS, 2005).

2.4 Diversidade antigênica de *Anaplasma phagocytophilum*

Estudos anteriores sobre proteção cruzada usando isolados de *A. phagocytophilum* de ovinos e bovinos sugerem elevado grau de diversidade antigênica entre esses isolados (FOGGIE, 1951; TUOMI, 1967c). Após demonstrar que animais afetados não resistem a desafios sequenciais com várias cepas heterólogas, cada uma causando uma reação, Tuomi (1967c) concluiu que a elevada heterogeneidade imunológica observada entre cepas de *A. phagocytophilum*, aleatoriamente isoladas, parece não ser comparada com quaisquer outras espécies de microrganismos.

Apesar das aparentes diferenças entre cepas de *A. phagocytophilum* observadas em estudos de proteção imunológica, houve poucas tentativas de diferenciação antigênica ou genética. Woldehiwet e Scott (1982a) usaram títulos de anticorpos de ovinos experimentalmente infectados com antígenos homólogos e heterólogos derivados de granulócitos ovino infectado para diferenciar a cepa “Old Sourhope” de outras cepas. Por outro lado, Zhi et al. (1997) usaram análises SDS-PAGE e Western-blotting para demonstrar diferenças nas principais proteínas antigênicas em seis cepas de *A. phagocytophilum* isoladas de sangue humano em células HL-60.

Outros estudos sobre proteção cruzada usando *A. phagocytophilum* isolados de bovinos, ovinos e caprinos indicaram que a infecção com um isolado bovino não confere proteção contra o desafio com um isolado ovino (FOGGIE; ALLISON, 1960). Além disso, isolados finlandeses de

bovinos não conferem proteção contra isolados escoceses de ovinos e vice versa (TUOMI, 1967c).

Existem poucas informações sobre os efeitos da proteção cruzada de *A. phagocytophilum* de origem humana, no entanto, Barlough et al. (1995) mostraram que equinos infectados com uma variante humana de *A. phagocytophilum* ficaram protegidos contra o desafio com uma variante capaz de causar AGE, o que suporta a visão que variantes que causam AGH em humanos e AGE em equinos são antigenicamente similares, se não idênticas. Por outro lado, Massung et al. (2005) sugeriram que o veado da cauda branca abriga variantes de AGH não associada com infecção humana, mas que estas variantes conferem proteção contra àquelas que causam infecção em humanos.

As evidências de mudanças sequenciais em algumas das proteínas de superfície principal (M_{SP}) de *Anaplasma* spp. durante o período de bacteremia (FRENCH et al., 1999; ZHI et al., 1999) poderiam justificar a diversidade antigênica observada entre animais e humanos. No entanto, ainda é necessário estabelecer os mecanismos de variação antigênica envolvidos em infecções por *A. phagocytophilum*.

2.5 Variação genética de *Anaplasma phagocytophilum*

A diferenciação das variantes que causam FTC e AGH ou outras variantes de *A. phagocytophilum*, requer o sequenciamento de fragmentos amplificados do gene 16S rRNA, onde variantes de FTC diferiram de variantes de AGE/AGH em três posições (CHEN et al., 1994). A presença de pequenas diferenças nas sequências do gene 16S rRNA têm sido usadas para identificar variantes de *A. phagocytophilum* que infectam humanos (AP-ha), cujo reservatório da infecção mostrou ser o camundongo da pata branca, além de outras variantes (AP-1), a qual foi mantida em veado da cauda branca e parece não infectar humanos (BELONGIA et al., 1997; MASSUNG et al., 2002, 2003, 2005). Segundo esses estudos, variantes de AGH causando doença humana nos EUA tiveram sequências do gene 16S rRNA idênticas. Cinco variantes de *A. phagocytophilum* com diferenças nas sequências do gene 16S rRNA foram recentemente reportadas em cães (POITOUT et al., 2005). Algumas dessas variantes estiveram presentes nos mesmos cães ao mesmo tempo, mas a capacidade dessas variantes de causar AGH não foi investigada. Uma variante foi idêntica às variantes de AGE e AGH, no entanto, todas as variantes isoladas de cães foram diferentes da variante de FTC norueguesa (STUEN et al., 2002).

Outras diferenças nas sequências entre isolados de *A. phagocytophilum* foram descritas utilizando o gene que codifica a proteína de choque térmico (*groESL*) (POLIN et al., 2004). Estudos mais recentes indicam que variantes que infectam ruminantes na Europa poderiam ser diferenciadas de variantes que infectam equinos, cães e humanos por sequenciamento do gene *msp4*, um dos genes que codifica proteínas de superfície principal (DE LA FUENTE et al., 2005).

2.6 Epidemiologia

2.6.1 Hospedeiros e reservatórios de *Anaplasma phagocytophilum*

Os hospedeiros de *A. phagocytophilum* parecem variar conforme as regiões geográficas. Este comportamento também foi observado para a incidência e gravidade da doença em diferentes hospedeiros. Esta variação é em grande parte ditada pela variante de *A. phagocytophilum*, pelos hospedeiros acidentais e os reservatórios nos quais elas estão adaptadas e a capacidade de transmissão dos vetores presentes em uma determinada área (TUOMI, 1967c; OGDEN et al., 2002b; TEGLAS; FOLEY, 2006).

Muitos surtos de FTC ocorrem entre rebanhos de bovinos e ovinos imediatamente após eles serem introduzidos em pastagens infestadas com carrapatos, porém, surtos isolados foram descritos em caprinos (GRAY et al., 1988). Entre ruminantes de vida livre no Reino Unido, *A. phagocytophilum* foi detectado em caprinos selvagens (*Capra hircus*) (FOSTER; GREIG, 1969) e em cervídeos como *Cervus elaphus*, *Dama dama* e *Capreolus capreolus* (McDIARMID, 1965; ALBERDI et al., 2000). *A. phagocytophilum* também foi detectado em uma variedade de cervídeos incluindo *C. capreolus*, *Alces alces* e *Rupicapra rupicapra* na Noruega (STUEN et al., 2001; JENKINS et al., 2001), Eslovênia (PETROVEC et al., 2002), Suíça (LIZ et al., 2002) e Áustria (POLIN et al., 2004).

Até o reconhecimento que roedores de vida livre são reservatórios de *A. phagocytophilum*, pensava-se que a bactéria era mantida em carrapatos, através do ciclo biológico em ruminantes. Isso resultaria em infecção persistente de ruminantes domésticos e de vida livre, os quais serviriam de fontes contínuas de transmissão, uma vez que nenhuma transmissão transovariana foi ainda demonstrada (MACLEOD, 1936). A comprovação que alguns roedores, incluindo *Apodemus sylvaticus*, *A. flavicollis*, *Microtus agrestis* e *Clethrionomys glareolus* são hospedeiros competentes de *A. phagocytophilum* (OGDEN et al., 1998a; LIZ et al., 2000; BROWN et al., 2003, 2006) sugere que eles também podem ser importantes reservatórios da infecção.

Nos EUA, os principais reservatórios de variantes de AGH são os hospedeiros vertebrados de *I. scapularis*, os quais incluem as espécies *P. leucopus*, *Odocoileus virginianus*, *Sciurus carolinensis* e *Procyon lotor* (BELONGIA et al., 1997; NICHOLSON et al., 1998; STAFFORD et al., 1999; LEVIN; FISH, 2001; LEVIN et al., 2002; DUGAN et al., 2006). Além desses, hospedeiros vertebrados de *I. spinipalpis*, os quais incluem os roedores *Neotoma* spp., *P. maniculatus*, *M. ochrogaster*, *Tamias* spp. e *Spermophilus lateralis* também são infectados com variantes de AGH (NICHOLSON et al., 1999; ZEIDNER et al., 2000; DENATALE et al., 2002; MASSUNG et al., 2005). No oeste dos EUA destaca-se *N. fuscipes* e *S. griseus*, nos quais se observou infecção crônica (FOLEY et al., 2002). Na costa norte dos EUA e Serra Nevada na Califórnia, vários roedores incluindo *Peromyscus* spp. e *Tamias* spp., tem demonstrado altos níveis de infecção por *A. phagocytophilum* (FOLEY et al., 2004). Recentemente, no sul dos EUA, espécies de pequenos mamíferos, principalmente roedores, como *N. fuscipes*, *Sciurus* spp., *Tamias* spp., além de *P. boylii* e *Reithrodontomys megalotis* foram caracterizados como reservatórios de *A. phagocytophilum* (FOLEY et al., 2008). Segundo esses autores, muitas espécies de roedores, tais como *Peromyscus* spp. e *Microtus californicus*, somente contribuem para a ecologia de anaplasmose granulocítica através da manutenção de carrapatos. Outros roedores, incluindo *Sciurus* spp. e *Neotoma* spp., além de manter a população de carrapatos, eles também são portadores de *A. phagocytophilum*.

O papel dos pássaros como potenciais reservatórios de *A. phagocytophilum* não está claramente estabelecido. No entanto, um relato nos EUA sugere que *Turdus migratorius* e *Catharus fuscescens* podem ser reservatórios desta bactéria através do parasitismo de larvas de *I. scapularis* infectadas com *A. phagocytophilum* (DANIELS et al., 2002). Em outro estudo, ninfas de *I. ricinus* que alimentaram em pássaros migratórios na Suécia se infectaram com *A. phagocytophilum* (BJOERSDORFF et al., 2001). Desta forma, se pássaros são hospedeiros competentes de *A. phagocytophilum*, eles podem ter um importante papel na dispersão de carrapatos infectados.

Além de roedores e cervídeos, ovinos, bovinos e equinos podem ser considerados reservatórios de *A. phagocytophilum* na natureza.

2.6.2 Vetores de *Anaplasma phagocytophilum*

Anaplasma phagocytophilum é transmitido transestadialmente por carrapatos do gênero *Ixodes*. Na Europa, o principal vetor de *A. phagocytophilum* é *I. ricinus*. Após a descrição de FTC em bovinos, estudos foram desenvolvidos para estabelecer os métodos de transmissão de *A. phagocytophilum*. Estes estudos concluíram que o agente causador de FTC era transmitido transestadialmente por *I. ricinus* e que o agente é mantido em carrapatos infectados durante um ano, até a alimentação em um novo hospedeiro (MACLEOD; GORDON, 1933; MACLEOD, 1936). Outros estudos detectaram a presença de *A. phagocytophilum* em *I. persulcatus* em regiões Bálticas da Rússia (ALEKSEEV et al., 2001) e na região da China, onde a doença de Lyme é endêmica (CAO et al., 2000). *A. phagocytophilum* pode sobreviver no carrapato após a mudança de estágio e infectar novos hospedeiros, no entanto, a transmissão vertical mostrou-se não existir (MACLEOD, 1936; OGDEN et al., 2002a). A prevalência da infecção em *I. ricinus* pode variar de uma região geográfica para outra (VON STEDINGK et al., 1997; GUY et al., 1998; ALBERDI et al., 1998) e conforme os estágios de desenvolvimento, com maior taxa de infecção observada em ninfas quando comparado a carrapatos adultos e larvas. A eficiência da transmissão pode ser influenciada por outros fatores incluindo co-alimentação, densidade de carrapatos e a resposta imunológica dos hospedeiros mamíferos contra os carrapatos (OGDEN et al., 2002a).

No hemisfério norte, os carrapatos pertencentes ao complexo *Ixodes persulcatus*, são os responsáveis por transmitir *A. phagocytophilum*. *Ixodes scapularis* transmite variantes de AGH no leste dos EUA (TELFORE et al., 1996; LEVIN; FISH, 2001). Variantes de AGE são transmitidas por *I. pacificus*, o principal vetor na Califórnia e oeste dos EUA (RICHTER et al., 1996; BARLOUGH et al., 1996, 1997) e por *I. persulcatus* e *I. ovatus* na Ásia (ALEKSEEV et al., 1998; OHASHI et al., 2005). Além desses, outros carrapatos foram associados à infecção com *A. phagocytophilum* em áreas da Inglaterra, onde *I. ricinus* não está presente. Isso sugere que, possivelmente *Haemaphysalis punctata* (MACLEOD, 1962) e *I. trianguliceps* (OGDEN et al., 1998a; BOWN et al., 2003) podem ter um papel importante na transmissão de *A. phagocytophilum*. Outros autores relataram a associação de *Rhipicephalus sanguineus* na Itália (ALBERTI et al., 2005), de *Dermacentor (Anocentor) nitens* na Guatemala (TEGLAS et al., 2005) e de *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma* sp. no Brasil (SALVAGNI et al., 2010) com o diagnóstico molecular e sorológico para *A. phagocytophilum*.

Nos EUA, a ocorrência de AGE é mais elevada, principalmente, nas estações de outono, inverno e primavera, com a maior incidência em março (MADIGAN; GRIBBLE, 1987). Essa ocorrência sazonal de infecções por *A. phagocytophilum* está correlacionada com a ocorrência dos carrapatos vetores (VREDEVOE et al., 1999).

2.7 Locais primários de multiplicação

Os estágios iniciais da patogênese de *A. phagocytophilum* em seus hospedeiros mamíferos necessita ser melhor estudado, uma vez que não é estabelecido se a bactéria replica na derme, após a picada do carrapato, antes do desenvolvimento da bacteremia, a qual ocorre quatro a sete dias após a infecção (FRANZÉN et al., 2005; WOLDEHIWET, 2010). Até mesmo quando animais susceptíveis são inoculados com sangue infectado, a bacteremia não é detectada por até 72 a 96 horas. Parece então que *A. phagocytophilum* permanece em níveis não detectáveis no sangue ou replica em outras células, antes de desenvolver a bacteremia.

Segundo Walker e Dumler (1996), variantes de AGH provavelmente infectam precursores mielóides na medula óssea ao invés de neutrófilos maduros. No entanto, nenhuma evidência de infecção em neutrófilos imaturos no sangue periférico de ovinos infectados com *A.*

phagocytophilum foi observada (WOLDEHIWET; SCOTT, 1982c). Quando ovinos infectados com variantes de FTC foram tratados com dexametasona, durante o pico da bacteremia, a proporção de granulócitos circulantes elevou cerca de 90% dentro de duas horas, no entanto, a percentagem de neutrófilos infectados foi reduzida. Isto sugere que neutrófilos imaturos mobilizados da reserva da medula óssea não são infectados antes de chegar ao sangue periférico.

Estudos mais recentes *in vitro* mostraram que células do endotélio vascular podem suportar o desenvolvimento de variantes de AGH (MUNDERLOGH et al., 2004). Assim, caso essas células sejam infectadas *in vivo*, elas podem ter papel importante na patogênese da anaplasmoze granulocítica como células hospedeiras ou como células apresentadoras de antígenos. Além disso, podem influenciar a resposta inflamatória pelo aumento da permeabilidade vascular, seguida da passagem de leucócitos e a produção de quimocinas, de moléculas de adesina e citocinas pro-inflamatórias (CINES et al., 1998).

2.8 Bacteremia e sinais clínicos de anaplasmoze granulocítica equina

Os neutrófilos e os eosinófilos são as principais células infectadas por *A. phagocytophilum* durante o período de bacteremia (GRIBBLE, 1969; STANNARD et al., 1969; MANDIGAN, 1993). No entanto, os monócitos podem ser ocasionalmente infectados no fim da bacteremia primária em ruminantes (WOLDEHIWET, 1987a). Durante o pico da bacteremia em equinos, cerca de 30% dos granulócitos, principalmente neutrófilos, são infectados (STANNARD et al., 1969). Em outro estudo, o percentual de neutrófilos infectados variou de 0,5 a 16% em função do tempo após a infecção e entre os equinos (FRANZÉN et al., 2005).

Em bovinos, equinos e ovinos infectados com *A. phagocytophilum*, o período de bacteremia é acompanhado de febre alta, que normalmente dura cerca de sete dias, mas pode permanecer por períodos mais longos (TUOMI, 1967a; GRIBBLE, 1969; WOLDEHIWET, 1987a). A febre em bovinos, ovinos e equinos pode ser superior a 40°C, e alcança seu pico dois a três dias após o início da detecção de *A. phagocytophilum* na corrente sanguínea (FOGGIE, 1951; WOLDEHIWET, 1987a; FRANZÉN et al., 2005). Reações febris secundárias podem também ocorrer duas a quatro semanas após a primeira.

Equinos naturalmente infectados por *A. phagocytophilum* apresentam sinais clínicos que incluem febre alta, anorexia, depressão, edema de membros, relutância em se locomover, ataxia e petéquias (GRIBBLE, 1969; MADIGAN; GRIBBLE, 1987). Em outro estudo, Artursson et al. (1999) observaram sinais clínicos semelhantes aos descritos anteriormente, além da observação de processos infecciosos, claudicações e alterações gastro-intestinais. Sinais clínicos semelhantes aos observados em infecções naturais também foram observados em equinos experimentalmente infectados com cepa européia de *A. phagocytophilum* (FRANZÉN et al., 2005). No entanto, outros sinais clínicos, além daqueles descritos anteriormente, foram observados por estes autores e incluem perda parcial ou total do apetite e aumento das frequências cardíaca e respiratória. O início dos sinais clínicos variou de seis a nove dias após a inoculação, seguidos de diminuição dos sinais 22 dias após. O período febril variou de cinco a dez dias, sendo a febre o primeiro sinal observado.

O período de incubação de AGE pode variar em função da forma de infecção. Equinos infectados através do parasitismo de carrapatos infectados com *A. phagocytophilum* (REUBEL et al., 1998; PUSTERLA et al., 1999) manifestam sinais clínicos mais tardiamente do que aqueles infectados através da inoculação intravenosa de *A. phagocytophilum* (FRANZÉN et al., 2005). No entanto, em ambas as situações a gravidade dos sinais clínicos foi semelhante. Além disso, AGE tem se manifestado de forma inespecífica, o que sugere diferentes graus de susceptibilidade

dos hospedeiros a uma mesma cepa de *A. phagocytophilum* e/ou a presença de cepas diferentes em uma mesma área. Segundo Stuen (2007), a gravidade da infecção é influenciada por diversos fatores, como a variante de *A. phagocytophilum* envolvida, outras infecções concomitantes, a idade dos equinos, estado imune e condição geral do hospedeiro, bem como fatores climáticos e de manejo dos animais.

2.9 Alterações hematológicas e patológicas em anaplasiose granulocítica equina

As alterações hematológicas em AGE, normalmente coincidem com o período de manifestação dos sinais clínicos da doença. Equinos com AGE apresentam anemia, icterícia, trombocitopenia, leucopenia e presença de corpúsculos de inclusão (mórula) no citoplasma de neutrófilos e eosinófilos (MADIGAN; GRIBBLE, 1987; REUBEL et al., 1998). Equinos infectados experimentalmente com *A. phagocytophilum* apresentam leucopenia transitória com neutropenia e marcada linfocitopenia, além de trombocitopenia bem definida (FRANZÉN et al., 2005). A trombocitopenia em equinos parece ser mais evidente que a observada em ruminantes, cães e humanos, uma vez que hemorragias, petéquias, equimoses e edemas são mais evidentes em equinos com AGE (GRIBBLE, 1969; BAKKEN; DUMLER, 2000; POITOUT et al., 2005). As alterações leucocitárias se manifestam durante o período febril, no qual também se observa quadro de anemia moderada. Estes autores ainda relataram a observação de corpúsculos de inclusão desde o primeiro até o quinto dia do início dos sinais clínicos, os quais persistiram por um período de seis a dez dias.

Alguns estudos descrevem lesões patológicas causadas por infecções com *A. phagocytophilum* em humanos, equinos e ovinos (BAKEN et al., 1994; HARDALO et al., 1995; AGUERO-ROSENFELD et al., 1996; WALKER; DUMLER, 1997; LEPIDI et al., 2000). Segundo esses estudos, os órgãos mais intensamente afetados pela infecção com *A. phagocytophilum* são aqueles do sistema fagocítico mononuclear, especialmente o baço, o fígado, a medula óssea e os linfonodos. Segundo Lepidi et al. (2000) a infecção com *A. phagocytophilum* em equinos, ovinos e humanos promove alterações semelhantes no baço, no fígado e linfonodos destes animais. Dentre elas, destaca-se a moderada depleção linfóide e a eritrofagocitose no baço, a presença de agregado de células inflamatórias perivenulares e nos pequenos sinusóides com apoptose ocasional de hepatócitos e, por fim, histiocitose e hiperplasia paracortical em linfonodos. Em equinos, ainda observa-se vasculite na musculatura esquelética e nos tendões das extremidades. Vasculite proliferativa e necrotizante de pequenas artérias e veias dos membros foram previamente descrita em equinos (GRIBBLE, 1969).

A patogênese da anaplasiose granulocítica nas diferentes espécies animais é pouco conhecida. Após a penetração de *A. phagocytophilum* na derme, via inoculação pela picada do carrapato vetor e, posteriormente difusão, presumivelmente via sistema linfático ou hematogênica, ocorre a invasão das células alvos. Existem evidências *in vitro* de atividade citolítica causada por *A. phagocytophilum* (GOODMAN et al., 1996; JONGEJAN et al., 1989). Após a infecção, uma cascata de eventos inflamatórios de caráter localizado pode ser iniciada. Certamente, os neutrófilos estão implicados na patologia de muitas condições inflamatórias (WEISS, 1989). A lesão ao tecido pode ocorrer através de vários mecanismos independentes. O mecanismo mais importante é a combinação de processos oxidativos e enzimáticos que parecem ser ativados, simultaneamente, com o início da fagocitose (SMITH, 1994). Algumas hipóteses sugerem que a patogênese das lesões teciduais observadas não seja causada diretamente pelo organismo erliquial, mas em parte mediada pelo hospedeiro (LEPIDI, 2000). Isso se deve a dificuldade de identificar agentes erliquiais nos tecidos.

2.10 Persistência da infecção por *Anaplasma phagocytophilum* e o estado de portador

A infecção por *A. phagocytophilum* pode ter caráter persistente, porém pode diferir conforme as variações individuais, variantes genéticas e espécies hospedeiras envolvidas. Tem sido observada infecção persistente de *A. phagocytophilum* em várias espécies, tais como ovinos (FOGGIE, 1951), equinos (CHANG et al., 1998; FRANZÉN et al., 2009), caninos (EGENVALL et al., 2000), cervídeos (STUEN et al., 2001) e bovinos (LARSSON et al., 2006).

Em ovinos, estabeleceu-se que após a recuperação de uma infecção experimental ou natural com *A. phagocytophilum*, os animais se tornam portadores por várias semanas ou até mesmo anos. Estudo desenvolvido por Foggie (1951) demonstrou que o sangue de um ovino permaneceu infectivo a outro ovino livre 25 meses após a infecção primária. Ovinos persistentemente infectados não desenvolvem sinais clínicos graves, no entanto, a bacteremia pode ser induzida por esplenectomia ou tratamento com drogas imunossupressoras (FOGGIE, 1951). Em animais infectados sob condições naturais, a detecção de *A. phagocytophilum* no sangue periférico parece ser afetada pelo número e frequência de infestações por carrapatos. Isto se deve ao aumento no número de carrapatos alimentando sobre os animais, o que altera o nível de bacteremia, ou devido à frequência de re-infecções (OGDEN et al., 2002a). Os locais onde *A. phagocytophilum* persiste nos hospedeiros, entre períodos de recorrência de bacteremia, não estão totalmente esclarecidos. Estudos demonstram que durante a fase aguda da bacteremia, *A. phagocytophilum* pode ser observado em macrófagos alveolares, células de kupffer, além de outros macrófagos teciduais (MUNRO et al., 1982; LEPIDI et al., 2000).

Segundo Nyindo et al. (1978) a condição de portador em equinos infectados com variantes de AGE é incomum, no entanto, tem sido observada infecção persistente por *A. phagocytophilum* (CHANG et al., 1998; FRANZÉN et al., 2009). Em equinos infectados com variantes de AGH detectou-se o DNA do agente através da PCR nos músculos, fascias, peritônio e glândula adrenal 38 dias após a infecção experimental (CHANG et al., 1998). Estes autores sugeriram que a capacidade de *A. phagocytophilum* sobreviver em tecidos conectivos com pouca vascularização, favoreceria a persistência da infecção, uma vez que os anticorpos podem ter dificuldade de penetrar nestes tecidos. No entanto, este estudo não forneceu evidência clara para sugerir que outras células, além dos granulócitos ou monócitos/macrófagos são refúgios da infecção. Recentemente, Franzén et al. (2009) demonstraram, pela primeira vez, evidência de infecção persistente de equinos com *A. phagocytophilum* por aproximadamente quatro meses após a infecção experimental. Um fato interessante observado por estes autores foi a detecção do DNA de *A. phagocytophilum* no sangue dos equinos, particularmente após imunossupressão por dexametasona ou após o estresse do transporte. Esse último pode deprimir o sistema de defesa imunológica e parece afetar negativamente a função dos neutrófilos em equinos (RAIDAL et al., 1997). Após a recuperação da fase aguda de AGE, nenhum equino apresentou sinal clínico característico da doença, mesmo que o DNA de *A. phagocytophilum* tenha sido detectado (CHANG et al., 1998; FRANZÉN et al., 2009).

Estudos imunológicos com *A. phagocytophilum* indicam que ambas as respostas imunes mediada por células e humoral são caracterizadas pela produção prematura de anticorpos específicos do tipo IgG, com títulos significantes, 19 dias após a infecção, e pico aproximadamente oito semanas após a infecção (VAN ANDEL et al., 1998; SELLON; LONG, 2007). Em equinos naturalmente infectados, evidências sugerem a persistência da imunidade por pelo menos dois anos e não parece depender de infecção latente ou do estatus de portador (SELLON; LONG, 2007). Já em infecção experimental, os títulos de anticorpos da classe IgG

anti-*A. phagocytophilum* persistem por aproximadamente 300 dias após a infecção e, posteriormente, os animais tendem a se tornarem progressivamente soronegativos, ao menos que ocorra re-infecção (NYINDO et al., 1978).

É importante ressaltar o papel de infecções persistentes associadas ao trânsito de animais portadores, os quais podem contribuir para a dispersão de *A. phagocytophilum* entre diferentes áreas geográficas.

2.11 Diagnóstico de Anaplasmosse Granulocítica Equina

O diagnóstico de AGE é baseado nos achados clínicos e laboratoriais, além de outros fatores como infestação por carrapatos, período do ano e localização geográfica (RIKIHISA, 1991). Os testes para o diagnóstico laboratorial incluem hemograma, exame microscópico de esfregaço de sangue ou de capa leucocitária corado com o Giemsa para pesquisa de corpúsculos de inclusão em neutrófilos e eosinófilos, pesquisa de anticorpos da classe IgG através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio enzimático de imuno-adsorção (ELISA) e métodos moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) (MADIGAN et al., 1995).

A visualização direta de inclusões características de *A. phagocytophilum* no citoplasma de granulócitos, através de esfregaço de sangue ou de capa leucocitária, somente é útil na fase aguda da doença, a qual dura poucos dias (RIKIHISA, 1991; MADIGAN et al., 1995). Segundo Franzén et al. (2005), a presença de inclusões em neutrófilos como ferramenta de diagnóstico de AGE possui elevada especificidade, porém baixa sensibilidade, uma vez que a visualização das inclusões está limitada no decorrer da doença. Estes autores observaram que a visualização das inclusões esteve correlacionada ao aparecimento da febre, a qual corresponde ao período de bacteremia. No entanto, os sinais clínicos observados não são patognomônicos para AGE, uma vez que, equinos com a doença podem apresentar inclusões detectáveis em granulócitos e apresentarem apenas alguns sinais clínicos.

Métodos de isolamento de erliquias granulocíticas através de cultivo em células de carrapatos (MUNDERLOH et al., 1996) e em células HL-60 (GOODMAN et al., 1996; HEIMER et al., 1997) são descritos, no entanto, não são considerados métodos de diagnóstico satisfatórios, uma vez que não são aplicáveis na rotina clínica.

Outro método de diagnóstico direto é a detecção do DNA genômico de *A. phagocytophilum* através da PCR, o qual apresenta alta sensibilidade e especificidade. Em muitas espécies de hospedeiros, incluindo equinos, cães e humanos, a anaplasmosse granulocítica é uma doença aguda e considerada autolimitante, na qual o DNA de *A. phagocytophilum* somente pode ser amplificado durante um período de aproximadamente três semanas (MADIGAN, 1993; GREIG et al., 1996; DUMLER; WALKER, 2001). No entanto, a detecção do DNA de *A. phagocytophilum* foi demonstrada em equinos 38 dias (CHANG et al., 1998) e aproximadamente quatro meses (FRANZÉN et al., 2009) após a infecção experimental. A utilização de técnicas baseadas na PCR, associadas à visualização de inclusões em granulócitos, é muito importante para o diagnóstico de AGE na forma aguda. Franzén et al. (2005) observaram que nos primeiros dias após a infecção os equinos apresentaram-se positivos na PCR, no entanto, nenhuma inclusão sugestiva de *A. phagocytophilum* foi observada em esfregaços de sangue. Isso sugere que ambas os métodos de diagnóstico devem ser utilizados na fase aguda de AGE para que se possa confirmar a infecção. Existem vários métodos de diagnóstico baseado na PCR já descritos na literatura para avaliação da anaplasmosse granulocítica em sua forma ativa. Esses incluem o ensaio *nested* PCR baseado no gene 16S rRNA (BARLOUGH et al., 1996; MASSUNG et al.,

1998), o ensaio tendo como alvo o gene *GroESL* que codifica a proteína de choque térmico (SUMNER et al., 1997) e o protocolo da PCR em tempo real utilizando o sistema TaqMan (TM-PCR) para o gene 16S rRNA e *msp2* (PUSTERLA et al., 1999; DRAZENOVICH et al., 2006).

A sensibilidade dos métodos moleculares de diagnóstico baseado na PCR pode ser influenciada pela variação genética existente entre cepas regionais de *A. phagocytophilum* (DRAZENOVICH et al., 2006). Esses autores compararam o protocolo TM-PCR para o gene *msp2* com aqueles ensaios já descritos e observaram que a TM-PCR para o gene 16S rRNA (PUSTERLA et al., 1999) apresenta baixa sensibilidade para cepas circulantes no norte da Califórnia, nos EUA. Já o ensaio *nested* baseado no gene 16S rRNA (BARLOUGH et al., 1996) apresentou baixa sensibilidade analítica, não detectando amostras com pouca quantidade de DNA de *A. phagocytophilum*. A utilização do gene *msp2* como alvo na reação melhora a especificidade, uma vez que este alvo não está presente em algumas bactérias relacionadas com *A. phagocytophilum*, como *E. chaffeensis*, *Rickettsia rickettsii* ou *Bartonella henselae* (MASSUNG; SLATER, 2003). Segundo esses autores, o sequenciamento do produto amplificado na PCR é importante para certificar que aquele produto é o esperado.

Como a visualização de *A. phagocytophilum* no sangue é possível durante um período de tempo limitado, outros métodos, além dos moleculares, são essenciais para se estabelecer um diagnóstico. Assim métodos sorológicos, através da RIFI e ELISA são utilizados para demonstração de anticorpos circulantes anti-*A. phagocytophilum* e auxiliar no diagnóstico clínico (AGUERO-ROSENFELD et al., 2000; SALVAGNI et al., 2010). No entanto, grande parte dos equinos que possuem níveis significantes de anticorpos circulantes não apresenta sinais clínicos de AGE (MADIGAN et al., 1990; VAN ANDEL et al., 1998). A soroconversão em equinos infectados com *A. phagocytophilum* pode ocorrer em aproximadamente duas semanas e os títulos de anticorpos da classe IgG podem persistirem por meses (FRANZÉN et al., 2005). No entanto, diferenças na dinâmica de produção de anticorpos foram observadas por estes autores, no que se refere a forma de infecção dos equinos, se experimental ou natural. A pesquisa de anticorpos anti-*A. phagocytophilum* é mais bem aplicada em estudos epidemiológicos da doença em uma determinada área (DRAZENOVICH et al., 2006). A soroprevalência em uma região, normalmente excede a prevalência baseada na PCR, a menos que esteja ocorrendo surto da doença. No entanto, a prevalência baseada na PCR pode ser alta em hospedeiros reservatórios, tais como os roedores *P. leucopus* ou *N. fuscipes*, uma vez que infecções persistentes foram registradas nessas espécies (TELFORD et al., 1996; NICHOLSON et al., 1999; FOLEY et al., 2002). Resultados sorológicos negativos na fase inicial da infecção por *A. phagocytophilum* podem ocorrer, devido à ausência de anticorpos da classe IgG nas duas primeiras semanas após a infecção (AGUERO-ROSENFELD et al., 2000; DRAZENOVICH et al., 2006). Dessa forma, recomenda-se realizar o diagnóstico sorológico em amostras pareadas para verificar a soroconversão. Além disso, é importante considerar a co-infecção com outros patógenos erliquiais e a possibilidade de reações cruzadas entre eles (DUMLER et al., 1995; BAKKEN et al., 1996; DREHER et al., 2005).

Embora a sorologia seja o método padrão disponível para confirmar a exposição a diferentes parasitos, a PCR vem sendo introduzida como uma ferramenta importante no diagnóstico de anaplasiose granulocítica em animais domésticos e em humanos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição da região estudada

O estudo foi realizado na microrregião de Itaguaí, pertencente à mesorregião metropolitana do Rio de Janeiro (Figura 7).

- **Microrregião de Itaguaí** (Municípios de Itaguaí, Mangaratiba e Seropédica)

Coordenadas geográficas:

Itaguaí: 22°51'08'' latitude Sul; 43°46'31'' longitude Oeste; altitude: 13 metros.

Mangaratiba: 22°57' 36" latitude Sul; 44°02'27'' longitude Oeste; altitude 18 metros.

Seropédica: 22°44'38'' latitude Sul; 43°42'27'' longitude Oeste; altitude 26 metros.

O clima da microrregião de Itaguaí é caracterizado como tropical com estação seca de e chuvas no verão (Aw) segundo classificação de Köppen-Geiger (PEEL et al., 2007). Este clima apresenta temperatura média do mês mais frio do ano >18°C e temperatura média máxima acima de 25°C. Estação de inverno bem definida.

3.2 Tamanho da amostra e amostragem

Pela ausência de estudos soro-epidemiológicos relacionados à presença de anticorpos anti-*A. phagocytophilum* no Brasil, realizou-se um estudo piloto com 100 amostras de equinos coletadas de 11 propriedades localizadas no município de Seropédica. As amostras foram testadas pela RIFI e observou frequência de anticorpos anti-*A. phagocytophilum* em 17% dos equinos. Para determinar a soroprevalência de *A. phagocytophilum* em equinos na microrregião de Itaguaí, seria necessário coletar no mínimo 340 amostras. Essa estimativa foi baseada na equação descrita por Sampaio (2002) a seguir:

$$n = \frac{1,96^2 \times P_{\text{esp}} (1 - P_{\text{esp}})}{d^2}$$

onde: n = tamanho da amostra; P_{esp} = prevalência esperada; d^2 = precisão absoluta desejada.

Para o cálculo do tamanho amostral, utilizou-se a frequência esperada de 17%, obtida no estudo piloto, intervalo de confiança de 95% e margem de erro de 4%. A seleção das propriedades foi realizada por conveniência não probabilística e, após o consentimento do proprietário ou responsável, as amostras foram coletadas ao acaso. Em situações, nas quais o número de equinos foi inferior a 10, a coleta foi realizada de todos os animais. Por outro lado, quando o número de animais foi superior a 10 a coleta se restringiu a 10% da população de equinos. O número total de 350 amostras foram coletadas em 31 propriedades localizadas na microrregião de Itaguaí, as quais foram distribuídas da seguinte forma: Itaguaí (n=116), Mangaratiba (n=90) e Seropédica (n=144). As 100 amostras coletadas no estudo piloto fizeram parte das 350 amostras coletadas. No entanto, apenas as amostras do estudo piloto foram utilizadas para o estudo soro-epidemiológico em função da falta de kits sorológicos.

Em cada local de coleta a altitude foi registrada e os pontos georreferenciados com a utilização de receptores de Sistema de Posicionamento Global (GPS). O sistema de referência utilizado foi *South American Datum 1969* (SAD69). Para a geração do mapa de localização da área do estudo utilizou-se o *software ARC GIS® 9 da ESRI* (Figura 7).

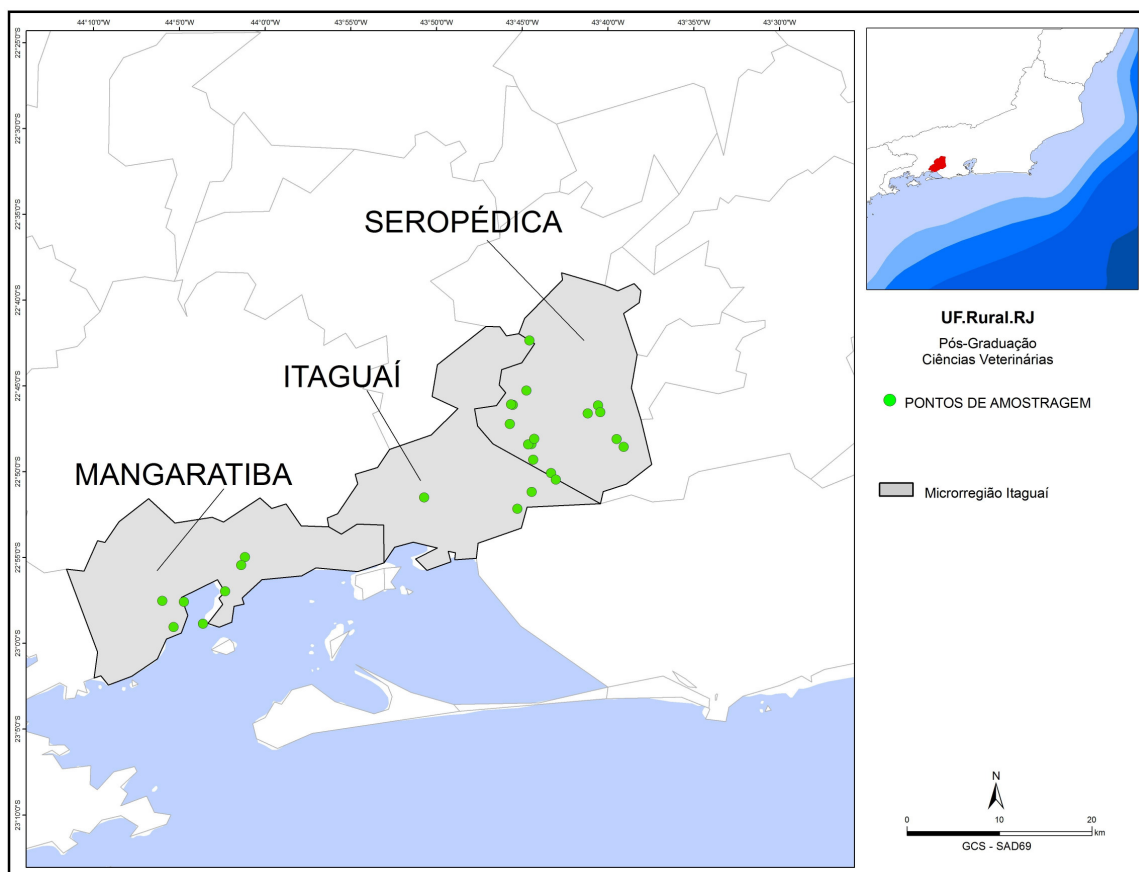


Figura 7. Localização geográfica das coletas de dados (pontos em verde) nas microrregiões de Itaguaí, com os municípios de Itaguaí, Mangaratiba e Seropédica, no estado do Rio de Janeiro.

3.3 Questionário epidemiológico

Antes da coleta de material dos equinos os proprietários ou funcionários responsáveis foram informados sobre o estudo, sua importância e se a coleta de sangue e carrapatos dos equinos poderia ser realizada. Após autorização, foi aplicado um questionário (Anexo) com o objetivo de avaliar os possíveis fatores associados (sexo, idade, atividade dos equinos, parasitismo por carrapatos e soropositividade para *T. equi*) com a presença de anticorpos anti-*A. phagocytophilum*.

3.4 Coleta de sangue e carrapatos

De cada animal foram coletadas amostras de sangue, através da punção da veia jugular, utilizando o sistema a vácuo. As amostras foram coletadas em um tubo de 10mL sem anticoagulante e em dois tubos de 5mL contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Os tubos contendo as amostras de sangue foram devidamente identificados e mantidos refrigerados a 4°C até serem conduzidos ao Laboratório de Hemoparasitos e Vetores, situado na Estação para Pesquisa Parasitológica W.O. NEITZ, pertencente ao Departamento de Parasitologia Animal/ Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro entre os paralelos 22°41' 22°45' de latitude sul e os meridianos 43°38' 43°42' de longitude oeste de Greenwich. No laboratório, os tubos sem anticoagulante foram centrifugados a 6000 x g por 10 minutos para separação do coágulo e obtenção do soro. Em seguida, aproximadamente 1,0mL de soro foram

aconicionados em microtubos de polipropileno de 1,5mL, devidamente identificados e mantidos a temperatura de -20°C até a realização do diagnóstico sorológico. As amostras de um dos tubos com EDTA foram imediatamente submetidas à realização do hemograma em contador automático de células (ABC VET, HoribaABX). Posteriormente, ambos os tubos contendo sangue com EDTA foram centrifugados durante 5 minutos a 2500 x g. Posteriormente, a capa leucocitária foi separada, acondicionada em microtubos de polipropileno de 1,5mL, estéreis e armazenada a -80°C para posterior extração do DNA.

Todos os animais foram inspecionados visualmente por todo o corpo, com ênfase na região do pavilhão auricular, da cabeça, do pescoço, do peitoral, das axilas, inguinal e por fim, embaixo da cauda, para identificação de animais infestados por carrapatos. Naqueles animais parasitados, o grau de infestação por cada espécie de carrapato foi categorizado segundo Teglas et al. (2005). Equinos não parasitados, com infestação leve (1 a 20 carrapatos por animal), moderada (21 a 50 carrapatos por animal) e intensa (acima de 50 carrapatos por animal). Posteriormente, foram coletados carrapatos de cada animal e armazenados em álcool isopropílico para identificação de adultos em nível de espécie por meio de chave dicotômica apropriada (BARROS-BATTESTI et al., 2006).

3.5 Análises hematológicas

Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Hemoparasitos e Vetores, localizado na Estação Experimental de Pesquisa Parasitológica W.O. NEITZ do Departamento de Parasitologia Animal – Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. A avaliação hematológica foi composta pela determinação dos seguintes parâmetros através do contador automático de células (ABC VET, HoribaABX): volume globular (VG), hematimetria (HEM), concentração de hemoglobina (HB), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), plaquetometria (PLAQ), volume plaquetário médio (VPM), leucometria global, número de linfócitos (LINF), de monócitos (MON) e de granulócitos (GRAN). A concentração de proteína plasmática total (PPT) e fibrinogênio (FIB) foram determinados através de refratometria (COLES, 1984).

3.6 Reação de imunofluorescência indireta

A técnica foi realizada empregando-se o IgG IFA kit de *A. phagocytophilum* (Fuller Laboratories®, USA), conforme as recomendações do fabricante. O controle positivo e o controle negativo foram ambos fornecidos pelo kit acima citado. Foram consideradas positivas as amostras de soro que apresentaram fluorescência específica para *A. phagocytophilum* na diluição de 1:80, conforme Figura 8.

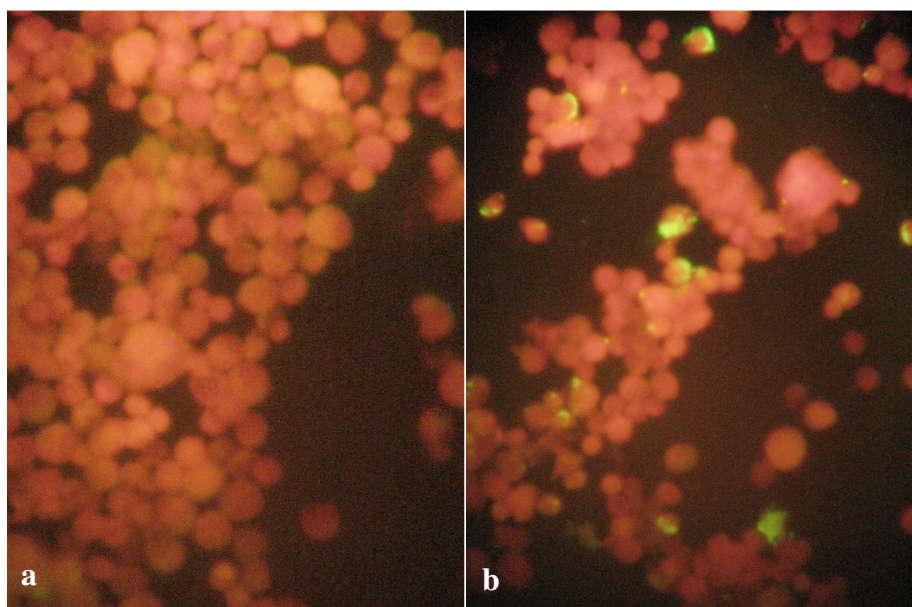


Figura 8. Reação de imunofluorescência indireta em lâminas contendo cultura de células HL60 infectadas com *Anaplasma phagocytophilum*. Soro controle negativo (a) e amostra de soro equino demonstrando fluorescência específica para *Anaplasma phagocytophilum* na diluição de 1:80 (b).

3.7 Extração do DNA e PCR em tempo real

O DNA total de 350 amostras de capa leucocitária foi extraído empregando-se o DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen®, Valencia, CA), conforme as recomendações do fabricante. Para extração, utilizou-se 80µL de amostra de capa leucocitária para cada amostra. A concentração e a pureza do DNA extraído foram verificadas em espectrofotômetro (Nanodrop 2000c-Thermo Scientific). Amostras que apresentaram concentrações de DNA inferiores a 30ng/µL e pureza abaixo de 1,8 para relação 260/280nm, correspondente à proteína, não foram utilizadas na PCR e nova extração foi realizada.

O DNA genômico de *A. phagocytophilum* foi extraído a partir de lâminas contendo antígenos para imunofluorescência, utilizando o mesmo kit de extração descrito anteriormente, e utilizado como controles positivo da PCR em tempo real. Para controles negativo da reação utilizou-se água ultrapura.

As análises moleculares foram realizadas através da PCR em tempo real utilizando o sistema SYBR Green, com base no protocolo descrito por Santos et al. (2011 - **artigo aceito**). Na reação foram utilizados os *primers* 903F (5'AGTTTGACTGGAACACACCTGATC3') e 1024R (5'CTCGTAACCAATCTCAAGCTCAAC3'), baseados no gene *msp2* para amplificação de um fragmento de 122pb (DRAZENOVICH et al., 2006). O volume final de cada reação foi de 12µL. Desse volume, 6µL foi de Power SYBR® Green PCR Master Mix (2X), 0.9µM de cada *primer* e 3µL do DNA extraído (aproximadamente 90ng).

Após a amplificação foi gerado curvas de dissociação, a fim de verificar a especificidade da amplificação. As amostras que apresentaram limiar de detecção (C_T) inferior a 35 ciclos e temperatura de dissociação (T_m) próximas as dos controles positivo foram consideradas positivas. Posteriormente, os produtos amplificados na PCR em tempo real, incluindo os controles positivo e negativo, foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 2%, corados com

brometo de etídeo e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta. O fragmento amplificado foi comparado com o tamanho esperado de 122pb do gene *mSP2*, específico para *A. phagocytophilum*.

3.8 Análises estatísticas

As frequências de anticorpos anti-*A. phagocytophilum* foram avaliadas em função do sexo, faixa etária, atividade e do parasitismo por carrapatos através do teste Exato de Fisher em nível de 5% de significância. Os resultados relacionados aos parâmetros hematológicos foram submetidos à análise de variância e, quando significativos comparados pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney em nível de 5% de significância utilizando o programa BioEstat 4.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo soro-epidemiológico de anaplasrose granulocítica equina no município de Seropédica

A frequência de anticorpos anti-*A. phagocytophilum* em equinos do município de Seropédica no estado do Rio de Janeiro e os fatores relacionados à soropositividade estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Frequência de anticorpos anti-*A. phagocytophilum* em equinos do município de Seropédica no estado do Rio de Janeiro e fatores relacionados à soropositividade.

Fator	N	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	
		n	%
Frequência	100	17	17
Sexo			
Macho	46	9	19,57 ^a
Fêmea	54	8	14,81 ^a
Faixa etária (anos)			
<1	12	0	0,00 ^b
1<5	17	2	11,76 ^{ab}
5<10	37	5	13,51 ^{ab}
≥10	34	10	29,41 ^a
Atividade			
Exposição	12	2	16,67 ^a
Reprodução	42	8	19,05 ^a
Trabalho	34	7	20,59 ^a
ND (potro)	12	0	0,00 ^a
Carrapato			
Ausente	18	2	11,11 ^a
Presente	82	15	18,29 ^a
Espécies de carrapatos			
Ausente	18	2	11,11 ^a
<i>Amblyomma cajennense</i>	19	6	31,58 ^a
<i>Dermacentor nitens</i>	1	0	0,00 ^a
<i>A. cajennense</i> / <i>D. nitens</i>	62	9	14,52 ^a
<i>Theileria equi</i>			
Positivo	90	16	17,78 ^a
Negativo	10	1	1,00 ^a

^aValores, seguidos de letras iguais, nas categorias, não diferem entre si pelo teste Exato de Fisher a 5% de significância. N: número de animais examinados pela RIFI; n: número de animais soropositivos.

A frequência de equinos soropositivos para *A. phagocytophilum* observada foi de 17% (n=17) das amostras examinadas através da RIFI no município de Seropédica. Das 11 propriedades selecionadas para coleta no município de Seropédica, em quatro delas, os equinos examinados não apresentaram sorologia positiva para *A. phagocytophilum*. No Brasil, há uma carência de estudos sorológicos para *A. phagocytophilum* ou a detecção do DNA desse agente nos animais domésticos, selvagens e até mesmo em humanos. No estado de São Paulo, De Paiva

Diniz et al. (2007) examinaram 198 cães com anormalidades consistentes de infecções causadas por agentes patogênicos transmitidos por carrapatos e nenhuma evidência sorológica e molecular de infecção por *A. phagocytophilum* foi detectada. Recentemente, anticorpos anti-*A. phagocytophilum* foram detectados em 65% (n=13) dos equinos com sinais clínicos sugestivos de AGE examinados através do teste ELISA (SALVAGNI et al., 2010).

No presente estudo, a frequência de equinos soropositivos para *A. phagocytophilum* foi semelhante à encontrada em outros países como na Suíça (EGENVALL et al., 2001) com 16,7% (n=337), na França (LEBLOND et al., 2005) com 11,3% (n=50), na Espanha (AMUSATEGUI et al., 2006) com 6,52% (n=46), na Itália (PASSAMONT et al., 2010) com 17,03% (n=135), na Dinamarca (HANSEN et al., 2010) com 29% (n=113), nos EUA (MADIGAN et al., 1990) com 10,4%, na Guatemala (TEGLAS et al., 2005) com 13% (n=10) de equinos soropositivos. A diferença observada pode estar associada ao número de animais examinados, ao teste sorológico utilizado, a linha de corte adotada para identificar os animais positivos e o grau de exposição aos carrapatos vetores nas diferentes áreas geográficas.

A soropositividade dos equinos para *A. phagocytophilum* apresentou associação ($p=0,044$) com a idade dos equinos como pode ser observado na Tabela 5. Nenhum equino com idade <1 ano apresentou anticorpos da classe IgG anti-*A. phagocytophilum*, diferindo estatisticamente das demais categorias. Além disso, observou-se tendência de aumento na frequência de equinos soropositivos para *A. phagocytophilum* em função do incremento da idade. A frequência de equinos soropositivos com idade ≥ 10 foi de 29,41% (n=10), superior a observada em animais com faixa etária de $5 < 10$ e de $1 < 5$, com 18,29% (n=15) e 11,76% (n=2), respectivamente.

Por outro lado, os demais fatores avaliados (sexo, atividade, parasitismo por carrapatos e soropositividade para *T. equi*) não apresentaram associação com a soropositividade para *A. phagocytophilum*. No entanto, algumas observações importantes podem ser destacadas. A atividade dos equinos não influenciou significativamente a frequência de equinos soropositivos, no entanto, observa-se maior frequência de animais sororreagentes naqueles utilizados para trabalho, seguido daqueles utilizados para reprodução e para exposição, com, respectivamente, 20,59% (n=7), 19,05% (n=8) e 16,67% (n=2) de soropositividade.

Semelhante às observações realizadas anteriormente, observou-se maior frequência de anticorpos anti-*A. phagocytophilum* nos equinos que se apresentavam infestados por *A. cajennense* e/ou *D. nitens* quando comparado aos animais não infestados, com 18,29% (n=15) e 11,11% (n=2) de soropositividade. Apenas dois equinos encontravam parasitados por *R. (B.) micropluse* não foram incluídos na análise. Quando se avaliou a soropositividade em função da infestação pelas diferentes espécies de carrapatos encontradas sobre o corpo dos animais, observou maior frequência de animais positivos naqueles infestados por *A. cajennense*, 31,58% (n=6), seguido por aqueles infestados por ambas as espécies, 14,52% (n=9).

Os vetores de *A. phagocytophilum* são carrapatos do gênero *Ixodes*. No entanto, no Brasil, não há registros de carrapatos desse gênero parasitando equinos. Estudos já registraram o parasitismo por *Ixodes amarali* em roedores dos gêneros *Oryzomys*, *Bolomys* (= *Zygodontomys*), *Holochilus*, *Akodon* e *Rhipidomys*, provenientes dos estados de Alagoas, Ceará e Pernambuco e em marsupiais da espécie *Monodelphis domestica* (cuíca), provenientes dos estados de Pernambuco e Paraíba (FONSECA, 1957). Posteriormente, Faccini et al. (1999) registraram o parasitismo de *I. amarali* em gambás do gênero *Didelphis* no município de Seropédica, Rio de Janeiro. No entanto, nenhum estudo comprovou o papel desse carrapato como vetor de *A. phagocytophilum*. No presente estudo, *A. cajennense* e *D. (A.) nitens* foram as principais espécies de carrapatos encontradas parasitando os equinos. Em estudo realizado por Teglas et al. (2005)

foi observada associação da soropositividade dos equinos para *A. phagocytophilum* com o parasitismo por *D. (A.) nitens*. Esse resultado não foi observado no presente estudo, no entanto, observou-se aumento não significativo na frequência de equinos soropositivos quando infestados por *A. cajennense*, o que corrobora os resultados observados por Salvagni et al. (2010) e Santos et al. (2011 - **artigo aceito**). No Brasil, esse carrapato é o principal vetor de *Rickettsia rickettsi* (DIAS; MARTINS, 1939; GUEDES et al., 2005) e os equinos são considerados, junto com capivaras e antas, os principais hospedeiros para todos os estágios de *A. cajennense* (LABRUNA et al., 2002). Dessa forma, sugere a participação, principalmente de *A. cajennense*, e de *D. (A.) nitens* na transmissão de *A. phagocytophilum* na região estudada, no entanto, essa possibilidade deve ser investigada em estudos futuros.

Mesmo não havendo associação entre equinos soropositividade para *T. equi* e e aqueles soropositivos para *A. phagocytophilum*, é interessante ressaltar que dentre os 17 equinos soropositivos para *A. phagocytophilum*, 16 foram reagentes para *T. equi*. Essa relação corrobora os resultados observados por Salvagni et al. (2010) e suporta a possibilidade de co-infecção por esses dois agentes em população de equinos do Brasil. A ausência de associação pode ser justificada pelo pequeno número de animais examinados, fator importante a ser considerado em estudos futuros.

Há uma carência de estudos na literatura que identifiquem fatores associados à infecção por *A. phagocytophilum* em equinos. Segundo Egenvall et al. (2001), a idade, a estação do ano, o acesso a pastagens e títulos para *Borrelia burgdorferi* apresentaram associação com a frequência de equinos positivos para *A. phagocytophilum* através da RIFI. Animais mais velhos, provavelmente têm maior contato com carrapatos infectados com *A. phagocytophilum* comparado aos mais jovens. A associação da estação do ano e do acesso dos equinos a pastagens com a soropositividade para *A. phagocytophilum*, provavelmente pode ser explicado pelos diferentes graus de exposição aos carrapatos vetores (EGENVALL et al., 2001). Esses resultados corroboram, em parte, a tendência de aumento na frequência de equinos soropositivos para *A. phagocytophilum* em função da faixa etária, atividade e infestação por carrapatos, observado no presente estudo.

Os resultados referentes ao eritrograma, proteína plasmática total e fibrinogênio de equinos soropositivos e soronegativos para *A. phagocytophilum* através da RIFI estão apresentados na Tabela 6. Houve diferença ($p < 0,05$) no número de hemácias dos equinos em função da positividade para *A. phagocytophilum*. Equinos soropositivos apresentaram número de hemácias inferior ($p = 0,02$) aos equinos soronegativos, com valores de 6,0 e $6,8 \times 10^3/\mu\text{L}$, respectivamente. No entanto, esses valores permaneceram dentro dos limites de referência (SCHALM'S, 2010). Em relação aos demais parâmetros não houve diferença ($p > 0,05$) nos resultados em função da positividade dos equinos para *A. phagocytophilum*. Mesmo não havendo diferença, tanto o VG quanto a concentração de hemoglobina dos equinos soropositivos apresentou valores médios inferiores aos observados em equinos soronegativos.

Tabela 6. Eritrograma, proteína plasmática total e fibrinogênio de equinos soropositivos para *Anaplasma phagocytophilum* através da reação de imunofluorescência indireta.

Parâmetros	Resultado	N	Média	DP	EP	IC de 95%		Limites de Referência*	Sig.
						Inferior	Superior		
HEM (x10 ⁶ /mm ³)	Negativo	83	6,8 ^a	1,3	0,1	6,5	7,1	6,0 – 11,3	0,02
	Positivo	17	6,0 ^b	1,2	0,3	5,4	6,6		
	Total	100	6,6	1,3	0,1	6,4	6,9		
HB (g/dL)	Negativo	83	10,5 ^a	19,6	0,2	10,1	11,0	10,6 – 18,9	0,20
	Positivo	17	9,9 ^a	19,4	0,5	8,9	10,9		
	Total	100	10,4	19,7	0,2	10,0	10,8		
VG (%)	Negativo	83	29,7 ^a	58,2	0,6	28,4	31,0	34 - 49	0,20
	Positivo	17	27,7 ^a	58,9	14,3	24,7	30,7		
	Total	100	29,3	58,5	0,6	28,2	30,5		
VCM (fm ³)	Negativo	83	44,0 ^a	5,1	0,6	42,9	45,1	38 - 49	0,13
	Positivo	17	46,1 ^a	3,7	0,9	44,2	48,0		
	Total	100	44,4	4,9	0,5	43,4	45,3		
CHCM (g/dL)	Negativo	83	35,7 ^a	1,0	0,1	35,5	35,9	37 - 40	0,92
	Positivo	17	35,7 ^a	0,9	0,2	35,2	36,2		
	Total	100	35,7	1,0	0,1	35,5	35,9		
PLAQ (x10 ³ /mm ³)	Negativo	83	150,1 ^a	55,3	6,1	138,0	162,1	46 – 194	0,68
	Positivo	17	150,9 ^a	30,0	7,3	135,5	166,4		
	Total	100	150,2	51,8	5,2	139,9	160,5		
MPV (fm ³)	Negativo	83	7,4 ^a	67,0	0,7	6,0	8,9	5,6 – 8,3	0,16
	Positivo	17	6,3 ^a	0,4	0,1	6,1	6,5		
	Total	100	7,2	61,1	0,6	6,0	8,4		
PPT (g/dL)	Negativo	83	7,5 ^a	0,6	0,1	7,4	7,7	6,0 – 8,4	0,36
	Positivo	17	7,4 ^a	0,5	0,1	7,1	7,7		
	Total	100	7,5	0,6	0,1	7,4	7,6		
FIB (mg/dL)	Negativo	83	353,0 ^a	167,0	18,3	316,6	389,5	100 - 400	0,82
	Positivo	17	352,9 ^a	132,8	32,2	284,6	421,2		
	Total	100	353,0	161,1	16,1	321,0	385,0		

^aMédias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney (p>0,05). HEM: hemácias; HB: hemoglobina; VG: volume globular; VCM: volume corpuscular médio; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular médio; PLAQ: plaquetas; MPV: volume plaquetário médio; PPT: proteína plasmática total; FIB: fibrinogênio. N: número de equinos; DP: desvio padrão; EP: erro padrão; IC: intervalo de confiança.*(SCHALM'S, 2010).

Os resultados referentes ao leucograma de equinos soropositivos e soronegativos para *A. phagocytophilum* através da RIFI estão apresentados na Tabela 7. Nenhuma diferença foi observada (p>0,05) nos parâmetros do leucograma entre os equinos soropositivos e soronegativos, porém, números inferiores de leucócitos, linfócitos, monócitos e granulócitos foram observados nos equinos soropositivos quando comparado aos soronegativos. Semelhante aos resultados observados no eritrograma, os do leucograma mantiveram dentro dos limites de referência para equinos (SCHALM'S, 2010).

Tabela 7. Leucograma de equinos soropositivos e soronegativos a anticorpos anti-*Anaplasma phagocytophilum* através da reação de imunofluorescência indireta.

Parâmetros	Resultado	N	Média	DP	EP	IC de 95%		Limites de Referência*	Sig.
						Inferior	Superior		
LEUC (x10 ³ /mm ³)	Negativo	83	11,4 ^a	32,9	0,4	10,7	12,1	5,3 - 13,8	0,06
	Positivo	17	10,0 ^a	22,1	0,5	8,8	11,1		
	Total	100	11,2	31,7	0,3	10,5	11,8		
LINF (x10 ³ /mm ³)	Negativo	83	3,2 ^a	18,6	0,2	2,7	3,6	1,1 - 5,7	0,24
	Positivo	17	2,4 ^a	0,8	0,2	2,0	2,8		
	Total	100	3,0	17,5	0,2	2,7	3,4		
MON (x10 ³ /mm ³)	Negativo	83	0,7 ^a	0,4	0,1	0,7	0,8	0,1 - 0,6	0,24
	Positivo	17	0,6 ^a	0,3	0,1	0,5	0,8		
	Total	100	0,7	0,4	0,0	0,6	0,8		
GRAN (x10 ³ /mm ³)	Negativo	83	7,5 ^a	18,6	0,2	7,1	7,9	2,7 - 9,7	0,15
	Positivo	17	6,9 ^a	16,1	0,4	6,1	7,8		
	Total	100	7,4	18,3	0,2	7,1	7,8		

^aMédias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney (p>0,05). LEUC: leucócitos; LINF: linfócitos; MON: monócitos; GRAN: granulócitos. N: número de equinos; DP: desvio padrão; EP: erro padrão; IC: intervalo de confiança. *(SCHALM'S, 2010).

O quadro hematológico normal observado no presente estudo, independente da sorologia positiva dos equinos, justifica a ausência de sinais clínicos de AGE nesses animais. A ausência de alterações hematológicas significativas já era uma situação esperada de ser observada, uma vez que são evidentes durante o período de manifestação clínica da doença, o qual é caracterizado por febre (GRIBBLE, 1969; MADIGAN; GRIBBLE, 1987; REUBEL et al., 1998; FRANZÉN et al., 2005). Esses estudos relatam anemia que pode variar de moderada a grave, icterícia, leucopenia devido neutropenia e linfocitopenia além de trombocitopenia bem definida.

Outros fatores, além da infecção por *A. phagocytophilum*, podem interferir nos parâmetros hematológicos de equinos. É importante considerar o perfil hematológico da população de equinos estudada, uma vez que, valores abaixo dos limites de referência, principalmente para o número de hemácias, concentração de hemoglobina e VG, tem sido relatado na literatura (CUNHA et al., 2008) e em exames regulares realizados no laboratório de Hemoparasitos e Vetores da UFRRJ. Além disso, o intenso parasitismo por *A. cajennense* e *D. (A.) nitens* constatado no presente estudo, o manejo sanitário e zootécnico deficiente nas propriedades selecionadas e a provável infecção por helmintos (LABRUNA et al., 2002; CUNHA et al., 2008) e hemoparasitos como *Babesia caballi* e *T. equi* podem influenciar negativamente os parâmetros hematológicos.

4.2 Evidência molecular de *Anaplasma phagocytophilum* em equinos na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro

Das 350 amostras avaliadas pela PCR em tempo real 0,86% (n=3) apresentaram amplificação específica para o gene *msp2*, conforme apresentado na Figura 9. Os valores observados do C_T das amostras positivas foram 33,82; 34,75 e 36,71 ciclos.

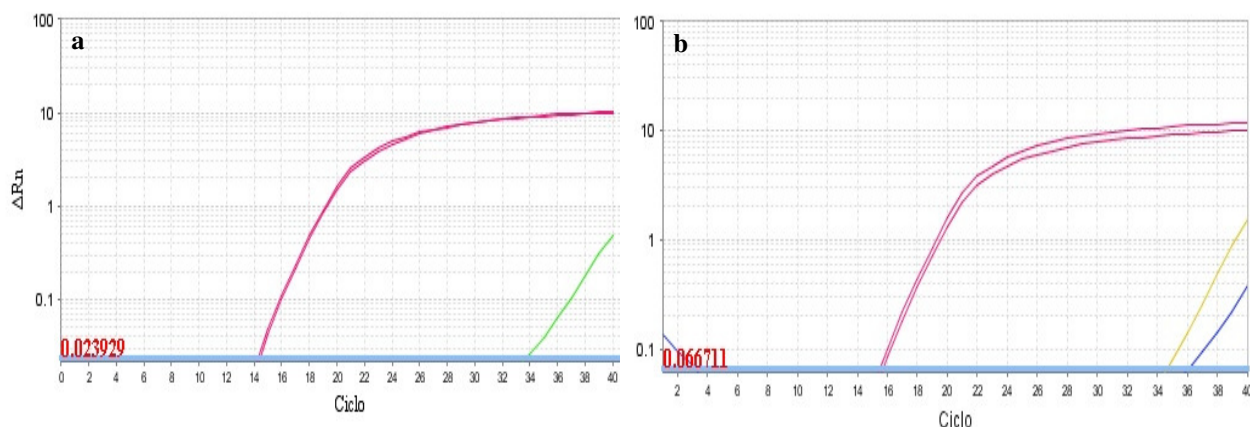


Figura 9. Curva de amplificação da PCR em tempo real para o gene *msp2* de *Anaplasma phagocytophilum*. Controles positivo (linha vermelha) com C_T médio de 14,55 e amostra de equino positiva (linha verde) com C_T de 33,82 (a). Controles positivo (linha vermelha) com C_T médio de 15,92 e amostras de equino positivas (linha amarela e azul) com C_T de 34,75 e 36,17 (b).

As temperaturas de dissociação observadas para as amostras consideradas positivas e para os controles positivo estão apresentadas na Figura 10. As amostras consideradas positivas apresentaram temperatura de dissociação de 78,52°C; 78,06°C e 79,11°C, similares às observadas para os controles positivo, com 78,67°C e 78,22°C.

Os fragmentos amplificados nas três amostras consideradas positivas na PCR em tempo real apresentaram bandas de amplificação em gel de agarose com tamanho esperado de 122pb do gene *msp2* (Figura 11). Uma das amostras apresentou C_T acima de 35, limite máximo para considerar, em conjunto com a temperatura de dissociação, a amostra como positiva (SANTOS et al., 2011 - **artigo aceito**). No entanto, devido essa amostra ter apresentado banda de amplificação em gel de agarose com tamanho esperado e a sensibilidade da PCR em tempo real utilizando o sistema SYBR Green ser no mínimo de três cópias de plasmídeo contendo o gene *msp2* de *A. phagocytophilum* (SANTOS et al., 2011 - **artigo aceito**), ela foi considerada positiva. O C_T elevado pode representar situação de baixa bacteremia, o que pode justificar a ausência de sinais clínicos sugestivos de AGE nos três equinos positivos na PCR.

Das três amostras de equinos positivas na PCR em tempo real, duas eram de animais criados no município de Seropédica, os quais também apresentaram anticorpos anti-*A. phagocytophilum* quando avaliados pela RIFI. A terceira amostra era procedente do município de Mangaratiba e não foi submetida à RIFI para *A. phagocytophilum*.

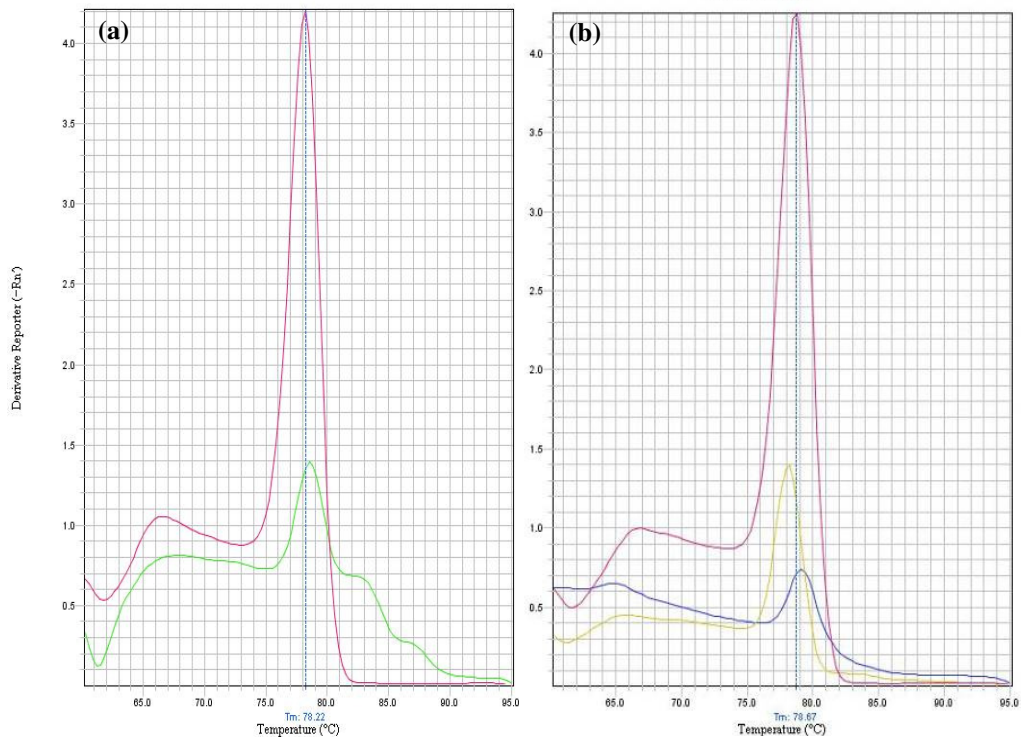


Figura 10. Curvas de dissociação dos produtos amplificados na PCR em tempo real para o gene *msp2* de *Anaplasma phagocytophilum*. Controle positivo (linha vermelha) com T_m de 78,22 °C e amostras de equino positivas (linha amarela e azul) com T_m de 78,06 °C e 79,11 °C (a). Controle positivo (linha vermelha) com T_m de 78,67 °C e amostra de equino positiva (linha verde) com T_m de 78,52°C (b).

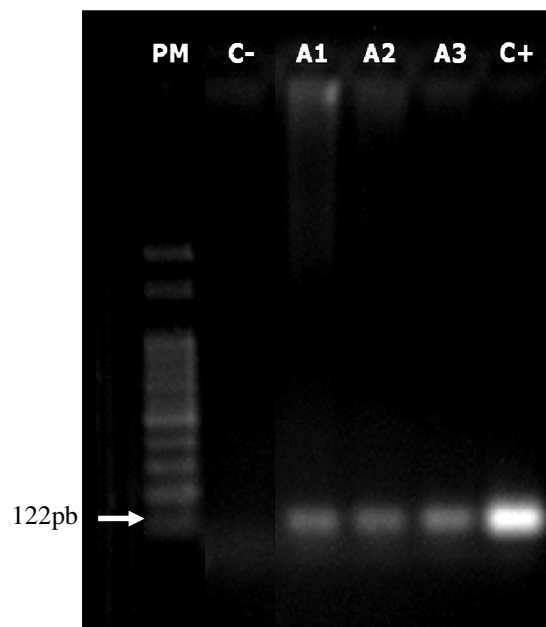


Figura 11. Gel de agarose (2%) com produtos da amplificação do fragmento de 122pb do gene *msp2* de *Anaplasma phagocytophilum*. PM: Peso molecular de 100pb; C-: Controle negativo; A1, A2 e A3: Amostras de equino positivas na PCR em tempo real; C+: Controle positivo.

Outros estudos já foram realizados no Brasil na tentativa de detectar a infecção de cães por *A. phagocytophilum*. No entanto, nenhuma evidência molecular de infecção por esse agente foi observada em cães com sinais clínicos e microscópicos sugestivos de erliquiose (DE PAIVA DINIZ et al., 2007; DAGNONE et al., 2009). Recentemente, a infecção por *A. phagocytophilum* em cães foi detectada, pela primeira vez, na mesma região do presente estudo (SANTOS et al. 2011 - **artigo aceito**). Nesse estudo a sequência obtida (Acesso nº HQ670750) revelou 100% de identidade para o gene *msp2* com as cepas de *A. phagocytophilum* isoladas de *I. pacificus* no Japão (Acesso nº FJ600612.1), de cães e ovinos da Suécia (Acesso nº DQ519566 e DQ519565), de cervídeo na Polônia (ACESSO nº AY763480) e de humanos nos EUA (Acesso nº P000235).

No presente estudo, mesmo que o número de animais examinados pela RIFI (n=100) tenha sido menor que os examinados pela PCR em tempo real (n=350), observou-se maior frequência de animais soropositivos quando comparado aos positivos na PCR em tempo real. Essa observação se justifica, uma vez que a condição de portador em equinos infectados com *A. phagocytophilum* é incomum (NYINDO et al., 1978). Informações na literatura demonstram que o DNA de *A. phagocytophilum* em equinos pode ser detectado durante um período de aproximadamente 21 dias (MADIGAN, 1993; GREIG et al., 1996; DUMLER; WALKER, 2001), 38 dias (CHANG et al., 1998) e por até quatro meses (FRANZÉN et al., 2009) após a infecção experimental. Além desse curto período de bacteremia, anticorpos da classe IgG anti-*A. phagocytophilum* persistem por aproximadamente 300 dias após a infecção experimental (NYINDO et al., 1978) e por até dois anos em infecções naturais (SELLON; LONG, 2007). Segundo Drazenovich et al. (2006), a soroprevalência em uma região normalmente excede a prevalência baseada na PCR, a menos que esteja ocorrendo surto da doença. Isso não se aplica para região estudada, uma vez que nenhum equino examinado apresentou sinais clínicos sugestivos de AGE.

5 CONCLUSÕES

No município de Seropédica, a idade apresenta associação com a soropositividade dos equinos para. A frequência de equinos soropositivos para *A. phagocytophilum* é inferior em animais com idade inferior a 12 meses.

Na microrregião de Itaguaí o sexo, a atividade dos equinos, a infestação por carrapatos e a soropositividade dos equinos para *T. equi* não apresentam associação com a soropositividade para *A. phagocytophilum*.

A presença de anticorpos anti-*A. phagocytophilum* e a evidência molecular da infecção por esse agente em equinos do município de Seropédica, no estado do Rio de Janeiro, sugerem a circulação de *A. phagocytophilum* nessa região.

Equinos soropositivos para *A. phagocytophilum* não apresentam alterações significantes nos parâmetros hematológicos, no entanto, AGE deve ser incluída no diagnóstico diferencial de equinos do Brasil com alterações hematológicas sugestivas de infecção por agentes transmitidos por carrapatos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUERO-ROSENFELD, M. E.; KALANTARPOUR, F.; BALUCH, M.; HOROWITZ, H. W.; MCKENNA, D. F.; RAFFALLI, J. T.; HSIEH, T.-Z.; WU, J.; DUMLER J. S.; WORMSER, G.P. Serology of culture-confirmed cases of human granulocytic ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.2, p.635–638, 2000.
- AGUERO-ROSENFELD, M.F.; HOROWITZ, H.W.; WORMSER, G.P.; MCKENNA, D.F.; NOWAKOWSKI, J.; MUNOZ, J.; DUMLER, J.S. Human granulocytic ehrlichiosis: a case series from a medical center in New York State. **Annals of Internal Medicine**, v.125, n.11, p.904–908, 1996.
- ALBERDI, M.P.; WALKER, A.R.; PAXTON, E.A.; SUMPTION, K.J. Natural prevalence of infection with *Ehrlichia (Cytoecetes) phagocytophila* of *Ixodes ricinus* ticks in Scotland. **Veterinary Parasitology**, v.78, n.3, p.203–213, 1998.
- ALBERDI, M.P.; WALKER, A.R.; URQUHART, K.A. Field evidence that roe deer (*Caprioles carpeolus*) are natural host for *Ehrlichia phagocytophila*. **Epidemiology and Infection**, v.124, n.2, p.315–323, 2000.
- ALBERTI, A.; ADDIS, M.F.; SPARAGANO, O.; ZOBBA, R.; CHESSA, B.; CUBEDDU, T.; PARPAGLIA, M.L.P.; ARDU, M.; PITTAU, M. *Anaplasma phagocytophilum*, Sardinia, Italy. **Emerging Infectious Diseases**, v.11, n.8, p.1322–1323, 2005.
- ALEKSEEV, A.; DUBININA, H.; SCHOULS, L. First detection of *Ehrlichia* infected ticks among the primary vectors of the tick-borne encephalitis and borreliosis in the Russian Baltic region. **Bulletin of the Scandinavian Society for Parasitology**, v.8, p.88–91, 1998.
- ALEKSEEV, A.N.; DUBININA, H.V.; VAN DE POL, I.; SCHOULS, L.M. Identification of Ehrlichia and *Borrelia burgdorferi* species in *Ixodes* ticks in the Baltic regions of Russia. **Journal Clinical Microbiology**, v.39, n.6, p.2237–2242, 2001.
- AMUSATEGUI, I.; SAINZ, A.; TESOURO, M.A. Serological evaluation of *Anaplasma phagocytophilum* infection in livestock in northwestern Spain. **Annals of the New York Academy of Science**, v.1078, n.1, p.487-490, 2006.
- ARTURSSON, K.; GUNNARSSON, A.; WIKSTROM, U.B.; ENGVALL, E.O. A serological and clinical follow-up in horses with confirmed equine granulocytic ehrlichiosis. **Equine Veterinary Journal**, v.31, n.6, p.473–477, 1999.
- BAKKEN, J.S.; DUMLER, J.S. Human granulocytic ehrlichiosis. **Clinical Infectious Diseases**, v.31, n.2, p.554–560, 2000.
- BAKKEN, J.S.; DUMLER, J.S.; CHEN, S.M.; ECKMAN, M.R.; VAN ETTA, L.L.; WALKER, D.H. Human granulocytic ehrlichiosis in the upper Midwest. A new species emerging? **Journal of American Medical Association**, v.272, n.3, p.212–218, 1994.
- BAKKEN, J.S.; KREUTH, J.; WILSON-NORSKOG, C.; TILDEN, R.L.; ASANOVITCH, K.; DUMLER, J.S. Clinical and laboratory characteristics of human granulocytic ehrlichiosis. **Journal of the American Medical Association**, v.275, n.3, p.199–205, 1996.

- BARLOUGH, J.; MADIGAN, J.; DEROCK, E.; DUMLER, J.S.; BAKKEN, J.S. Protection against *Ehrlichia equi* is conferred by prior infection with the human granulocytotropic ehrlichia (HGE agent). **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.12, p.3333–3334, 1995.
- BARLOUGH, J.; MADIGAN, J.; KRAMER, V.; CLOVER, J.; HUI, L.; WEBB, J.; VREDEVOE, L. *Ehrlichia phagocytophila* genogroup rickettsiae in ixodid ticks from California collected in 1995 and 1996. **Journal Clinical Microbiology**, v.35, n.8, p.2018–2021, 1997.
- BARLOUGH, J.E.; MADIGAN, J.E.; DEROCK, E.; BIGORNIA, L. Nested polymerase chain reaction for detection of *Ehrlichia equi* genomic DNA in horses and ticks (*Ixodes pacificus*). **Veterinary Parasitology**, v.63, n.3-4, p.319-329, 1996.
- BARROS-BATTESTI, D.M.; ARZUA, M.; BECHARA, G.H. 2006. **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies**. ed. VOX/ICTTD-3/BUTANTAN, 1th ed., pp. 223. São Paulo, SP.
- BELONGIA, E.A.; REED, K.D.; MITCHELL, P.D.; KOLBERT, C.P.; PERSING, D.H.; GILL, J.S.; KAZMIERCZAK, J.J. Prevalence of granulocytic Ehrlichia among white-tailed deer in Wisconsin. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.6, p.1465– 1468, 1997.
- BERMANN, F.; DAVOUST, B.; FOURNIER, P.E.; BRISOU-LAPOINTE, A.V.; BROUQUI, P. *Ehrlichia equi* (*Anaplasma phagocytophila*) infection in an adult horse in France. **Veterinary Record**, v.150, n.25, p.787–788, 2002.
- BJOERSDORFF, A.; BERGSTROM, S.; MASSUNG, R.F.; HAEMIG, P.D.; OLSEN, B. Ehrlichia-infected ticks on migrating birds. **Emerging Infectious Diseases**, v.7, n.5, p.877–879, 2001.
- BJÖERSDORFF, A.; BROUQUI, P.; ELIASSON, I.; MASSUNG, R.F.; WITTESJO, B.; BERGLUND, J. Serological evidence of Ehrlichia infection in Swedish Lyme borreliosis patients. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v.31, n.1, p.51–55. 1999.
- BOOL, P.H.; REINDERS, J.S. Tick-borne fever in cattle in the Netherlands. **Tijdschr Diergeneesk**, v.89, n.1, p.1519–1527, 1964.
- BOWN, K.J.; BENNETT, M.; BEGON, M.; BIRTLES, R.J.; BURTHE, S.; LAMBIN, X.; TELFER, S.; WOLDEHIWET, Z.; OGDEN, N.H. Sympatric *Ixodes trianguliceps* and *Ixodes ricinus* ticks feeding on field voles (*Microtus agrestis*): potential for increased risk of *Anaplasma phagocytophilum* in the United Kingdom. **Vector-Borne Zoonotic Diseases**, v.6, n.4, p.404–410, 2006.
- BOWN, K.J.; BENNETT, M.; BEGON, M.; WOLDEHIWET, Z.; OGDEN, N.H. Seasonal dynamics of *Anaplasma* (formerly *Ehrlichia*) *phagocytophila* in a rodent–tick (*Ixodes trianguliceps*) system in the UK. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, n.1, p.63–70, 2003.
- CAO, W.C.; ZHAO, Q.M.; ZHANG, P.H.; DUMLER, J.S.; ZHANG, X.T.; FANG, L.Q.; YANG, H. Granulocytic Ehrlichiae in *Ixodes persulcatus* ticks from an area in China where Lyme disease is endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.11, p.4208–4210, 2000.
- CHANG, Y.F.; NOVOSEL, V.; DUBOVI, E.; WONG, S.J.; CHU, F.K.; CHANG, C.F.; DEL PIERO, F.; SHIN, S.; LEIN, D.H. Experimental infection of human granulocytic ehrlichiosis agent in horses. **Veterinary Parasitology**, v.78, n.2, p.137–145, 1998.

- CHEN, S.M.; DUMLER, J.S.; BAKKEN, J.S.; WALKER, D.H. Identification of a granulocytotropic Ehrlichia species as the etiologic agent of human disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.3, p.589–595, 1994.
- CINES, D.B.; POLLAK, E.S.; BUCK, C.A.; LOSCALZO, J.; ZIMMERMAN, G.A.; MCEVER, R.P.; POBER, J.S.; WICK, T.M.; KONKLE, B.A.; SCHWARTZ, B.S.; BARNATHAN, E.S.; MCCRAE, K.R.; HUG, B.A.; SCHMIDT, A.M.; STERN, D.M. Endothelial cells in physiology and the pathophysiology of vascular disorders. **Blood**, v.91, n.10, p.3527–3561, 1998.
- COLES, E.H. **Patologia Clínica Veterinária**. 3ª ed., Manole, São Paulo, 1984, 566p.
- COLLINS, J.D.; HANNAN, J.; FERGUSON, A.R.; WILSON, J.O. Tick-borne fever in Ireland. **Irish Veterinary Journal**, v.24, n.1, p.162–164, 1970.
- CUNHA, A.P.; BELLO, A.C.P.P.; LEITE, R.C.; MELO, M.M.; BRAZ, G.F.; RIBEIRO, A.C.C.L.; OLIVEIRA, P.R. Avaliação de parâmetros clínicos e hematológicos de equinos submetidos a um programa de controle estratégico de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.1, p.113–120, 2008.
- DAGNONE, A.S.; SOUZA, A.I.; ANDRÉ, M.R.; MACHADO, R.Z. Molecular diagnosis of Anaplasmataceae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, n.4, p.20–25, 2009.
- DANIELS, T.J.; BATTALY, G.R.; LIVERIS, D.; FALCO, R.C.; SCHWART, I. Avian reservoirs of the agent of human granulocytic ehrlichiosis. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.12, p.1524–1525, 2002.
- DE LA FUENTE, J.; MASSUNG, R.F.; WONG, S.J.; CHU, F.K.; LUTZ, H.; MELI, M.; VON LOEWENICH, F.D.; GRZESZCZUK, A.; TORINA, A.; CARACAPPA, S.; MANGOLD, A.J.; NARANJO, V.; STUEN, S.; KOCAN, K.M. Sequence analysis of the *msp4* gene in *Anaplasma phagocytophilum* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.3, p.1309–1317, 2005.
- DE PAIVA DINIZ, PP.; SCHWARTZ, D.S.; DE MORAIS, H.S.; BREITSCHWERDT, E.B. Surveillance for zoonotic vector-borne infections using sick dogs from southeastern Brazil. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v.7, n.4, p.689–697, 2007.
- DENATALE, C.E.; BURKOT, T.R.; SCHNEIDER, B.S.; ZEIDNER, N.S. Novel potential reservoirs for *Borrelia* sp. and the agent of human granulocytic ehrlichiosis in Colorado. **Journal of Wildlife Diseases**, v.38, n.2, p.478–482, 2002.
- DIAS, E.; MARTINS, A.V. Spotted fever in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine**, v.19, n.1, p.103–108, 1939.
- DRAZENOVICH, N.; FOLEY, J.; BROWN, R.N. Use of Real-Time Quantitative PCR Targeting the *msp2* protein gene to identify cryptic *Anaplasma phagocytophilum* infections in wildlife and domestic animals. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.6, n.1, p.83–90, 2006.
- DREHER, U.M.; DE LA FUENTE, J.; HOFMANN-LEHMANN, R.; MELI, M.L.; PUSTERLA, N.; KOCAN, K.M.; WOLDEHIWET, Z.; BRAUN, U.; REGULA, G.; STAERK K.D.C.; LUTZ, H. Serologic Cross-Reactivity between *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.12, n.10, p.1177–1183, 2005.

- DUGAN, V.G.; YABSLEY, M.J.; TATE, C.M.; MEAD, D.G.; MUNDERLOH, U.G.; HERRON, M.J.; STALLKNECHT, D.E.; LITTLE, S.E.; DAVIDSON, W.R. Evaluation of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) as natural sentinels for *Anaplasma phagocytophilum*. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v.6, n.2, p.192–207, 2006.
- DUMLER, J. S.; ASANOVICH, K. M.; BAKKEN, J.S.; RICHTER, P.; KIMSEY, R.; MADIGAN, J.E. Serologic cross-reactions among *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila*, and human granulocytic ehrlichia. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.5, p.1098–1103, 1995.
- DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.J.; DASCH, G.A.; PALMER, G.H.; RAY, S.C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F.R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales; unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and BHGE agent as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, n.6, p.2145–2165, 2001.
- DUMLER, J.S.; WALKER, D.H. Tick-borne ehrlichiosis. **Lancet Infectious Diseases**, v.4, n.1, p.21–28, 2001.
- EGENVALL, A.; FRANZEN, P.; GUNNARSSON, A.; ENGVALL, E.O.; VAGSHOLM, I.; WIKSTROM, U.B.; ARTURSSON, K. Cross-sectional study of the seroprevalence to *Borrelia burgdorferi sensu lato* and granulocytic *Ehrlichia* spp. and demographic, clinical and tick-exposure factors in Swedish horses. **Preventive Veterinary Medicine**, v.49, n.3-4, p.191–208, 2001.
- EGENVALL, A.; LILLIEHÖÖK, I.; BJÖERSDORFF, A.; ENGVALL, E.O.; KARLSTAM, E.; ARTURSSON, K.; HELDTANDER, M.; GUNNARSSON, A. Detection of granulocytic *Ehrlichia* species DNA by PCR in persistently infected dogs. **Veterinary Record**, v.146, n.7, p.186–190, 2000.
- FACCINI, J.L.H.; PRATA, M.C.A.; DAEMON, E.; BARROS-BATTESTI, D.M. Características biológicas da fase não parasitária do *Ixodes amarali* (Acari: Ixodidae) em gambá (*Didelphis* sp.) no Estado do Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.3, p.267-270, 1999.
- FOGGIE, A. Studies on the infectious agent of tick-borne fever in sheep. **Journal of Pathology and Bacteriology**, v.63, n.1, p.1–15, 1951.
- FOGGIE, A. Studies on tick pyaemia and tick-borne fever. **Symposia of the Zoological Society of London**, v.6, p.51–58, 1962.
- FOGGIE, A.; ALLISON, C.J. A note on the occurrence of tick-borne fever in cattle in Scotland with comparative studies of bovine and ovine strains of the organism. **Veterinary Record**, v.72, n.1, p.767–770, 1960.
- FOLEY, J.E.; FOLEY, P.; BROWN, R.N.; LANE, R.S.; DUMLER, J.S.; MADIGAN, J.E. Ecology of granulocytic ehrlichiosis and Lyme disease in the western United States. **Journal of Vector Ecology**, v.29, n.1, p.41–50, 2004.
- FOLEY, J.E.; KRAMER, V.L.; WEBER, D. Experimental ehrlichiosis in dusky footed woodrats (*Neotoma fuscipes*). **Journal of Wildlife Diseases**, v.38, n.1, p.194–198, 2002.

- FOLEY, J.E.; NIETO, N.C.; ADJEMIAN, J.; DABRITZ, H.; BROWN, R.N. Anaplasma phagocytophilum Infection in Small Mammal Hosts of Ixodes Ticks, Western United States. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, n.7, p. 1147-1150, 2008.
- FONSECA, F. Inquérito sobre a fauna acarológica de parasitas no nordeste do Brasil. **Memorial do Instituto Butantan**, v.28, n.1, p.99-186, 1957.
- FOSTER, W.N.M.; GREIG, J.C. Isolation of tick-borne fever from feral goats in New Galloway. **Veterinary Record**, v.85, n.1, p.585-586, 1969.
- FRANZÉN, P.; ASPAN, A.; EGENVALL, A.; GUNNARSSON, A.; ABERG, L.; PRINGLE, J. Acute clinical, hematologic, serologic, and polymerase chain reaction findings in horses experimentally infected with a European strain of *Anaplasma phagocytophilum*. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.19, n.2, p.232-239, 2005.
- FRANZÉN, P.; ASPAN, A.; EGENVALL, A.; GUNNARSSON, A.; KARLSTAM, E.; PRINGLE, J. Molecular evidence for persistence of *Anaplasma phagocytophilum* in the absence of clinical abnormalities in horses after recovery from de acute experimental infection. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.23, n.3, p.636-642, 2009.
- FRENCH, D.M.; BROWN, W.C.; PALMER, G.H. Emergence of *Anaplasma marginale* antigenic variants during persistent rickettsemia. **Infection and Immunity**, v.67,n.11, p.5834-5840, 1999.
- GOODMAN, J.L.; NELSON, C.; VITALE, B.; MADIGAN, J.E.; DUMLER, J.S.; KURTTI, T.J.; MUNDERLOH, U.G. Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis. **New England Journal of Medicine**, v.334, n.4, p.209-215, 1996.
- GORDON, W.S.; BROWNLEE, A.; WILSON, D.R. Studies on louping ill, tick-borne fever and scrapie. In: PROCEEDINGS OF THE THIRD INTERNATIONAL CONGRESS OF MICROBIOLOGY, New York, p.362-363, 1940.
- GRAY, D.; WEBSTER, K.; BERRY, J.E. Evidence of louping ill and tick-borne fever in goats. **Veterinary Record**, v.122, n.3, p.66, 1988.
- GREIG, B.; ASANOVICH, K.M.; ARMSTRONG, P.J. Geographic, clinical, serologic, and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.1, p.44-48, 1996
- GRIBBLE, D.H. Equine ehrlichiosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.155, n.1, p.462-469, 1969.
- GUEDES, E.; LEITE, R.C.; PRATA, M.C. A.; PACHECO, R.C.; WALKER, D.H.; LABRUNA, M.B. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, n.8, p.841-845, 2005.
- GUY, E.S.; TASKER, S.; JOYNSON, D.H. Detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis (HE) in UK ticks using polymerase chain reaction. **Epidemiology and Infection**, v.121, n.3, p.681-683, 1998.

- HANSEN, M.G.B.; CHRISTOFFERSEN, M.; THUESEN, L.R.; PETERSEN, M.R.; BOJESEN, A.M. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Anaplasma phagocytophilum* in Danish horses. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.52, n.3, p.1-6, 2010.
- HARDALO, C.; QUAGLIARELLO, V.; DUMLER, J.S. Human granulocytic ehrlichiosis in Connecticut: report of a fatal case. **Clinical Infectious Diseases**, v.21, n.4, p.910–914, 1995.
- HEIMER, R.; VAN ANDEL, A.; WORMSER, G.P.; WILSON, M.L. Propagation of granulocytic *Ehrlichia* spp. from human and equine sources in HL-60 cells induced to differentiate into functional granulocytes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.4, p.923–927, 1997.
- HINAIDY, H.K. Zwei neue infektiöse Blutkrankheiten des Rindes in Osterreich. **Wiener Tierärztliche Monatsschrift**, v.60, n.1, p.364–366, 1973.
- HUDSON, J.R. The recognition of tick-borne fever as a disease of cattle. **British Veterinary Journal**, v.106, n.1, p.3–17, 1950.
- JENKINS, A.; HANDELAND, K.; STUEN, S.; SCHOULS, L.; VAN DE POL, I.; MEEN, R.; KRISTIANSEN, B.E. Ehrlichiosis in a moose calf in Norway. **Journal of Wildlife Diseases**, v.37, n.1, p.201–203, 2001.
- JONGEJAN, F.; WASSINK, L.A.; THIELEMANS, M.J.C.; PERIE, N.M.; UILENBERG, G. Serotypes in *Cowdria ruminantium* and their relationship with *Ehrlichia phagocytophila* determined by immunofluorescence. **Veterinary Microbiology**, v.21, n.1, p.31–40, 1989.
- JUSTE, R.A.; SCOTT, G.R.; PAXTON, E.A.; GELABERT, J.L. Presence of *Cytoecetes phagocytophila* in an atypical disease of cattle in Spain. **Veterinary Record**, v.124, n.24, p.636, 1989.
- KORBUTIAK, E.; SCHNEIDERS, D.H. First confirmed case of equine ehrlichiosis in Great Britain. **Equine Veterinary Education**, v.6, n.6, p.303–304, 1994.
- LABRUNA, M.B.; KASAI, N.; FERREIRA, F.; FACCINI, J.L.H.; GENNARI, S.M. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.105, n.1, p.65-77, 2002.
- LARSSON, L.-G.; ASPAN, A.; BERGSTRÖM, K. Persistence of *Anaplasma phagocytophilum* in naturally infected Swedish cattle (in Swedish). **Svensk Veterinärtidning**, v.8–9, n.1, p.13–19, 2006.
- LEBLOND, A.; PRADIER, S.; PITEL, P.H.; FORTIER, G.; BOIREAU.; CHADOEUF, J.; SABATIER, P. An epidemiological survey of equine anaplasmosis (*Anaplasma phagocytophilum*) in southern France. **Revue Scientifique et Technique**, v.24, n.3, p.899-908, 2005.
- LEPIDI, H.; BUNNELL, J.E.; MARTIN, M.E.; MADIGAN, J.E.; STUEN, S.; DUMLER, J.S. Comparative pathology and immunohistology associated with clinical illness after *Ehrlichia phagocytophila*-group infections. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.62, n.1, p.29–37, 2000.

- LEVIN, M.L.; FISH, D. Interference between the agents of Lyme disease and human granulocytic ehrlichiosis in a natural reservoir host. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.1, n.2, p.139–148, 2001.
- LEVIN, M.L.; NICHOLSON, W.L.; MASSUNG, R.F.; SUMNER, J.W.; FISH, D. Comparison of the reservoir competence of medium-sized mammals and *Peromyscus leucopus* for *Anaplasma phagocytophilum* in Connecticut. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.2, n.2, p.125–1136, 2002.
- LIZ, J.S.; ANDERES, L.; SUMNER, J.W.; MASSUNG, R.F.; GERN, L.; RUTTI, B.; BROSSARD, M. PCR detection of granulocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks and wild small mammals in western Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.3, p.1002–1007, 2000.
- LIZ, J.S.; SUMNER, J.W.; PFISTER, K.; BROSSARD, M. PCR detection of and serological evidence of granulocytic Ehrlichia; infection in roe deer (*Capreolus capreolus*) and chamois (*Rupicapra rupicapra*). **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.3, p.892–897, 2002.
- MACLEOD, J. Preliminary studies in tick transmission of louping ill. II. A study of the reaction of sheep to tick infestation. **Veterinary Journal**, v.88, n.1, p.276–284, 1932.
- MACLEOD, J. Studies on tick-borne fever of sheep. II. Experiment on transmission and distribution of the disease. **Parasitology**, v.28, n.1, p.320–329, 1936.
- MACLEOD, J. Ticks and disease in domestic stocks in Great Britain. **Symposium of the Zoological Society of London**, v.6, n.1, p.29–50, 1962.
- MACLEOD, J.; GORDON, W.S. Studies on tick-borne fever in sheep. I. Transmission by the tick *Ixodes ricinus* and description of the disease produced. **Parasitology**, v.25, n.1, p.273–283, 1933.
- MADEWELL, B.R.; GRIBBLE, D.H. Infection in two dogs with an agent resembling *Ehrlichia equi*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.180, n.5, p.512–514, 1982.
- MADIGAN, J. E.; RICHTER, P. J.; KIMSEY, R. B.; BARLOUGH, J. E.; BAKKEN, J. S.; DUMLER, J.S. Transmission and passage in horses of the agent of human granulocytic ehrlichiosis. **Journal of Infectious Diseases**, v.172, n.4, p.1141–1144, 1995.
- MADIGAN, J.E.; GRIBBLE, D. Equine ehrlichiosis in northern California: 49 cases (1968–1981). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.190, n.4, p.445–448, 1987.
- MADIGAN, J.E.; HIETALA, S.; CHALMERS, S.; DEROCK, E. Seroepidemiologic survey of antibodies to *Ehrlichia equi* in horses of Northern-California. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.196, n.12, p.1962–1964, 1990.
- MADIGAN, J.E. Equine ehrlichiosis. **Veterinary Clinical North American Equine Practice**, v.9, n.2, p.423–428, 1993.
- MASSUNG, R. F.; SLATER, K.G. Comparison of PCR assays for detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.2, p.717–722, 2003.
- MASSUNG, R.F.; COURTNEY, J.W.; HIRTZAK, S.L.; PITZER, V.E.; SMITH, G.; DRYDEN, R.L. *Anaplasma phagocytophilum* in white-tailed deer. **Emerging Infectious Diseases**, v.11, n.10, p.1604–1606, 2005.

- MASSUNG, R.F.; MAUREL, M.J.; OWEN, J.H.; ALAN, N.; COURTNEY, J.W.; STAFFORD, K.C.; MATHER, T.N. Genetic variants of *Ehrlichia phagocytophila*: Rhode Island and Connecticut. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.5, p.462–472, 2002.
- MASSUNG, R.F.; PRIESTLEY, R.A.; MILLER, N.J.; MATHER, T.N.; LEVIN, M.L. Inability of a variant strain of *Anaplasma phagocytophilum* to infect mice. **Journal of Infectious Diseases**, v.188, n.11, p.1757–1763, 2003.
- MASSUNG, R.F.; SLATER, K.; OWENS, J.H.; NICHOLSON, W.L.; MATHER, T.N.; SOLBERG, V.B.; OLSON, J.G. Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.4, p.1090–1095, 1998.
- McDIARMID, A. Modern trends in animal health and husbandry. Some infectious diseases of free-living wild-life. **British Veterinary Journal**, v.121, n.3, p.245–257, 1965.
- MUNDERLOH, U.G.; JAURON, S.D.; FINGERLE, V.; LEITRITZ, L.; HAYES, S.F.; HAUTMAN, J.M.; NELSON, C.M.; HUBERTY, B.W.; KURTTI, T.J.; AHLSTRAND, G.G.; GREIG, B.; MELLENCAMP, M.A.; GOODMAN, J.L. Invasion and intracellular development of the human granulocytic ehrlichiosis agent in tick cell culture. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.8, p.2518–2524, 1999.
- MUNDERLOH, U.G.; LYNCH, M.J.; HERRON, M.J.; PALMER, A.T.; KURTTI, T.; NELSON, R.D.; GOODMAN, J.L. Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum*. **Veterinary Microbiology**, v.101, n.1, p.53–64, 2004.
- MUNDERLOH, U.G.; MADIGAN, J.E.; DUMLER, J.S.; GOODMAN, J.L.; HAYES, S.F.; BARLOUGH, J.E.; NELSON, C.M.; KURTTI, T.J. Isolation of the equine granulocytic ehrlichiosis agent, *Ehrlichia equi*, in tick cell culture. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.3, p.664–670, 1996.
- MUNRO, R.; HUNTER, A.R.; MACKENZIE, G.; MCMARTIN, D.A. Pulmonary lesions in sheep following experimental infection by *Ehrlichia phagocytophila* and *Chlamydia psittaci*. **Journal of Comparative Pathology**, v.92, n.1, p.117–129, 1982.
- NICHOLSON, W.L.; CASTRO, M.B.; KRAMER, V.L.; SUMNER, J.W.; CHILDS, J.E. Dusky-footed wood rats (*Neotoma fuscipes*) as reservoirs of granulocytic ehrlichiae (Rickettsiales: Ehrlichieae) in northern California. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.10, p.3323–3327, 1999.
- NICHOLSON, W.L.; MUIR, J.W.; SUMNER, J.W.; CHILDS, J.E. Serologic evidence of infection with *Ehrlichia* spp in wild rodents (Muridae: Sigmodontinae) in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.3, p.695–700, 1998.
- NYINDO, M.B.A.; RISTIC, M.; LEWIS, G.E.; HUXSOLL, D.L.; STEPHENSON, E.H. Immune responses of ponies to experimental infection with *Ehrlichia equi*. **American Journal of Veterinary Medical Association**, v.180, n.1, p.512–514, 1978.
- OGDEN, N.H.; BOWN, K.; HORROCKS, B.K.; WOLDEHIWET, Z.; BENNETT, M. Granulocytic Ehrlichia infection in ixodid ticks and mammals in woodlands and uplands of the UK. **Medical and Veterinary Entomology**, v.12, n.4, p.423–429, 1998a.

- OGDEN, N.H.; CASEY, A.N.J.; FRENCH, N.P.; BOWN, K.J.; ADAMS, J.D.W.; WOLDEHIWET, Z. Natural *Ehrlichia phagocytophila* transmission coefficients from sheep 'carriers' to *Ixodes ricinus* ticks vary with the numbers of feeding ticks. **Parasitology**, v.124, n.2, p.127–136, 2002a.
- OGDEN, N.H.; CASEY, A.N.J.; FRENCH, N.P.; WOLDEHIWET, Z. A review of studies on the transmission of *Anaplasma phagocytophilum* from sheep: implications for the force of infection in endemic cycles. **Experimental Applied Acarology**, v.28, p.195–202, n.1-4, 2002b.
- OGDEN, N.H.; WOLDEHIWET, Z.; HART, C.A. Granulocytic Ehrlichiosis: an emerging or rediscovered tick-borne disease. **Journal of Medical Microbiology**, v.47, n.6, p.475–482, 1998b.
- OHASHI, N.; INAYOSHI, M.; KITAMURA, K.; KAWAMORI, F.; KAWAGUCHI, D.; NISHIMURA, Y.; NAITOU, H.; HIROI, M.; MASUZAWA, T. *Anaplasma phagocytophilum*-infected ticks, Japan. **Emerging Infectious Diseases**, v.11, n.11, p.1780-1783, 2005.
- OVERAS, J. Tick-borne fever (sjodogg) hos storfe. **Norsk Veterinaertidsskrift**, v.14, n.1, p.631–641, 1962.
- PASSAMONTI, F.; FABRIZIA, V.; KATIA, C.; STEFANO, C.; GIACOMO, C.; LUISA, M.M.; DANIELA, P.;F.; ANDREA, V.S.; MAURO, C. *Anaplasma phagocytophilum* in horses and ticks: A preliminary survey of central Italy. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.33, n.1, p.73-83, 2010.
- PEEL, M.C.; FINLAYSON, B.L.; MCMAHON, T.A. "Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification". **Hydrology and Earth System Sciences**, v.11, n.5, p.1633–1644, 2007.
- PETROVEC, M.; BIDOVEC, A.; AVSIC-ZUPANC, T.; KOREN, S.; SUMNER, J.W.; NOCHOLSON, W.L.; CHILDS, J.E. Infection with *Anaplasma phagocytophila* in cervids from Slovenia: evidence of two genotypic lineages. **Wiener Klinische Wochenschrift**, v.114, n.13-14, p.641–647, 2002.
- PFISTER, K.; ROESTI, A.; BOSS, P.H.; BALSIGER, B. *Ehrlichia phagocytophila* als Erreger des "Weidefiebers im Berner Oberland. **Schweizer Archiv für Tierheilkund**, v.129, n.3, p.343–347, 1987.
- POITOUT, F.M.; SHINOZAKI, J.K.; STOCKWELL, P.J.; SHUKLA, S.K. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.2, p.796–801, 2005.
- POLIN, H.; HUFNAGL, P.; HAUNSCHMID, R.; GRUBER, F.; LADURNER, G. Molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks and wild animals in Austria. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.5, p.2285–2286, 2004.
- POPOV, V.L.; HAN, V.C.; CHEN, S.M.; DUMLER, J.S.; FENG, H.M.; ANDREADIS, T.G.; TESH, R.B.; WALKER, D.H. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. **Journal of Medical Microbiology**, v.47, n.3, p.235–251, 1998.
- PUSTERLA, N.; ANDERSON, R.J.; HOUSE, J.K.; PUSTERLA, J.B.; DEROCK, E.; MADIGAN, J.E. Susceptibility of cattle to infection with *Ehrlichia equi* and the agent of human granulocytic ehrlichiosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.218, n.7, p.1160–1162, 2001.

PUSTERLA, N.; LEUTENEGGER, C.M.; CHAE, J.S.; LUTZ, H.; KIMSEY, R.B.; DUMLER, J.S.; MADIGAN, J.E. Quantitative evaluation of ehrlichial burden in horses after experimental transmission of human granulocytic *Ehrlichia* agent by intravenous inoculation with infected leukocytes and by infected ticks. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.12, p.4042–4044, 1999.

RAIDAL, S.L.; BAILEY, G.D.; LOVE, D.N. Effect of transportation on lower respiratory tract contamination and peripheral blood neutrophils function. **Australian Veterinary Journal**, v.75, n.6, p.433–438, 1997

REUBEL, G.H.; BARLOUGH, J.E.; MADIGAN, J.E. Experimental Transmission of *Ehrlichia equi* to Horses through Naturally Infected Ticks (*Ixodes pacificus*) from Northern California. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.7, p.2131–2134, 1998.

RICHTER, P.J. Jr.; KIMSEY, R.B.; MADIGAN, J.E.; BARLOUGH, J.E.; DUMLER, J.S.; BROOKS, D.L. *Ixodes pacificus* (Acari:Ixodidae) as a vector of *Ehrlichia equi* (Rickettsiales: *Ehrlichiae*). **Journal of Medical Entomology**, v.33, n.1, p.1–5, 1996.

RIKIHISA, Y. The tribe *Ehrlichiae* and ehrlichial diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v.4, n.3, p.286–308, 1991.

RISTIC, M.; HUXSOLL, D.L. Tribe II. Ehrlichieae Philip 1957, 948^{A1}. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. (Eds.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, vol. I. Williams & Wilkins, Baltimore, USA, p.704–711, 1984.

SALVAGNI, C.A.; DAGNONE, A.S.; GOMES, T.S.; MOTA, J.S.; ANDRADE, G.M.; BALDANI, C.D.; MACHADO, R.Z. Serologic evidence of equine granulocytic anaplasmosis in horses from Central West Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.19, n.3, p.135–140, 2010.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2^a ed. Belo Horizonte: Editora, FEPMVZ, 2002. 265 p.

SANTOS, H.A.; PIRES, M.S.; SANTOS, T.M.; FACCINI, J.L.H.; BALDANI, C.D.; THOMÉ, S.M.; SANAVRIA, A.; MASSARD, C.L. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in dogs from Brazil detected by real-time polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.23, n.4, *In Press*, 2011.

SCHALM, O.W.; WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. (eds.) **Veterinary Hematology**, 6th ed. Blackwell Publishing. Iowa, 2010. 1206p.

SELLON, C.D.; LONG, M.T. **Equine Infection Disease**. St. Luis Missouri: Saunders; 2007.

SMITH, A. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. **Journal of Leukocyte Biology**, v.56, n.6, p.672–686, 1994.

STAFFORD, K.C.; MASSUNG, R.F.; MAGNARELLI, L.A.; IJDO, J.W.; ANDERSON, J.F.; Infection with agents of human granulocytic ehrlichiosis, Lyme disease and babesiosis in wild white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) in Connecticut. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.9, p.2887–2892. 1999.

- STANNARD, A.A.; GRIBBLE, D.H.; SMITH, R.S. Equine ehrlichiosis, a disease with similarities to tick-borne fever and bovine petechial fever. **Veterinary Record**, v.84, n.6, p.149–150, 1969.
- STUEN, S. *Anaplasma phagocytophilum* – the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. **Veterinary Research Communications**, v.31, suppl.1, p.79–84, 2007.
- STUEN, S.; ENGVALL, E.O.; VAN DE POL, I.; SCHOULS, L.M. Granulocytic ehrlichiosis in a roe deer calf in Norway. **Journal of Wildlife Diseases**, v.37, p.614–616, 2001.
- STUEN, S.; VAN DE POL, I.; BERGSTROM, K.; SCHOULS, L.M. Identification of *Anaplasma phagocytophila* (formerly *Ehrlichia phagocytophila*) variants in blood from sheep in Norway. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.9, p.3192–3197, 2002.
- SUMNER, J.W.; NICHOLSON, W.L.; MASSUNG, R.F. PCR amplification and comparison of nucleotide sequences from the groESL heat shock operon of Ehrlichia species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.8, p.2087–2092, 1997
- TEGLAS, M.; MATERN, E.; LEIN, S.; FOLEY, P.; MAHAN, S.M.; FOLEY, J. Ticks and tick-borne disease in Guatemalan cattle and horses. **Veterinary Parasitology**, v.131, n.1–2, p.119–127, 2005.
- TEGLAS, M.B.; FOLEY, J. Differences in the transmissibility of two *Anaplasma phagocytophilum* strains by the North American tick vector species, *Ixodes pacificus* and *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Experimental Applied Acarology**, v.38, n.1, p.47–58, 2006.
- TELFORD, S.; DAWSON, J.; KATAVOLOS, P.; WARNER, C.; KOLBERT, C.; PERSING, D. Perpetuation of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer tick-rodent cycle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.93, n.12 p.6209–6214, 1996.
- TUOMI, J. Experimental studies on bovine tick-borne fever. 1. Clinical and haematological data, some properties of the causative agent, and homologous immunity. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.** v.70, n.3, p.429–445, 1967a.
- TUOMI, J. Experimental studies on bovine tick-borne fever. 3. Immunological strain differences. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica**, v.71, n.1, p.89–100, 1967c.
- TUOMI, J.; VON BONSDORFF, C.H. Electron microscopy of tick-borne fever agent in bovine and ovine phagocytizing leukocytes. **Journal of Bacteriology**, v.92, n.5, p.1478–1492, 1966.
- TYZZER, E.E. *Cytoecetes microti*, N.G.H. Sp., a parasite developing in granulocytes and infective for small rodents. **Parasitology**, v.30, n.1, p.242–257, 1938.
- VAN ANDEL, A.E.; MAGNARELLI, L.A.; HEIMER, R.; WILSON, M.L. Development and duration of antibody response against *Ehrlichia equi* in horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.212, n.12, p.1910–1914, 1998.
- VON STEDINGK, L.V.; GURTELSCHMIDT, M.; HANSON, H.S.; GISTAFSON, R.; DOTEVAKK, L.; ENGVALL, E.O.; GRANSTROM, M. The human granulocytic ehrlichiosis agent in Swedish ticks. **Clinical Microbiology and Infection**, v.3, n.5, p.573–574, 1997.

- VREDEVOE, L.K.; RICHTER Jr, P.J.; MADIGAN, J.E.; KIMSEY, R.B. Association of *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) with the spatial and temporal distribution of equine granulocytic ehrlichiosis in California. **Journal of Medical Entomology**, v.36, n.5, p.551–561, 1999.
- WALKER DH.; DUMLER JS. Emergence of the ehrlichiosis as human health problems. **Emerging Infectious and Diseases**, v.2, n.1, p.1–16, 1996.
- WALKER DH.; DUMLER JS. Human monocytic and granulocytic ehrlichioses. Discovery and diagnosis of emerging tickborne infections and the critical role of the pathologist. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v.121, n.8, p.785–791, 1997.
- WEISS, S.J. Tissue destruction by neutrophils. **New England Journal of Medicine**, v.320, n.6, p. 365–376. 1989.
- WOLDEHIWET, Z. The effects of tick-borne fever on some functions of polymorphonuclear cells of sheep. **Journal of Comparative Pathology**, v.97, n.4, p.481–485, 1987a.
- WOLDEHIWET, Z. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. **Veterinary Parasitology**, v.167, n.2-4, p.108–122, 2010.
- WOLDEHIWET, Z. Tick-borne fever: a review. **Veterinary Research Communications**, v.6, n.3, p.163-175, 1983.
- WOLDEHIWET, Z.; HORROCKS, B.K. Antigenicity of ovine strains of *Anaplasma phagocytophilum* grown in tick cells and ovine granulocytes. **Journal of Comparative Pathology**, v.132, n.4, p.322–328, 2005.
- WOLDEHIWET, Z.; HORROCKS, B.K.; SCAIFE, H.; ROSS, G.; MUNDERLOH, U.G.; BOWN, K.; EDWARDS, S.W.; HART, C.A. Cultivation of an ovine strain of *Ehrlichia phagocytophila* in tick cell culture. **Journal of Comparative Pathology**, v.127, n.2-3, p.142–147, 2002.
- WOLDEHIWET, Z.; SCOTT, G.R. Corticosteroid therapy of tick-borne fever. **Veterinary Record**, v.110, n.7, p.151–152, 1982c.
- WOLDEHIWET, Z.; SCOTT, G.R. Stages in the development of *Cytoecetes phagocytophila*, the causative agent of tick-borne fever in sheep. **Journal of Comparative Pathology**, v.92, n.3, p.469–474, 1982a.
- ZEIDNER, N.S.; BURKOT, T.R.; MASSUNG, R.; NICHOLSON, W.L.; DOLAN, M.C.; RUTHERFORD, J.S.; BIGGERSTAFF, B.J.; MAUPIN, G.O. Transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by *Ixodes spinipalpis* ticks: evidence of an enzootic cycle of dual infection with *Borrelia burgdorferi* in Northern Colorado. **Journal of Infectious Diseases**, v.182, n.2, p.616–619, 2000.
- ZHI, N.; OHASHI, N.; RIKIHISA, Y. Multiple p44 genes encoding major outer membrane proteins are expressed in the human granulocytic ehrlichiosis agent. **Journal of Biological Chemistry**. v.274, n.25, p.17828–17836, 1999.
- ZHI, N.; RIKIHISA, Y.; KIM, H.Y.; WORMSER, G.P.; HOROWITZ, H.W. Comparison of major antigenic proteins of six strains of the human granulocytic ehrlichiosis agent by Western immunoblot analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.10, p.2606–2611, 1997.

2 CONCLUSÕES GERAIS

Equinos do município de Seropédica no Estado do Rio de Janeiro apresentam anticorpos IgG circulantes anti-*T. equi* e anti-*A. phagocytophilum*, o que reforça a possibilidade de co-infecção por esses agentes nessa região e em outras regiões do Brasil.

O sequenciamento das amostras de equinos positivas na PCR em tempo real para *A. phagocytophilum* é importante para a caracterização da cepa que circula no município de Seropédica.

Estudos futuros devem ser realizados com maior número de equinos, a fim de identificar fatores associados à soropositividade para *A. phagocytophilum* em diferentes regiões do Brasil.

ANEXO

A - Questionário epidemiológico.

A - Questionário epidemiológico.



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

QUESTIONÁRIO (AO RESPONSÁVEL PELOS ANIMAIS)

INFORMAÇÕES GERAIS SOBRE A PROPRIEDADE

Data: ____ / ____ / ____

1. Dados gerais:

Nome da propriedade: _____

Município de localização: _____

Coordenadas : _____

2. Área da propriedade

Total: _____ ha ou _____ alqueires

3. Localização dos animais

só em baias só em piquetes só pasto baias e piquetes

baias e pasto baias, piquetes e pasto

4. Possui eqüinos na mesma pastagem de outros animais que não sejam equinos?

Sim Não Quais ? _____

5. Alimentação dos animais

capim feno ração

6. Origem do capim

capineira pasto Outro: _____

7. Cama das baias:

serragem areia e carvão nenhuma outro _____

8. Principal forrageira do pasto:

Capim gordura Capim elefante Pangola Tifton *Coast cross*

Napier Alfafa Capim nativo Outros: _____

9. Características das áreas de pasto

seca poucas áreas alagadas muitas áreas alagadas rios lagos

10. Presença de caramujos nos pastos

sim não qual época do ano _____
 aquático terrestre

11. Os animais apresentam infestações por carrapatos

sim não qual época do ano
Método de controle _____

12. Usa produtos carrapaticidas?

sim não

13. Se usa, com que frequência é ou são usado(s) o(s) produto(s)?

2x/mês 1x/mês 3 a 4 x/ano a cada 6 meses 1x/ano
 outro: _____

14. Tipo de equipamento utilizado para aplicação do carrapaticida?

Banheiros Bomba costal Pour-on Bomba mecânica

15. Quantos animais você banha com 20 litros (volume de uma bomba costal) do carrapaticida diluído? _____

16. Como você escolhe a dose utilizada em cada animal ?

Consulta o rótulo Consulta o Veterinário Consulta de outros criadores
 Consulta os vendedores de lojas de produtos veterinários
 outros _____

17. Qual a procedência da água que é fornecida aos animais?

Empresa de Água Açude Canalização de córregos e riachos
 outra _____

18. Número de divisões do pasto (piquetes): _____

19. Utiliza limpeza de pasto

sim não periodicidade: _____ método: _____

20. Quem cuida do(s) animais?

Veterinário: Agrônomo Zootecnista Técnico agrícola Outro

21. Há quanto tempo existe a criação? _____

22. Percentual de animais nascidos na propriedade _____

23. Abriga animais de outras propriedades?

sim não
Ficam em áreas separadas?
 sim não

24. Qual a época mais propícia ao aparecimento de doenças?

() verão () outono () inverno () primavera

25. Quais doenças já ocorreram na propriedade?

() Babesiose () Cólica () Diarréia () Aparelho Locomotor

() outra _____

26. Quais doenças consideram mais importantes _____

27. Qual o tratamento utilizado para as doenças? _____

28. Quantos animais morreram nos últimos anos? _____

29. Caso tenha morrido, quais foram as causas? _____

INFORMAÇÕES SOBRE O ANIMAL

Propriedade: _____ **Região:** _____ **Data:** ____ / ____ / ____

1. Nome: _____

2. Sexo: () Macho () Fêmea

3. Idade: _____

4. Raça: _____

5. Origem do animal

() nascido na propriedade () externa Procedência _____

6. Há quanto tempo o animal está na propriedade?

() menos de 1 mês () de 1 mês a seis meses () acima de 6 meses

7. Utilização do animal

() Passeio () Reprodução () Esporte () Exposição () outra _____

8. Alguma doença atual?

() sim () não Qual? _____

9. Este animal está tomando algum medicamento ou tomou a pouco tempo ?

() Sim () Não Caso esteja, qual? () Imizol () Antibióticos qual? _____

Outros () quais? _____

25. Este animal apresenta carrapatos?

() sim () não Qual/Quais? _____

Grau de infestação: _____ Espécie: _____

26. Este animal apresenta outros parasitos?

() sim () não Qual/Quais? _____

Grau de infestação: _____

EXAME CLÍNICO:

FC: _____

FR: _____

Motilidade Intestinal: _____

Temperatura: _____

Mucosa oral: _____

Mucosa Ocular: _____

TPC: _____

Tugor Cutâneo: _____