



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL



LEANDRO MACEDO MIRANDA

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *Theileria equi*, *Babesia caballi* e *Anaplasma phagocytophilum* EM EQUINOS NO BIOMA CERRADO, E NUMA ÁREA DE TRANSIÇÃO AMAZÔNIA-CERRADO, MARANHÃO, BRASIL**

São Luís – MA  
2020

LEANDRO MACEDO MIRANDA

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *Theileria equi*, *Babesia caballi* e *Anaplasma phagocytophilum* EM EQUINOS NO BIOMA DE CERRADO, E NUMA ÁREA DE TRANSIÇÃO AMAZÔNIA-CERRADO, MARANHÃO, BRASIL**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção de título de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão – PPGCA / UEMA, Campus da Cidade Universitária Paulo VI.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Borges Costa

São Luís - MA  
2020

Miranda, Leandro Macedo.

Detecção molecular de *Theileria equi*, *Babesia cabali* e *Anaplasma phagocytophilum* em equinos no bioma cerrado, e numa área de transição Amazônia-cerrado, Maranhão, Brasil/ Leandro Macedo Miranda. – São Luís, 2022.

...f

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2022.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Borges Costa.

**Elaborado por Giselle Frazão Tavares - CRB 13/665**

LEANDRO MACEDO MIRANDA

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *Theileria equi*, *Babesia caballi* e *Anaplasma phagocytophilum* EM EQUINOS NO BIOMA CERRADO, E NUMA ÁREA DE TRANSIÇÃO AMAZÔNIA-CERRADO, MARANHÃO, BRASIL**

Dissertação aprovada em 4 de Fevereiro de 2020.

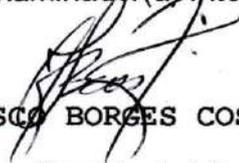
BANCA EXAMINADORA

  
CLÁUDIO LUIS NINA GOMES, UEMA

Examinador(a) Externo ao Programa

  
RITA DE MARIA SEABRA NOGUEIRA, UEMA

Examinador(a) Interno

  
FRANCISCO BORGES COSTA, UEMA  
Presidente(a)

## RESUMO

Piroplasmose equina (PE) é uma enfermidade de equídeos causada por *Theileria equi* e *Babesia caballi*. *Anaplasma phagocytophilum* é o agente etiológico da Anaplasmose granulocítica equina (AGE). Ambas doenças são transmitidas por carrapatos Ixodídeos. *Objetivou-se determinar a ocorrência de PE e AGE no bioma Cerrado e numa área de transição Amazônia-Cerrado, Estado do Maranhão, por reação em cadeia pela polimerase (PCR), esfregaços sanguíneos e identificar as espécies de carrapatos infestando equinos.* Coletou-se 210 amostras de sangue; 33 (15,7%) equinos estavam infestados por carrapato das espécies *Dermacentor nitens*, *Rhipicephalus microplus* e *Amblyomma sculptum*. Nenhum esfregaço sanguíneo apresentou hemopatógenos. A PCR detectou 150 (71,4%) e 33 (15,7%) amostras positivas para *T. equi* e *B. caballi*, respectivamente; 17 (8,1%) e 10 (4,7%) foram positivas para os genes *msp4* e *msp2* de *A. phagocytophilum*, respectivamente. As variáveis bioma e tratamento acaricida apresentaram diferença significativa ( $P < 0.05$ ), estando associadas à infecção por *B. caballi*. *T. equi*, *B. caballi* e *A. phagocytophilum* circulam na Amazônia e Cerrado maranhense, havendo co-infecção entre estes patógenos. A presença de animais positivos para *A. phagocytophilum* torna necessária a inclusão da AGE como diagnóstico diferencial de PE no estado.

Palavras-chave: Anaplasmose; Piroplasmose; carrapatos; cavalo.

## ABSTRACT

Equine Piroplasmosis (EP) is a disease of equids caused by *Theileria equi* and *Babesia caballi*. *Anaplasma phagocytophilum* is the etiological agent of Equine granulocytic anaplasmosis (EGA). Both diseases are transmitted by Ixodid ticks. The study aimed to determine the occurrence of PE and EGA in the Cerrado biome and in a transition Amazon-Cerrado area, Maranhão State, by polymerase chain reaction (PCR), blood smears and identify species of ticks parasitizing horses. Blood samples were collected from 210 equines; 33 (15,7%) were infested with ticks of the species *Dermacentor nitens*, *Rhipicephalus microplus* e *Amblyomma sculptum*. Hemopathogens were not detected in blood smears. PCR detected 150 (71.4%) and 33 (15.7%) positive samples for *T. equi* and *B. caballi*, respectively; 17 (8.1%) e 10 (4.7%) were positive for the *msp4* and *msp2* of *A. phagocytophilum* genes, respectively. The biome and acaricidal treatment variables showed a significant difference ( $P < 0.05$ ), associated with infection by *B. caballi*. *T. equi*, *B. caballi* and *A. phagocytophilum* circulate in the Amazon and Cerrado of Maranhão, with co-infection between these pathogens. The presence of positive animals for *A. phagocytophilum* makes it necessary to include AGE as a differential diagnosis of PE in the state.

Keywords: Anaplasmosis, Piroplasmosis; ticks, horse.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO 1

Figura 1 - Mórula de *A. phagocytophilum* em equino com infecção aguda. (A) Duas mórulas de *A. phagocytophilum* (seta) dentro de um neutrófilo infectado (Wright-Giemsa 1000x). (B) Corpúsculo de inclusão ligado à membrana (seta) dentro de um neutrófilo circulante (fotomicrografia eletrônica de transmissão 37000x). ..... 13

Figura 2 - Fotomicrografia de esfregaços sanguíneos corados com Giemsa. A: dois merozoítos piriformes de *Babesia caballi* no interior de um eritrócito. B: quatro merozoítos de *Theileria equi* no interior de um eritrócito com aspecto de “cruz de malta” ..... 18

### CAPÍTULO 2

Figura 1 - Mapa do estado do Maranhão com os biomas e municípios estudados ..... 35

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

- Tabela 1 Sequências de oligonucleotídeos iniciadores, região gênica e condições de amplificação para ensaios de PCR convencional para *Theileria equi*, *Babesia caballi* e *Anaplasma phagocytophilum*.....37
- Tabela 2 Infestação simples e mista por carrapatos em equinos de áreas do cerrado e de transição (Cerrado/Amazônia) no Maranhão, Nordeste do Brasil..... 38
- Tabela 3 Distribuição das variáveis sexo, idade, bioma, tratamento acaricida e presença de carrapatos em equinos positivos para *T. equi* na área de Cerrado e transição Amazônia-Cerrado, Maranhão, Brasil ..... 39
- Tabela 4 Distribuição das variáveis sexo, idade, bioma, tratamento acaricida e presença de carrapatos em equinos positivos para *B. caballi* na área de Cerrado e transição Amazônia-Cerrado, Maranhão, Brasil..... 40
- Tabela 5 Distribuição das variáveis sexo, idade, bioma, tratamento acaricida e presença de carrapatos em equinos positivos para *A. phagocytophilum* na área de Cerrado e transição Amazônia-Cerrado, Maranhão, Brasil..... 41

## LISTA DE SIGLAS

AGE	Anaplasmosse granulocítica equina
AST	Aspartato aminotransferase
CEEA/UEMA	Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Estadual do Maranhão
c-ELIZA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática competitivo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGH	Erliquiose granulocítica humana
ELISA	Ensaio imunoenzimático indireto
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GGT	Gama glutamil transferase
nPCR	Nested Reação em Cadeia de Polimerase
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
PBMCs	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> , traduzido como Células mononucleares do sangue periférico
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
multiplex PCR	multiplex Reação em Cadeia de Polimerase
PE	Piroplasmose equina
qPCR	Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RNA	Ácido ribonucleico
Rpm	Rotações por minuto

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 .....	10
INTRODUÇÃO .....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1. Anaplasmosse granulocítica Equina .....	12
2.2 Piroplasmose Equina .....	17
REFERÊNCIAS .....	22
CAPÍTULO 2 .....	29
Molecular detection of <i>Theileria equi</i> , <i>Babesia caballi</i> and <i>Anaplasma phagocytophilum</i> in horses in the Cerrado biome, Maranhão, and Amazon-Cerrado transition area, Brazil .....	30
REFERÊNCIAS .....	46

## **CAPÍTULO 1**

### **CONSIDERAÇÕES GERAIS**

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui um dos maiores rebanhos equino do mundo, tendo um efetivo de 5.751.798 milhões de cabeças (IBGE, 2018). Estes animais são utilizados em várias atividades, como lazer, equoterapia, manejo do gado em fazendas, práticas desportivas, entre outras. O Complexo do Agronegócio do Cavalo no Brasil é responsável por criar cerca de 3 milhões de empregos diretos e indiretos, gerando uma renda de R\$ 16,15 bilhões (LIMA; CINTRA, 2016).

Os equinos são passíveis de serem acometidos por enfermidades, as quais podem comprometer seu rendimento em suas atividades e até levar ao óbito, acarretando prejuízos no setor da equideocultura. Dentre as enfermidades, estão as hemoparasitoses, transmitidas para animais por meio de vetores, sejam eles mecânicos ou biológicos (RODRÍGUEZ-VIVAS; COB-GALERA; DOMÍNGUEZ-ALPIZAR, 2000).

Em equinos, Anaplasmosse granulocítica equina (AGE) e Piroplasmose equina (PE) são responsáveis por causar perdas econômicas nas criações, devido a custos com tratamentos e óbitos, trazendo implicações no comércio internacional de animais. Estas doenças podem ocorrer simultaneamente manifestando-se com sintomatologia similar (PARRA, 2009). Apresentam distribuição mundial (SALEEM et al., 2018; SCOLES; UETI, 2015), e sendo transmitidas por carrapatos ixodídeos (ONYICHE et al., 2019; SCOLES et al., 2011; SILAGHI; LIEBISCH; PFISTER, 2011).

Os sinais clínicos não são suficientes para fechar um diagnóstico, uma vez que podem ser semelhantes à de outras doenças, sendo importante levar em conta um conjunto de informações para se estabelecer um diagnóstico definitivo. O reconhecimento de áreas endêmicas confere informações epidemiológicas importantes, apoiando o diagnóstico (FRAZÉN et al., 2005).

Segundo dados do IBGE (2018), o Maranhão possui um rebanho equino estimado em 236.883 cabeças, sendo o segundo maior rebanho equino da região Nordeste. Estudos apontam a ocorrência e circulação dos agentes causadores da PE na ilha de São Luís e AGE e PE na microrregião da Baixada Maranhense (BRAGA et al., 2017; NOGUEIRA et al., 2017;). Ambas as localidades estão situadas no bioma Amazônico o qual, juntamente com o bioma Cerrado, compõem a maior parte do território maranhense. Devido à ampla dimensão territorial do Cerrado maranhense e do expressivo número de equinos no estado, torna-se importante a realizar um estudo epidemiológico neste bioma, a fim de investigar a ocorrência de *Anaplasma*

*phagocytophilum*, o qual é o agente etiológico da AGE, assim como *T. equi* e *B. caballi*, os quais são os agentes etiológicos da PE.

O trabalho teve como objetivo realizar detecção molecular de *T. equi*, *B. caballi* e *A. phagocytophilum* em equinos no bioma Cerrado e numa área de transição Amazônia-Cerrado, no Estado do Maranhão, além de identificar taxonomicamente as espécies de carrapatos que parasitam os equinos.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

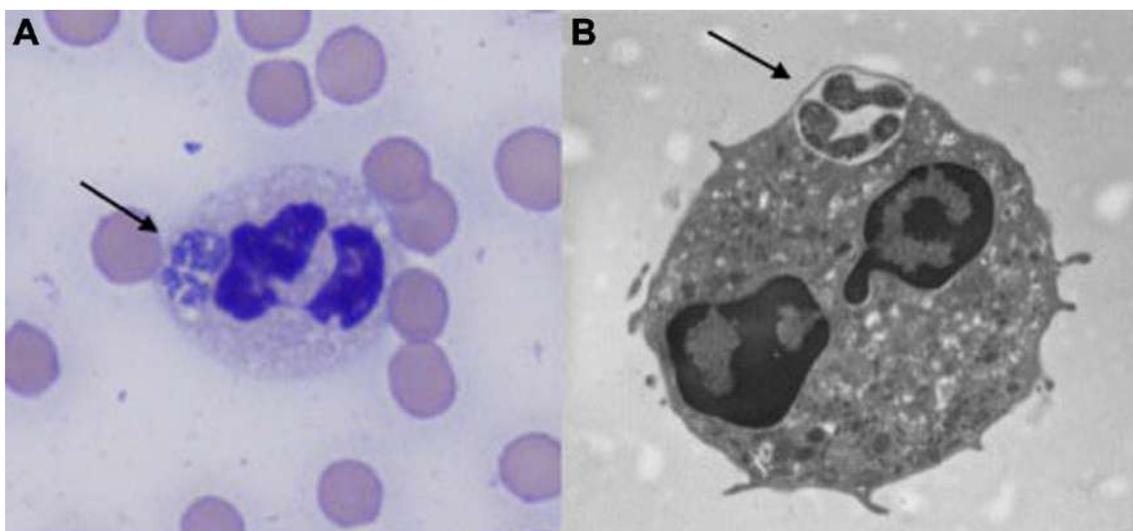
### **2.1 Anaplasmoze granulocítica equina**

AGE é uma doença infecciosa, zoonótica, transmitida por carrapatos, sendo causada pela bactéria *A. phagocytophilum*. O primeiro relato dessa doença ocorreu no ano de 1969 no estado americano da Califórnia (GRIBBLE, 1969). Anteriormente, a doença era denominada Erliquiose granulocítica equina (EGE), sendo o agente denominado *Ehrlichia equi*.

Uma reclassificação foi realizada baseada nas similaridades do RNA (ácido ribonucléico) ribossômico 16S, na qual *E. equi*, *Ehrlichia phagocytophila* (agente da febre dos carrapatos em ruminantes), e o agente da Erliquiose granulocítica humana (EGH) são agora pertencentes a uma única espécie, denominada *A. phagocytophilum* (DUMLER et al., 2001).

*A. phagocytophilum* pertence ao filo Proteobacteria, classe Alphaproteobacteria, Ordem Rickettsiales, Família Anaplasmatacea, gênero *Anaplasma* (DUMLER et al., 2001). É uma bactéria gram negativa, pleomórfica ou cocóide, que se localiza em granulócitos, principalmente neutrófilos, formando nestes os chamados corpúsculos de inclusão ou mórulas (Figura 1).

**Figura 1.** Mórula de *A. phagocytophilum* em equino com infecção aguda. (A) Duas mórulas de *A. phagocytophilum* (seta) dentro de um neutrófilo infectado (Wright-Giemsa 1000x). (B) Corpúsculo de inclusão ligado à membrana (seta) dentro de um neutrófilo circulante (fotomicrografia eletrônica de transmissão 37000x).



Fonte: Siska et al., (2013).

Vários fatores atuam na dinâmica da AGE numa determinada região para que haja a manutenção dos ciclos de transmissão, como a presença de hospedeiros vertebrados suscetíveis ao agente, a capacidade do vetor em se infectar durante o repasto sanguíneo no hospedeiro infectado, além de sua capacidade de infectar um novo hospedeiro (PRADO, 2014).

AGE é transmitida aos hospedeiros através da picada de carrapatos ixodídeos (DZIĘGIEL et al., 2013; PUSTERLA; MADIGAN, 2013; SALEEM et al., 2018; VERONESI et al., 2014). No vetor ocorre a transmissão transtadial, na qual as larvas e ninfas, ao se alimentarem de animais infectados, transmitem a bactéria para o próximo estágio de vida, não havendo transmissão transovariana (SALEEM et al., 2018).

Na América do Norte, Europa e Ásia, *A. phagocytophilum* é transmitido por carrapatos do complexo *Ixodes ricinus*, no qual estão inclusas as espécies *Ixodes scapularis*, *Ixodes pacificus*, *Ixodes ricinus* e *Ixodes persulcatus*, onde estas tem ampla distribuição geográfica nestes continentes (SWANSON et al., 2006). Dependendo do continente, outros gêneros podem atuar como vetores de *A. phagocytophilum*, como

*Dermacentor* spp., *Rhipicephalus* spp., *Hyalomma* spp. e *Haemaphysalis* spp. (DZIEGIEL et al., 2013).

No Brasil, Santos et al. (2013) detectaram *A. phagocytophilum* em espécimes adultos de *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* e *Amblyomma sculptum* (antes *Amblyomma cajennense*) por meio de Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real (qPCR), sendo o primeiro relato de infecção por este agente em carrapatos adultos destas espécies.

*A. phagocytophilum* apresenta distribuição mundial, estando presente em regiões tropicais e subtropicais. Na Europa, já foi detectado em equinos na Holanda (BUTLER, et al., 2008), Polônia (ADASZEK; WINIARCZYK, 2011), França (BONI et al., 2009), Alemanha (SILAGHI; LIEBISCH; PFISTER, 2011), Grã-Bretanha (KORBUTIAK; SCHNEIDERS, 1994), Itália (PASSAMONTI et al., 2010) e Croácia, onde recentemente foi relatado o primeiro caso de AGE (GOTIĆ, et al., 2017).

Na África, M’Ghirbi et al. (2012) diagnosticaram o agente em carrapatos e equinos na Tunísia, enquanto que na Ásia, foi diagnosticado em equinos da Coreia do Sul (SEO, et al., 2018), Paquistão (RAZZAQ, et al., 2015) e Iraque (ALBADRANI; AL-IRAQI, 2019).

Na América do Norte, há relato de um caso de AGE no Canadá, na província de Nova Escócia (UEHLINGER; CLANCEY; LOFSTEDT, 2011), e nos Estados Unidos, foram reportados casos nos estados da Califórnia (GRIBBLE, 1969; MADIGAN; GRIBBLE, 1987), Virginia (LEWIS, et al., 2009), Indiana (SISKA, et al., 2013), Minnesota e Wisconsin (BULLOCK, et al., 2000).

Na América Latina, *A. phagocytophilum* foi diagnosticado por meio de esfregaço sanguíneo em um cavalo no município de Florencia, na Colômbia (CALDERÓN; DELGADO, 2013) e por Nested Reação em Cadeia de Polimerase (nPCR) num equino em Ciudad Juarez, México (MEDRADO-BUGARINI et al., 2019); na Guatemala, através de nPCR e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em equinos no departamento de Petén (TEGLAS, et al., 2005).

No Brasil, diagnóstico sorológico e molecular foi realizado a partir de amostras de sangue de equídeos do estado de Minas Gerais (PRADO, 2014). Estudos sorológicos detectaram anticorpos em cavalos do Esquadrão da Cavalaria e do Regimento da Polícia Montada do Estado do Rio de Janeiro pela técnica de RIFI (ROLIM et al., 2015), assim como em equinos da microrregião da Baixada Maranhense (NOGUEIRA et al., 2017).

Em equinos da Região Centro-Oeste brasileira foram detectados anticorpos por meio de Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA) (SALVAGNI et al., 2010).

*A. phagocytophilum* pode infectar uma variedade de hospedeiros, tais como equinos, ruminantes, cães, gatos e humanos (DE LA FUENTE et al., 2005; STUEN, 2007; CARRADE et al., 2009; RIKIHISA, 2011). Roedores, cervídeos e aves atuam como reservatórios do agente (DE LA FUENTE et al., 2005; THOMAS et al., 2009; NIETO; MADIGAN; FOLEY, 2010; MACHADO et al., 2012).

Estágios de larva, ninfa e adultos de *Ixodes* spp. ao se alimentarem do sangue de animais infectados, adquirem cepas de *A. phagocytophilum*. Quando estes realizam o repasto sanguíneo em outros hospedeiros, ocorre transmissão caso estes hospedeiros sejam sensíveis às cepas. Seres humanos são hospedeiros finais de *A. phagocytophilum*, mas há uma limitação na suscetibilidade às cepas. Apesar de poderem se infectar e serem parasitados por carrapatos, não constituem parte do ciclo de vida da bactéria e dos carrapatos (RIKIHISA, 2011).

*A. phagocytophilum* consegue viver e se multiplicar no interior de vacúolos citoplasmáticos de células polimorfonucleares. Infecta as células progenitoras das linhagens mielóides e monocíticas, sendo observado em neutrófilos tanto no sangue periférico como nos tecidos (GUZMAN; BEIDAS, 2019).

No interior dos neutrófilos, assim que ocorre a fagocitose de um agente infeccioso, forma-se um fagossoma, o qual irá se fundir com os lisossomos para que ocorra sua destruição por meio de enzimas hidrolíticas. Para fugir deste mecanismo de defesa, *A. phagocytophilum* possui a capacidade de se replicar em compartimentos ligados à membrana citoplasmática, impedindo a fusão destes com os lisossomos e, conseqüentemente, bloqueando a ação das enzimas hidrolíticas, o que permite sua replicação e a formação de mórulas ou corpúsculos de inclusão (NIU et al., 2008). Consegue também inibir a apoptose dos neutrófilos infectados, conferindo tempo hábil para se replicar dentro destas células, antes que estas sejam destruídas (SCAIFE et al., 2003; RIKIHISA, 2011).

Os corpúsculos de inclusão têm aproximadamente 0,2µm de diâmetro, consistindo em um ou mais organismos cocóides ou cocobacilares; já as mórulas são formadas por agregados granulares com aproximadamente 5µm de diâmetro. Tais estruturas podem ser visualizadas por microscopia óptica e coradas com Giemsa ou Wright-Leishman (PUSTERLA; MADIGAN, 2013).

AGE é responsável por provocar desequilíbrios nas defesas do organismo, fazendo com que o animal fique exposto a patógenos oportunistas, como fungos, vírus e outras espécies de bactérias. Isso ocorre devido a falhas na imunidade humoral e imunidade mediada por linfócitos T, além de falhas nas funções migratórias e fagocíticas dos neutrófilos (PUSTERLA; MADIGAN, 2013).

A doença pode se manifestar nas formas subclínica e clínica, com um período de incubação variando de 1 a 3 semanas em infecções sob condições naturais (MADIGAN; GRIBBLE, 1987). Os sinais clínicos da AGE incluem febre, depressão, anorexia parcial, edema nas partes distais dos membros, icterícia, petéquias e relutância em se movimentar (PUSTERLA; MADIGAN, 2013). Segundo Stuen (2007), a doença afeta o sistema reprodutor, sendo responsável por causar aborto e alterar a espermiogênese. Também provoca alterações hematológicas como trombocitopenia, leucocitose, neutropenia, linfopenia, anemia leve e hiperbilirrubinemia (DZIEGIEL et al., 2013; SAID et al., 2014).

O diagnóstico é realizado com base em dados epidemiológicos da região, sinais clínicos apresentados pelo animal, alterações em exames hematológicos, e na visualização de mórulas em neutrófilos e eosinófilos de esfregaços sanguíneos (PUSTERLA; MADIGAN, 2013). As mórulas aparecem na fase aguda da doença, cerca de 2 a 4 dias após a infecção (ADASZEK; WINIARCZYK, 2011).

Diagnóstico sorológico de AGE é baseado na detecção de anticorpos anti-*A. phagocytophilum*, com grande parte dos laboratórios veterinários utilizando as técnicas de RIFI e ELISA (MAGNARELLI et al., 2001). Mesmo sendo muito utilizada, a sorologia apresenta limitações, já que na fase aguda da doença os animais apresentam-se soronegativos devido aos anticorpos específicos anti-*A. phagocytophilum* não terem se desenvolvido no plasma (FRANZEN et al., 2005; DZIEGIEL et al., 2013).

Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) é eficiente no diagnóstico de AGE tanto na fase aguda como na fase crônica, quando a bacteremia pode ser pequena a ponto de ser inviável o diagnóstico microscópico (PUSTERLA; MADIGAN, 2013). É uma técnica que promove a replicação *in vitro* do DNA (ácido desoxirribonucleico), na qual ocorre a amplificação de fragmentos de material genético (genes) do agente pesquisado. Para detecção de *A. phagocytophilum* em equinos, ensaios já foram realizados utilizando como alvo os genes 16S rRNA, *groEL*, *msp2* e *msp4* (SILAGHI; LIEBISCH; PFISTER, 2011). As técnicas de PCR utilizadas no diagnóstico são a convencional, nPCR e qPCR, sendo realizadas a partir de amostras de sangue ou tecidos.

Até o momento não existe uma vacina capaz de prevenir a AGE, o que torna ainda mais importante o controle de vetores com produtos acaricidas (SWANSON, et al., 2006). Dentre os acaricidas utilizados no controle de Ixodídeos, destacam-se os piretróides (LABRUNA et al., 2004; CUNHA, et al., 2007; BELLO, et al., 2008; STUEN et al., 2012).

## 2.2 Piroplasmose equina

Piroplasmose equina (PE) é uma enfermidade que acomete equídeos, causada por *Theileria equi* e/ou *Babesia caballi* (SCOLES; UETI, 2015). É transmitida por carrapatos, causando no hospedeiro hemólise intravascular e doença sistêmica associada. Na literatura ela é também denominada de babesiose equina, theileriose ou febre biliar (WISE et al., 2013).

A doença causa impacto no trânsito internacional de equinos, tanto no comércio como na participação dos animais em competições (FRIEDHOFF; TENTER; MULLER, 1990). Os prejuízos econômicos também estão relacionados a custos com tratamentos, abortos, afastamento dos animais de suas funções e morte (ROTHSCHILD, 2013). Foi observada pela primeira vez na África do Sul em 1883 por Wiltshare, sendo nomeada como “febre do antraz” (BOWHILL, 1905).

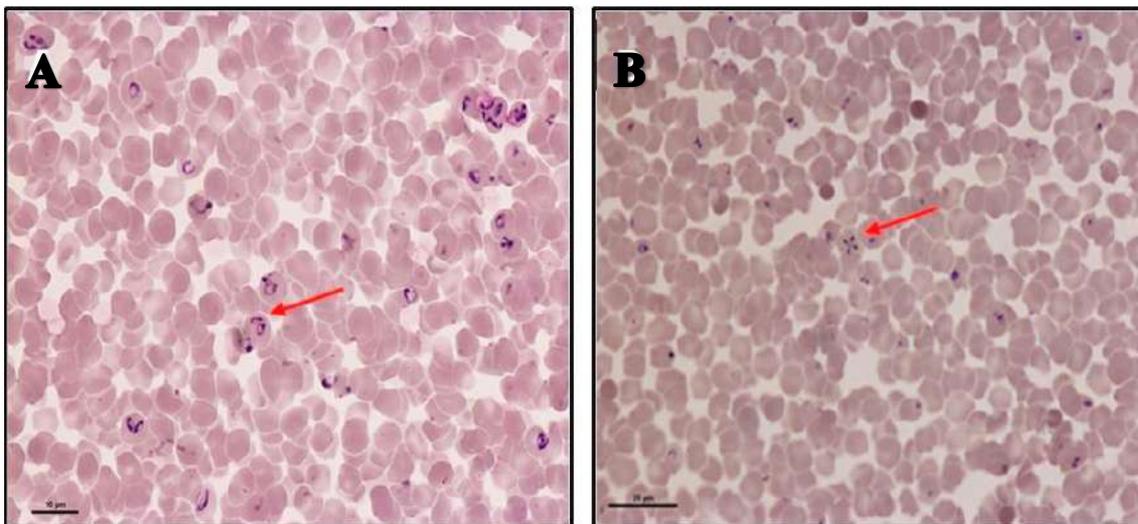
Quanto à taxonomia dos agentes, estes são classificados no filo Apicomplexa, com *B. caballi* pertencendo à família Babesidae, sendo classificada como uma verdadeira *Babesia* pelo fato de apresentar um ciclo intraeritrocitário no hospedeiro vertebrado, dividindo-se apenas em dois merozoítos (BRÜNING, 1996). Em 1998 foi reconhecido que *T. equi*, antes denominada *B. equi*, não se enquadrava taxonomicamente no gênero *Babesia* devido ao seu tamanho, que é menor em relação a outras espécies do gênero. Além disso, parte de seu ciclo é realizado no interior de células mononucleares (linfócitos) do sangue periférico de equinos (WISE et al., 2014). Essa mudança também levou em consideração as semelhanças genéticas com outras espécies do gênero *Theileria* (MEHLHORN, H.; SCHEIN, 1998).

Em virtude de todos estes fatores, *B. equi* que antes pertencia à família Babesidae foi reclassificada como *T. equi*, sendo enquadrada na família Theileriidae.

As formas merozoítas de *B. caballi* localizam-se no interior dos eritrócitos como corpos biofílicos em formato piriforme, com aproximadamente 2 a 5µm de comprimento e 1,3 a 3µm de diâmetro (LEVINE et al., 1985), estando dispostos aos

pares (Figura 2A). Merozoítos de *T. equi* aparecem como corpos piriformes menores no interior dos eritrócitos, medindo 2 a 3µm de comprimento, apresentando um aspecto de “cruz de malta”, (Figura 2B). Podem ocorrer variações em sua morfologia, onde os merozoítos podem assumir formas esféricas ou ovais (DE WAAL, 1992; SCHEIN, 1988).

**Figura 2.** Fotomicrografia de esfregaços sanguíneos corados com Giemsa. A: dois merozoítos piriformes de *B. caballi* no interior de um eritrócito. B: quatro merozoítos de *T. equi* no interior de um eritrócito, apresentando aspecto de “cruz de malta”.



Fonte: Onyiche et al. (2019)

A PE apresenta distribuição mundial, sendo endêmica em regiões tropicais e subtropicais onde o vetor está presente. É relatada na Ásia, América Central e do Sul, África, Sul da Europa, e em algumas regiões do Sul dos Estados Unidos (SALIM, et al., 2013).

Na Europa, está presente na Espanha (CORTÉS; FERNÁNDEZ-GARCÍA; MARTÍNEZ-ESTÉLLEZ, 2017), Itália (ZANET, et al., 2017), Romênia (IONITA et al., 2018), Portugal (RIBEIRO et al., 2013), Hungria (FARKAS et al., 2013) e Suíça (SIGG et al., 2010). Na África, a doença ocorre no Egito (MAHMOUD et al., 2016) e África do Sul (MOTLOANG et al., 2008), enquanto que na Ásia, ocorre na Coreia do Sul (SEO, et al., 2013) e Mongólia (MUNKHJARGAL, et al., 2013).

Nos Estados Unidos, há relatos de surtos no sul do estado do Texas associado a *Amblyomma mixtum* (antes *A. cajennense*) (SCOLES et al., 2011), e no estado da Flórida (SHORT et al., 2012). No Brasil, inquérito sorológico realizado no estado de

São Paulo indicou a presença de PE associada a infestações por carrapatos das espécies *Dermacentor nitens* e *A. sculptum* (KERBER et al., 2009). Diagnóstico sorológico e molecular da doença foi realizado no Pantanal Sul Matogrossense (CAMPOS, 2017) e norte do estado do Maranhão (BRAGA et al., 2017; NOGUEIRA et al., 2017).

Foram listadas 33 espécies de ixodídeos pertencentes a seis gêneros como vetores competentes na transmissão de *B. caballi*, *T. equi* ou ambas, contudo, apenas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *D. nitens* são as espécies transmissoras na América do Sul (SCOLES; UETI, 2015). Estudos realizados por Kerber et al. (2009) sugerem que *A. cajennense sensu lato* atue como vetor de *T. equi*.

Quanto ao ciclo de vida, *T. equi* realiza reprodução assexuada (esquizogonia) nas células mononucleares do sangue periférico do hospedeiro, para em seguida reproduzir-se novamente de forma assexuada (merogonia), só que dessa vez no interior dos eritrócitos, com posterior ruptura destas células. Após realizar repasto sanguíneo no hospedeiro infectado, os carrapatos adquirem *T. equi*, a qual irá se reproduzir sexuadamente (gamogonia) em seu intestino e assexuadamente (esporogonia) nas glândulas salivares, onde serão liberadas juntamente com a saliva as formas infectantes denominadas esporozoítos. Diferentemente de *T. equi*, os esporozoítos de *B. caballi* ao serem inoculados no hospedeiro penetram exclusivamente os eritrócitos, não ocorrendo a invasão de células mononucleares e esquizogonia no interior delas (SCOLES; UETI, 2015). Os esporozoítos de *B. caballi* invadem os eritrócitos, transformando-se em trofozoítos e posteriormente em merozoítos. Os merozoítos se reproduzem assexuadamente (merogonia), causando em seguida a ruptura dos eritrócitos parasitados. O ciclo de *B. caballi* no interior do carrapato é semelhante ao ciclo de *T. equi*, resultando na formação de esporozoítos infectantes nas glândulas salivares do vetor.

Em áreas endêmicas para PE, grande parte dos potros são infectados. A mortalidade dos animais nestas áreas varia de 5% a 10%, o que vai depender das cepas dos protozoários, da sanidade dos animais e da possibilidade destes receberem tratamento. Quando equinos adultos provenientes de áreas não endêmicas são introduzidos em áreas endêmicas, a taxa de mortalidade pode superar os 50% (ROTHSCHILD, 2013).

*T. equi* e *B. caballi* provocam um quadro de anemia hemolítica em decorrência da ruptura dos eritrócitos pelos merozoítos (WISE et al., 2013). Devido à hemólise contínua provocada por estes agentes, ocorre uma redução no volume globular, além de

hemoglobinúria e icterícia. Na infecção por *T. equi* a hemoglobinúria pode ter uma intensidade variável, decorrente de uma severa hemólise, enquanto que na infecção por *B. caballi* ocorre uma oclusão dos capilares, devido ao acúmulo de eritrócitos parasitados nos vasos (ROTHSCHILD, 2013). Trombocitopenia e alterações na coagulação são observadas em infecções causadas por ambos os agentes (ALLEN; FRERICHS; HOLBROOK, 1975; AMBAWAT, 1999).

Os sinais clínicos observados na PE são febre, anorexia, perda de peso, letargia, petéquias nas mucosas e edema periférico (DE WAAL, 1992; WISE et al., 2014). Taquicardia, taquipnéia, palidez das mucosas, icterícia, edema pulmonar, sintomatologia nervosa e sinais gastrintestinais, como cólica, constipação e diarreia são observados (MAURER, 1962; TAYLOR et al., 1969; SUMBRIA; BOTTEON et al., 2005; ZOBBA et al., 2008; SUMBRIA; MOUDGIL; SINGLA, 2014).

Em infecções crônicas, os animais tornam-se portadores assintomáticos, atuando como reservatórios (FRIEDHOFF, 1990). Quando estes animais são submetidos a condições de estresse, onde há uma imunodepressão, a doença pode reagudizar.

Anemia é a principal alteração hematológica observada, a qual é caracterizada pela queda do número de eritrócitos, hemoglobina e volume globular. Variações no leucograma podem ocorrer, assim como trombocitopenia (RUDOLPH, 1975; WISE et al., 2014; ZOBBA et al., 2008). Anormalidades bioquímicas incluem diminuição das proteínas totais, aumento dos níveis de bilirrubina, aspartato aminotransferase (AST), gama glutamil-transferase (GGT), creatina quinase, fosfatase alcalina, hipoalbumemia e alterações nos níveis de fósforo (HAILAT et al., 1997; ZOBBA et al., 2008).

Sinais clínicos e exames hematológicos, como hemograma e dosagens bioquímicas, não são suficientes para se fechar um diagnóstico, já outras doenças podem ter sinais clínicos semelhantes, assim como alterações hematológicas. Para maior confiabilidade no diagnóstico de PE, é necessário o uso de outras técnicas, como pesquisa direta de hemoparasitos em esfregaços sanguíneos por microscopia óptica, sorologia e PCR.

Esfregaços sanguíneos corados podem ser úteis na fase aguda da doença, quando a parasitemia é alta, porém na fase crônica o diagnóstico torna-se difícil devido à baixa parasitemia no sangue periférico. Esfregaços sanguíneos obtidos a partir de punção do baço podem ser uma boa alternativa, já que ocorre sequestro de eritrócitos infectados para este órgão (RIBEIRO et al., 2013).

Para o transporte e comércio internacional, a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) recomenda a utilização de RIFI ou Ensaio de Imunoadsorção Enzimática competitivo (c-ELISA), como testes de triagem (COULTOUS et al., 2018). Apesar de apresentarem boa sensibilidade, estes testes não demonstram os níveis de parasitemia, não esclarecendo se o animal ainda pode transmitir a doença, já que os anticorpos permanecem por vários meses após a eliminação do patógeno (UETI et al., 2012).

As técnicas de PCR são mais sensíveis e específicas no diagnóstico de *B. caballi* e *T. equi* que as sorológicas, pois elas amplificam sequências gênicas destes agentes, caso estejam presentes na amostra biológica coletada. A nPCR tem como vantagem a detecção de animais positivos, mesmo aqueles cronicamente infectados (NICOLAIEWSKY et al., 2001), enquanto que a multiplex Reação em Cadeia de Polimerase (multiplex PCR) permite o diagnóstico e identificação simultânea de *T. equi* e *B. caballi* em equinos, com elevada sensibilidade e especificidade (ALHASSAN et al., 2005).

Em áreas endêmicas, a prevenção se baseia no controle da população de carrapatos vetores por meio do uso de produtos acaricidas, como organofosforados, piretróides e formamidinas. Os acaricidas podem ser utilizados no momento da importação, para reduzir o risco de introduzir carrapatos em áreas não endêmicas (FRIEDHOFF; SOULE, 1996; ONYICHE et al., 2019). Outra forma de prevenção é a associação entre testes sorológicos e moleculares na triagem de animais importados, tornando a triagem da PE mais eficiente (COULTOUS et al., 2018).

## REFERÊNCIAS

- ADASZEK, Ł.; WINIARCZYK, S. Identification of *Anaplasma spp.* Rickettsia isolated from horses from clinical disease cases in Poland. **Zoonoses and Public Health**, v. 58, n. 7, p. 514-518, 2011.
- ALBADRANI, B. A.; AL-IRAQI, O. M. First detection of equine anaplasmosis and hemoplasmosis of horses in Mosul City, Iraq. **Advances in Animal Veterinary Sciencis**, v. 7, n. 2, p. 106-111, 2019.
- 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.
- ALLEN, P. C.; FRERICHS, W. M.; HOLBROOK, A. A. Experimental acute *Babesia caballi* infections: I. Red blood cell dynamics. **Experimental Parasitology**, v. 37, n. 1, p. 67-77, 1975.
- AMBAWAT, H. K. et al. Erythrocyte associated haemato-biochemical changes in *Babesia equi* infection experimentally produced in donkeys. **Veterinary Parasitology**, v. 85, n. 4, p. 319-324, 1999.
- BELLO, A. C. P. P. et al. Controle de *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae) em equinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 59-63, 2008.
- BONI, M. et al. Isolated fever in horses: a new case of equine anaplasmosis in France. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, p. 64-65, 2009.
- BOWHILL, Thomas. Equine Piroplasmosis, or “Biliary Fever”. **Epidemiology & Infection**, v. 5, n. 1, p. 7-17, 1905.
- BRAGA, M. S. C. O. et al. Genetic diversity of piroplasmids species in equids from island of São Luís, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, n. 3, p. 331-339, 2017.
- BRÜNING, Anke. Equine piroplasmosis an update on diagnosis, treatment and prevention. **British Veterinary Journal**, v. 152, n. 2, p. 139-151, 1996.
- BULLOCK, P. M. et al. *Ehrlichia equi* infection of horses from Minnesota and Wisconsin: detection of seroconversion and acute disease investigation. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, n. 3, p. 252-257, 2000.
- BUTLER, C. M. et al. *Anaplasma phagocytophilum* infection in horses in the Netherlands. **Veterinary Record**, v. 162, n. 7, p. 216-217, 2008.
- CALDERÓN, L. G. R.; DELGADO, P. A. M. Reporte de caso clínico de ehrlichiosis equina en el municipio de Florencia (Colombia). **Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 14, n. 1, p. 1-12, 2013.

CAMPOS, João Bosco Vilela. **Fatores Determinantes para a ocorrência de piroplasmose equina no Pantanal Sul Matogrossense**. 2017. 102 p. Dissertação (Mestrado em Ciências ambientais e sustentabilidade Agropecuária). Universidade Católica Dom Bosco. Campo Grande, 2017.

CORTÉS, M. G. M.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, J. L.; MARTÍNEZ-ESTÉLLEZ, M. Á. H. Seroprevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses in Spain. **Parasite**, v. 24, 2017.

COULTOUS, R. M. et al. Equine Piroplasmosis status in the United Kingdom: an assessment of laboratory diagnostic submissions and techniques. **Veterinary Record**, 2018.

CUNHA, A. P. D. et al. Strategic control of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (acari: ixodidae) on horses, Minas Gerais, Brazil-Part I. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 4, p. 221-228, 2007.

COULTOUS, R. M. et al. Equine Piroplasmosis status in the United Kingdom: an assessment of laboratory diagnostic submissions and techniques. **Veterinary Record**, 2018.

DE LA FUENTE, J. et al. Potential vertebrate reservoir hosts and invertebrate vectors of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum* in central Spain. **Vector-Borne & Zoonotic Diseases**, v. 5, n. 4, p. 390-401, 2005.

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

DUMLER, J. S. et al. 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 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 2145-2165, 2001.

DZIEGIEL, B. et al. Equine granulocytic anaplasmosis. **Research in Veterinary Science**, v. 95, n. 2, p. 316-320, 2013.

FARKAS, R. et al. Serological and molecular detection of *Theileria equi* infection in horses in Hungary. **Veterinary Parasitology**, v. 192, n. 1-3, p. 143-148, 2013.

FRANZÉN, P. et al. 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.

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

FRIEDHOFF, K. T.; SOULE, C. An account on equine babesioses. **Revue Scientifique et Technique-Office International des Épizooties**, v. 15, p. 1191-1201, 1996.

GOTIĆ, J. et al. A first case of equine granulocytic anaplasmosis in Croatia. **Veterinarski Arhiv**, v. 87, n. 1, p. 113-120, 2017.

GRIBBLE, David H. Equine Ehrlichiosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.155, p.462-469, 1969.

GUZMAN, N.; BEIDAS, S. O. *Anaplasma phagocytophilum* (anaplasmosis). In: **StatPearls [Internet]**. StatPearls Publishing, 2019.

HAILAT, N. Q. *et al.* Equine babesiosis associated with strenuous exercise: clinical and pathological studies in Jordan. **Veterinary Parasitology**, v. 69, n. 1-2, p. 1-8, 1997.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa da Pecuária Municipal, 2018. Disponível em:<http://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado>. Acesso em: 25 set. 2019.

IONITA, M. et al. Parasitological and molecular diagnostic of a clinical *Babesia caballi* outbreak in Southern Romania. **Parasitology Research**, v. 117, n. 7, p. 2333-2339, 2018.

KERBER, C. E. et al. Prevalence of equine Piroplasmosis 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.

KORBUTIAK, E. et al. First confirmed case of equine ehrlichiosis in Great Britain. **Equine Veterinary Education**, v. 6, n. 6, p. 303-304, 1994.

LABRUNA, M.B.; LEITE, R.C.; GOBESSO, A.A.O. et al. Controle estratégico do carrapato *Amblyomma cajennense* em equinos. **Ciência Rural**, v. 34, p. 195-200, 2004.

LEVINE, N. D. et al. **Veterinary Protozoology**. Ames: Iowa State University Press, 1985.

LEWIS, S. R. et al. Equine granulocytic anaplasmosis: a case report and review. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 29, n. 3, p. 160-166, 2009.

LIMA, RA de S.; CINTRA, A. G. Revisão do estudo do complexo do agronegócio do cavalo. **Ministério da Agricultura, Brasília, DF**, 2016.

MACHADO, R. Z. et al. Migratory and carnivorous birds in Brazil: reservoirs for *Anaplasma* and *Ehrlichia* species?. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 8, p. 705-708, 2012.

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.

- MAGNARELLI, L. A. et al. Evaluation of a polyvalent enzyme-linked immunosorbent assay incorporating a recombinant p44 antigen for diagnosis of granulocytic ehrlichiosis in dogs and horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 1, p. 29-32, 2001.
- MAHMOUD, M. S. et al. Assessment of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in equine populations in Egypt by molecular, serological and hematological approaches. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 260, 2016.
- MAURER, Fred Dry. Equine piroplasmosis--another emerging disease. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 141, p. 699, 1962.
- 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.
- MEDRANO-BUGARINI, R. A. et al. Detection of *Theileria equi*, *Babesia caballi*, and *Anaplasma phagocytophilum* DNA in Soft Ticks and Horses at Ciudad Juarez, Mexico. **Southwestern Entomologist**, v. 44, n. 3, p. 647-658, 2019.
- M'GHIRBI, Y. et al. *Anaplasma phagocytophilum* in horses and ticks in Tunisia. **Parasites & vectors**, v. 5, n. 1, p. 180, 2012.
- MOTLOANG, M. Y. et al. Prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in horses belonging to resource-poor farmers in the north-eastern Free State Province, South Africa. **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.
- MUNKHJARGAL, T. et al. Prevalence and genetic diversity of equine piroplasms in Tov province, Mongolia. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 16, p. 178-185, 2013.
- NIETO, N. C.; MADIGAN, J. E.; FOLEY, J. E. The dusky-footed woodrat (*Neotoma fuscipes*) is susceptible to infection by *Anaplasma phagocytophilum* originating from woodrats, horses, and dogs. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 46, n. 3, p. 810-817, 2010.
- NIU, H.; YAMAGUCHI, M.; RIKIHISA, Y.. Subversion of cellular autophagy by *Anaplasma phagocytophilum*. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 593-605, 2008.
- NOGUEIRA, R. M. S. et al. Molecular and serological detection of *Theileria equi*, *Babesia caballi* and *Anaplasma phagocytophilum* in horses and ticks in Maranhão, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 12, p. 1416-1422, 2017.
- ONYICHE, T. E. et al. A Review on Equine Piroplasmosis: Epidemiology, Vector Ecology, Risk Factors, Host Immunity, Diagnosis and Control. **International journal of environmental research and public health**, v. 16, n. 10, p. 1736, 2019.

PARRA, Andréa Cristina. **Investigação diagnóstica de doença concomitante babesiose e anaplasmose em rebanho equino, por técnicas de Nested PCR e-ELISA ou ELISA indireto.** 2009. 78 p. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária). Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

PASSAMONTI, F. et al. *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.

PRADO, Luan Gavião. **Avaliação Clínica e Laboratorial de Equídeos Sororreagentes para *Anaplasma phagocytophilum* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) em Minas Gerais, Brasil.** 2014. 74 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2014.

PUSTERLA, N.; MADIGAN, J. E. Equine granulocytic anaplasmosis. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 7, p. 493-496, 2013.

RAZZAQ, F. et al. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in horses from Southern Punjab (Pakistan). **Tropical Biomedicine**, v. 32, p. 233-9, 2015.

RIBEIRO, A. J. et al. Prevalence of *Theileria equi*, *Babesia caballi*, and *Anaplasma phagocytophilum* in horses from the north of Portugal. **Parasitology Research**, v. 112, n. 7, p. 2611-2617, 2013.

RIBEIRO, I. B. et al. Detection of *Theileria equi* in spleen and blood of asymptomatic piroplasm carrier horses. **Acta Parasitologica**, v. 58, n. 2, p. 218-222, 2013.

RIKIHISA, Yasuko. Mechanisms of obligatory intracellular infection with *Anaplasma phagocytophilum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 3, p. 469-489, 2011.

RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I.; COB-GALERA, L. A.; DOMÍNGUEZ-ALPIZAR, J. L. Hemoparásitos en bovinos, caninos y equinos diagnosticados en el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatan (1984-1999). **Revista Biomédica**, v. 11, n. 4, p. 277-282, 2000.

ROLIM, M. F. et al. Serological evidence of exposure to *Anaplasma phagocytophilum* in horses from the Rio de Janeiro state mounted police bred in the urban zone. **Ciência Animal Brasileira**, v. 16, n. 3, p. 377-387, 2015.

ROTHSCHILD, C. M. Equine piroplasmosis. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 7, p. 497-508, 2013.

RUDOLPH, W. et al. Equine piroplasmosis: leukocytic response to *Babesia equi* (Laveran, 1901) infection in Chile. **British Veterinary Journal**, v. 131, n. 5, p. 601-609, 1975.

SAID, M. B. et al. Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in well-maintained horses from Northern Tunisia. **Tropical Biomedicine**, v. 31, n. 3, p. 432-440, 2014.

SALIM, B. et al. Current status of equine piroplasmosis in the Sudan. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 16, p. 191-199, 2013.

SALVAGNI, C. A. et al. 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.

SALEEM, S. et al. Equine granulocytic anaplasmosis 28 years later. **Microbial Pathogenesis**, v. 119, p. 1-8, 2018.

SANTOS, H. A. et al. Molecular epidemiology of the emerging zoonosis agent *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) in dogs and ixodid ticks in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, p. 348, 2013.

SCAIFE, H. et al. *Anaplasma phagocytophilum* reduces neutrophil apoptosis in vivo. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 4, p. 1995-2001, 2003.

SCHEIN, Eberhard. Equine babesiosis. 1988.

SCOLES, Glen A. et al. Equine piroplasmosis associated with *Amblyomma cajennense* ticks, Texas, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, p. 1903, 2011.

SCOLES, G. A.; UETI, Massaro W. Vector ecology of equine piroplasmosis. **Annual Review of Entomology**, v. 60, p. 561-580, 2015.

SEO, M.G. et al. Molecular and phylogenetic analysis of equine piroplasms in the Republic of Korea. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n. 3, p. 579-583, 2013.

SEO, M.G. et al. Molecular Detection and Phylogenetic Analysis of *Anaplasma phagocytophilum* in Horses in Korea. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 56, n. 6, p. 559, 2018.

SIGG, L. et al. Seroprevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in the Swiss horse population. **Parasitology International**, v. 59, n. 3, p. 313-317, 2010.

SILAGHI, C.; LIEBISCH, G.; PFISTER, K. Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* from 14 equine granulocytic anaplasmosis cases. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 1, p. 161, 2011.

SISKA, W. D. et al. Clinicopathologic characterization of six cases of equine granulocytic anaplasmosis in a nonendemic area (2008-2011). **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 8, p. 653-657, 2013.

STUEN, S. *Anaplasma phagocytophilum* the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. **Veterinary Research Communications**, v. 31, n. 1, p. 79-84, 2007.

STUEN, S. et al. Prophylactic treatment with flumethrin, a pyrethroid (Bayticol®, Bayer), against *Anaplasma phagocytophilum* infection in lambs. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 54, n. 1, p. 31, 2012.

SUMBRIA, D.; MOUDGIL, A. D.; SINGLA, L. D. Equine Piroplasmosis: current status. **Veterinaria**, v. 1, n. 1, p. 9-14, 2014.

SWANSON, S. J. et al. Coinfections acquired from *Ixodes* ticks. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 4, p. 708-727, 2006.

TAYLOR, W. M. et al. Equine piroplasmosis in the United States--a review. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 155, n. 6, p. 915-919, 1969.

TEGLAS, M. et al. Ticks and tick-borne disease in Guatemalan cattle and horses. **Veterinary Parasitology**, v. 131, n. 1-2, p. 119-127, 2005.

UETI, M. W. et al. Re-emergence of the apicomplexan *Theileria equi* in the United States: elimination of persistent infection and transmission risk. **PloS One**, v. 7, n. 9, p. e44713, 2012.

THOMAS, R. J.; DUMLER, J. S.; CARLYON, J. A. Current management of human granulocytic anaplasmosis, human monocytic ehrlichiosis and *Ehrlichia ewingii* ehrlichiosis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 7, n. 6, p. 709-722, 2009.

UEHLINGER, F. D.; CLANCEY, N. P.; LOFSTEDT, J. Granulocytic anaplasmosis in a horse from Nova Scotia caused by infection with *Anaplasma phagocytophilum*. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 52, n. 5, p. 537, 2011.

VERONESI, F. et al. Evaluation of the performance of a rapid enzyme-linked immunosorbent assay in the detection of *Anaplasma phagocytophilum* antibodies in horses. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 14, n. 5, p. 317-323, 2014.

WISE, L. N. et al. Review of equine piroplasmosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, n. 6, p. 1334-1346, 2013.

WISE, L. N. et al. Equine piroplasmosis. **Veterinary Clinics: Equine Practice**, v. 30, n. 3, p. 677-693, 2014.

ZANET, S. et al. Horses infected by Piroplasms different from *Babesia caballi* and *Theileria equi*: species identification and risk factors analysis in Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 236, p. 38-41, 2017.

ZEIDNER, N. S. et al. 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. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 182, n. 2, p. 616-619, 2000.

ZOBBA, Rosanna et al. Clinical and laboratory findings in equine piroplasmosis. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, n. 5, p. 301-308, 2008.

## **CAPÍTULO 2**

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *Theileria equi*, *Babesia caballi* e *Anaplasma phagocytophilum* EM EQUINOS NO BIOMA CERRADO, E NUMA ÁREA DE TRANSIÇÃO AMAZÔNIA-CERRADO, MARANHÃO, BRASIL**

**Molecular detection of *Theileria equi*, *Babesia caballi* and *Anaplasma phagocytophilum* in horses of the Cerrado biome, and Amazon-Cerrado transition area, Maranhão State, Brazil**

**Detecção molecular de *Theileria equi*, *Babesia caballi* e *Anaplasma phagocytophilum* em equinos no bioma Cerrado, e numa área de transição Amazônia-Cerrado, Maranhão, Brasil**

**Presence of piroplasm, and *Anaplasms* in horse in the Maranhão State, Brazil**

Leandro Macedo Miranda<sup>1</sup>; Andreina de Carvalho Araújo<sup>2</sup>; Júlia Angélica Gomes da Silveira<sup>2</sup>; Soraia de Oliveira Silva<sup>2</sup>; Ellainy Maria Conceição Silva<sup>3</sup>; Ingrid Carolinne Lopes Marques<sup>3</sup>; Rodrigo Santos Fucuta<sup>4</sup>; Eduardo Del Sarto<sup>4</sup>; Gardel Franco Nascimento<sup>5</sup>; Cláudio Luís Nina Gomes<sup>4</sup>; Rita de Maria Seabra Nogueira<sup>1</sup>; Francisco Borges Costa<sup>1\*</sup>

1 Laboratório de Parasitologia, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão - UEMA, São Luís, MA, Brasil

2 Laboratório de Protozoologia Veterinária, Instituto de Ciências Biológicas - ICB, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil

3 Laboratório de Patologia Molecular, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão - UEMA, São Luís, MA, Brasil

4 Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Maranhão - UEMA, São Luís, MA, Brasil

5 Serviço Nacional de Aprendizagem Rural – SENAR, Açailândia, MA, Brasil

## Abstract

Equine Piroplasmosis (EP) is a disease of equids caused by *Theileria equi* and *Babesia caballi*. *Anaplasma phagocytophilum* is the etiological agent of Equine granulocytic anaplasmosis (EGA). Both diseases are transmitted by Ixodid ticks. The study aimed to determine the occurrence of PE and EGA in the Cerrado biome and in a transition Amazon-Cerrado area, Maranhão State, by polymerase chain reaction (PCR), blood smears and identify species of ticks parasitizing horses. Blood samples were collected from 210 equines; 33 (15,7%) were infested with ticks of the species *Dermacentor nitens*, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *Amblyomma sculptum*. Hemopathogens were not detected in blood smears. PCR detected 150 (71.4%) and 33 (15.7%) positive samples for *T. equi* and *B. caballi*, respectively; 17 (8.1%) e 10 (4.7%) were positive for the *msp4* and *msp2* of *A. phagocytophilum* genes, respectively. The biome and acaricidal treatment variables showed a significant difference ( $P < 0.05$ ), associated with infection by *B. caballi*. *T. equi*, *B. caballi* and *A. phagocytophilum* circulate in the Amazon and Cerrado of Maranhão, with co-infection between these pathogens. AGE should be included as a differential diagnosis of PE in the state of Maranhão.

Keywords: Anaplasmosis, Piroplasmosis; ticks, horse.

## Resumo

Piroplasmose equina (PE) é uma enfermidade de equídeos causada por *Theileria equi* e *Babesia caballi*. *Anaplasma phagocytophilum* é o agente etiológico da Anaplasmosse granulocítica equina (AGE). Ambas doenças são transmitidas por carrapatos Ixodídeos. Objetivou-se determinar a ocorrência de PE e AGE no bioma Cerrado e numa área de transição Amazônia-Cerrado, Estado do Maranhão, por reação em cadeia pela polimerase (PCR), esfregaços sanguíneos e identificar as espécies de carrapatos infestando equinos. Coletou-se 210 amostras de sangue; 33 (15,7%) equinos estavam infestados por carrapato das espécies *Dermacentor nitens*, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *Amblyomma sculptum*. Nenhum esfregaço sanguíneo apresentou hemopatógenos. PCR detectou 150 (71,4%) e 33 (15,7%) amostras positivas para *T. equi* e *B. caballi*, respectivamente; 17 (8,1%) e 10 (4,7%) foram positivas para os genes *msp4* e *msp2* de *A. phagocytophilum*, respectivamente. As variáveis bioma e tratamento acaricida apresentaram diferença significativa ( $P < 0.05$ ), estando associadas à infecção por *B. caballi*. *T. equi*, *B. caballi* e *A. phagocytophilum* circulam na Amazônia e Cerrado maranhense, havendo co-infecção entre estes patógenos. AGE deve ser incluída como diagnóstico diferencial de PE no estado do Maranhão.

Palavras-chave: Anaplasmosse; Piroplasmose; carrapatos; cavalo.

## Introdução

Piroplasmose equina (PE) é uma enfermidade que acomete equídeos, causada por *Theileria equi* e/ou *Babesia caballi* (Scoles & Ueti, 2015). Estes parasitas intraeritrocitários obrigatórios podem desencadear uma anemia hemolítica de intensidade variável, associada a um quadro patológico sistêmico (Wise, et al., 2013). Alguns países considerados áreas livres para a doença impõem restrições para a importação de animais, devendo estes testarem negativo em exames sorológicos (Nicolaiewsky et al., 2001). Os prejuízos causados pela doença estão relacionados aos custos com tratamento, aborto, afastamento dos animais de suas funções e morte (Rothschild, 2013).

A doença apresenta distribuição mundial, sendo relatada na Ásia, Américas Central e do Sul, África, Sul da Europa e em algumas regiões do Sul dos Estados Unidos (Salim, et al., 2013). Na América do Sul, os carrapatos transmissores são *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Dermacentor nitens* (Scoles & Ueti, 2015) e, segundo um estudo realizado por Kerber et al. (2009), infestações por *Amblyomma sculptum* (antes denominado *Amblyomma cajennense*) estão associadas à infecção por *T. equi* em cavalos.

No Brasil, diagnóstico molecular de *T. equi* e *B. caballi* em equinos tem sido realizado em diferentes partes do país (Heim et al., 2007; Baldani et al., 2010; Peckle et al., 2013; Ferreira et al., 2016; Schein et al., 2018; Costa et al., 2019; Valente et al., 2019). No Maranhão, tais agentes já foram detectados em equídeos na Ilha de São Luís (Braga et al., 2017) e em equinos na microrregião da Baixada Maranhense (Nogueira et al., 2017), sendo ambas as localidades situadas no norte do Estado, dentro do bioma Amazônia.

*Anaplasma phagocytophilum* (antes denominado *Ehrlichia equi*) é o agente causador da Anaplasmosse granulocítica equina (AGE; antes denominada erliquiose granulocítica equina) (Pusterla & Madigan, 2013). É uma bactéria gram-negativa, que se localiza no interior de granulócitos de hospedeiros infectados, principalmente neutrófilos (Bjöersdorff et al., 2002; McQuiston et al., 2003). Os sinais clínicos mais comuns relatados em equinos são febre, depressão, anorexia, edema dos membros, relutância em se mover e icterícia (M'Ghirbi et al., 2012). A transmissão é através da picada de carrapatos Ixodídeos (Dzięgiel et al., 2013; Pusterla & Madigan, 2013; Saleem et al., 2018; Veronesi et al., 2014).

A doença é relatada em diversas partes do mundo (Woldehiwet, 2010; Pusterla & Madigan, 2014; Saleem et al., 2018a). No Brasil, diagnóstico sorológico tem sido realizado no Rio de Janeiro (Rolim et al., 2015), Maranhão (Nogueira et al., 2017) e Distrito Federal (Salvagni et al., 2010), enquanto que em Minas Gerais e também no Rio de Janeiro, diagnóstico foi obtido por associação entre técnicas sorológicas e moleculares (Prado et al., 2018; Dos Santos et al., 2019).

Este trabalho tem como objetivo determinar a ocorrência de *T. equi*, *B. caballi* e *A. phagocytophilum* em equinos por técnicas moleculares e esfregaços sanguíneos, e identificar as espécies de carrapatos parasitando os equinos no bioma Cerrado, e numa área de transição Amazônia-Cerrado, no Estado do Maranhão.

## **Material e Métodos**

### Comitê de Ética e Experimentação Animal

O trabalho foi submetido ao Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Estadual do Maranhão (CEEAA/UEMA), sendo aprovado com o número de protocolo 08/2019.

### Área de estudo

O estudo foi realizado nos meses de Agosto e Setembro de 2019, nos municípios de São Francisco do Brejão (latitude 5° 7' 24" S, longitude 47° 25' 6" O), Sítio Novo (latitude 4° 59' 13" S, longitude 46° 34' 39" O), São Pedro dos Crentes (latitude 6° 49' 29" S, longitude 46° 31' 56" O), Feira Nova do Maranhão (latitude 6° 57' 16" S, longitude 46° 40' 44" O) e Balsas (latitude 7° 31' 59" S, longitude 46° 2' 6" O), localizados no Estado do Maranhão, Nordeste do Brasil (Figura 1).

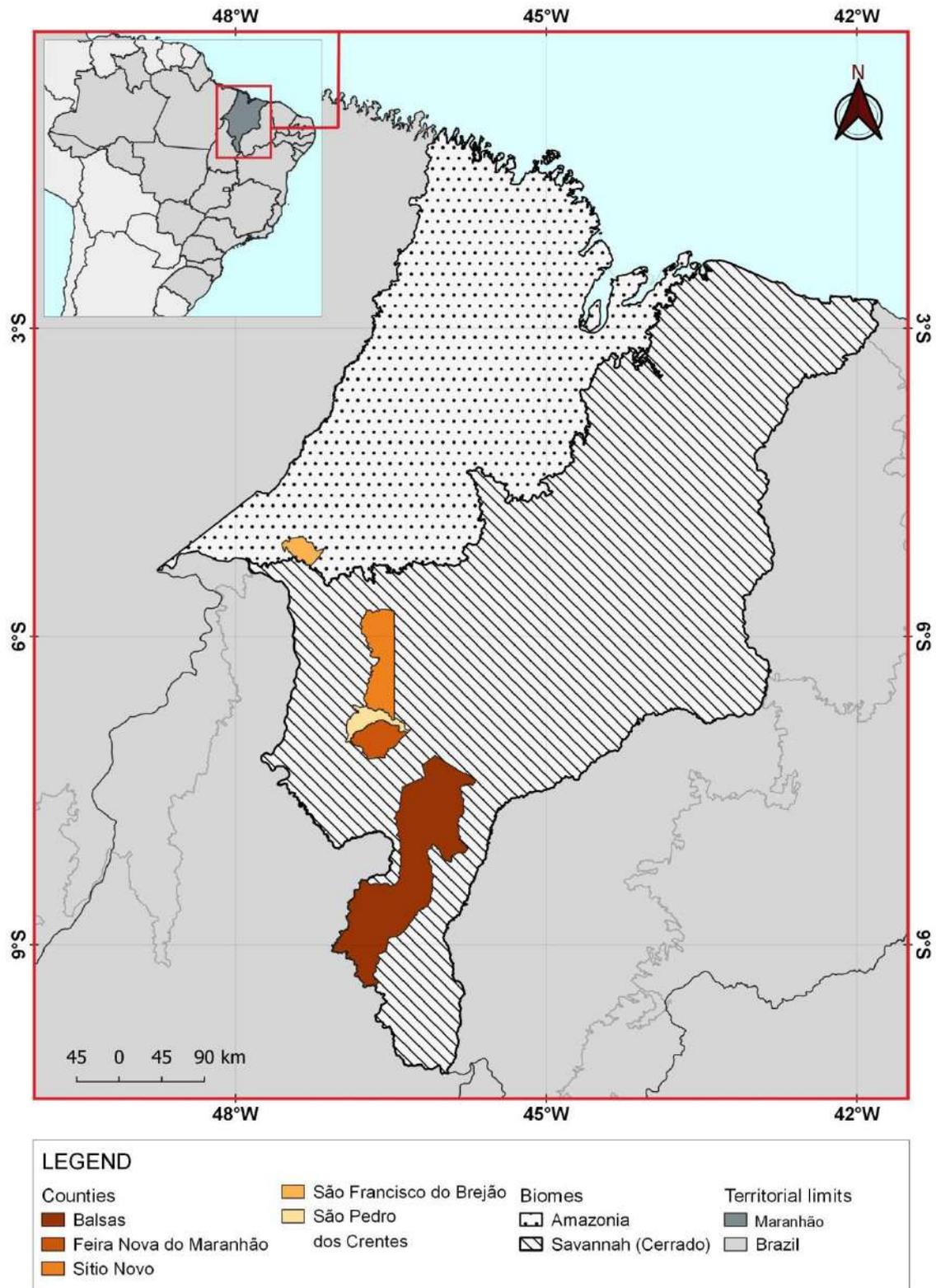


Figura 1. Mapa do estado do Maranhão com os biomas e municípios estudados.

## Amostras

A quantidade de animais amostrados foi obtida por conveniência, onde estes foram escolhidos independentemente da raça, sexo, idade ou condição clínica. Todos os equinos foram submetidos à inspeção para presença de carrapatos e coleta de sangue venoso.

As amostras de sangue venoso (5ml) foram obtidas por punção da veia jugular, acondicionadas em tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Labor Import<sup>®</sup>) e armazenadas em freezer à temperatura de -20°C. Os carrapatos coletados foram acondicionados em microtubos de 1,5ml (Eppendorf Tubes<sup>®</sup> 3810X) e conservados em álcool à 70%. A identificação taxonômica dos carrapatos seguiu a chave taxonômica de Barros-Battesti et al. (2006).

## Questionário epidemiológico

Foram aplicados questionários epidemiológicos junto aos proprietários para levantamento de dados sobre os animais (nome, idade, sexo, presença de carrapatos e tratamento acaricida).

## Esfregaço sanguíneo e análises laboratoriais

Esfregaços sanguíneos foram confeccionados em lâminas de vidro para microscopia, posteriormente corados com Giemsa (Laborclin<sup>®</sup>) para pesquisa dos agentes por meio de microscopia óptica, com aumento de 1000X sob imersão em óleo.

## Extração de Ácido Desoxirribonucleico (DNA) e Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).

DNA foi extraído das amostras de sangue utilizando-se o kit de extração PureLink<sup>™</sup> Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen<sup>™</sup>, Calrsbad, CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Cada amostra de DNA extraído foi acondicionada individualmente em microtubo de 1,5 ml e armazenada em freezer à temperatura de -20°C. As amostras de DNA extraído foram submetidas à reação em cadeia de polimerase (PCR) para o gene endógeno *gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase* (GAPDH). Foram realizados ensaios de nested reação em cadeia de polimerase (nPCR)

com alvo nos genes *msp2* e *msp4* de *A. phagocytophilum* (Zeidner et al., 2000; Bown et al., 2007), e PCR convencional com alvo no gene *ema-1* de *T. equi*, conforme descrito por Nicolaiewsky et al. (2001), e no gene da proteína *48-kDa* de rotrias de *B. caballi*, segundo Ikadai et al. (1999). As regiões gênicas, sequências dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho dos produtos amplificados, ciclos de amplificação e referências, encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Sequências de oligonucleotídeos iniciadores, região gênica e condições de amplificação para ensaios de PCR convencional para *Theileria equi* e *Babesia caballi* e nested-PCR para *Anaplasma phagocytophilum*.

Região gênica	Sequência dos Oligonucleotídeos iniciadores (5'-3')	Tamanho do produto amplificado (pb)	Ciclos de amplificação	Referência
<i>ema-1</i>	EMAE-F(CCGCCCTTCACCTCGTTCTCAA) EMAE-R (TCTCGCGGCATCCTTGACCTC)	396	94°C por 4 min.; 40 ciclos de: 94°C por 40s, 60°C por 1min., 72°C por 1min. e 72°C por 4 min.	Nicolaiewsky et al. (2001)
<i>48-kDa</i>	BC48-F (GGTCCCAGCGACTCTG) BC48-R (GCATCAAGAGGGCACTTAAG)	570	94°C por 2 min.; 40 ciclos de: 94°C por 30s, 55°C por 30s, 72°C por 1min. e 72°C por 7 min.	Ikadai et al. (1999)
<i>msp4</i>	1ª reação MSP4AP5 (ATGAATTACAGAGAATTGCTTGTAGG) MSP4AP3 (TTAATTGAAAGCAAATCTTGCTCCTATG)	849	94°C por 5 minutos; 29 ciclos de: 92°C por 1 min., 54°C por 1min., 72 °C por 1min. e 30s e 72 °C por 8 min.	de la Fuente et al. (2005)
	2ª reação msp4f (CTATTGGYGGNGCYAGAGT) msp4r (GTTTCATCGAAAATTCCGTGGTA)	381		Bown et al. (2007)
<i>msp2/p44</i>	msp2-3F (CCAGCGTTTAGCAAGATAAGAG) msp2-3R (GCCCAGTAACATCATAAGC)	334	94°C por 5 minutos; 29 ciclos de: 94°C por 30s, 64°C por 30s, 68 °C por 2min. e 30s e 68 °C por 5 min	Zeidner et al. (2000)

Os produtos amplificados dos ensaios de PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1%, corados com GelRed™ (Biotium, Fremont, CA, USA) em tampão de corrida TAE 0,5X (TRIS 400 mM, Ácido Acético 1% e EDTA 20 mM). Para determinação do tamanho em pares de bases (pb) dos produtos amplificados de interesse, utilizou-se um marcador de peso molecular de 1kb DNA Ladder (Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos). Os resultados foram visualizados e analisados através de um transiluminador de luz ultravioleta.

## Análise estatística

Foi utilizado teste qui-quadrado para determinar se as variáveis individuais (sexo, idade, bioma, tratamento acaricida e presença de carrapatos) estavam associadas à infecção por *T. equi*, *B. caballi* e *A. phagocytophilum*. Odds ratio (OR), intervalo de confiança de 95% e valores de P foram calculados separadamente para cada variável. Resultados foram considerados significativamente diferentes quando  $P < 0,05$ . Os dados foram compilados e analisados no software Epi Info™ (versão 7.1.5, CDC).

## Resultados

Foram obtidas amostras de sangue de 210 equinos, onde 15,7% (33) destes apresentaram infestação por carrapatos. Um total de 179 exemplares de carrapatos foram coletados, sendo a maior parte pertencente a espécie *D. nitens* (162/90,5%), seguida por *Rhipicephalus (B.) microplus* (13/7,2%) e *Amblyomma sculptum* (4/2,2%). Casos de infestações simples e mistas foram observados, conforme apresentado na tabela 2.

Tabela 2. Infestação simples e mista por carrapatos em equinos de áreas do Cerrado e de transição (Amazônia/Cerrado) no Maranhão, Nordeste do Brasil.

Ectoparasitos	Áreas		
	Cerrado	Área de transição	Total
	% (n/total)	% (n/total)	% (n/total)
<i>Dermacentor nitens</i>	14,1 (22/156)	7,4 (4/54)	12,3 (26/210)
<i>Rhipicephalus microplus</i>	0,64 (1/156)	0	0,47 (1/210)
<i>Dermacentor nitens/Rhipicephalus (B.) microplus</i>	1,9 (3/156)	1,8 (1/54)	1,9 (4/210)
<i>Dermacentor nitens/Amblyomma sculptum/Rhipicephalus (B.) microplus</i>	1,2 (2/156)	0	0,95 (2/210)
Total	17,9 (28/156)	9,2 (5/54)	15,7 (33/210)

n, número

Todos os esfregaços sanguíneos foram negativos para a presença dos patógenos pesquisados. As amostras submetidas à PCR para o gene GAPDH tiveram DNA amplificado, validando o processo de extração.

Nas análises moleculares referentes aos piroplasmídeos, 71,4% (150) dos animais foram positivos para *T. equi*, enquanto que 15,7% (33) foram positivos para *B.*

*caballi*. Co-infecção entre estes agentes foi observada em 12,3% (26) dos animais. Em relação a *A. phagocytophilum*, 8,1% (17) e 4,7% (10) dos animais foram positivos para os genes *msp4* e *msp2*, respectivamente.

As análises das variáveis individuais e sua relação com infecções por *T. equi*, *B. caballi* e *A. phagocytophilum* estão dispostas nas tabelas 3, 4 e 5, respectivamente. Não foram verificadas diferenças significativas ( $P < 0.05$ ) entre as variáveis analisadas, com exceção das variáveis bioma e tratamento acaricida ( $P < 0.05$ ), as quais estavam associadas a maiores chances de infecção por *B. caballi*.

Tabela 3. Distribuição das variáveis: sexo, idade, bioma, tratamento acaricida e presença de carrapatos em equinos positivos para *T. equi* na área de Cerrado e transição Amazônia-Cerrado, Maranhão, Brasil.

Variable		<i>T. equi</i>				
		+/ n	(%)	OR	95% CI	<i>P</i> value
Sex	Female	58/80	70.8	0.918	0.494-1.706	0.788
	Male	92/130	72.5			
Age	< 5	92/130	72.5	0.918	0.494-1.706	0.788
	5-10	58/80	70.8			
Biome	Cerrado	116/156	74.4	0.587	0.303-1.130	0.110
	Amazon-Cerrado Transition	34/54	63			
Acaricidal treatment	Yes	37/53	69.8	0.900	0.455-1.781	0.763
	No	113/157	72			
Presence of ticks	Yes	20/34	58.8	0.505	0.236-1.082	0.075
	No	130/176	73.8			

+, Number of positive animals; n, number of samples; 95% CI, 95% confidence interval.

Tabela 4. Distribuição das variáveis sexo, idade, bioma, tratamento acaricida e presença de carrapatos em equinos positivos para *B. caballi* na área de Cerrado e transição Amazônia-Cerrado, Maranhão, Brasil.

Variable	<i>B. caballi</i>					
	+ / n	(%)	OR	95% CI	<i>P</i> value	
Sex	Female	14/80	17.5	0.806	0.379-1.716	0.577
	Male	19/130	14.6			
Age	< 5	19/130	14.6	0.806	0.379-1.716	0.577
	5-10	14/80	17.5			
Biome	Cerrado	31/156	19.9	0.155	0.035-0.671	0.004
	Amazon-Cerrado	2/54	3.7			
	Transition					
Acaricidal treatment	Yes	2/53	3.8	0.159	0.036-0.690	0.005
	No	31/157	19.7			
Presence of ticks	Yes	9/34	26.5	2.280	0.950-5.470	0.059
	No	24/152	13.6			

+, Number of positive animals; n, number of samples; 95% CI, 95% confidence interval.

Tabela 5. Distribuição das variáveis: sexo, idade, bioma, tratamento acaricida e presença de carrapatos em equinos positivos para *A. phagocytophilum* na área de Cerrado e transição Amazônia-Cerrado, Maranhão, Brasil.

Variable	<i>A. phagocytophilum</i>					
	+ / n	(%)	OR	95% CI	<i>P</i> value	
Sex	Female	8/80	6.92	0.669	0.247-1.812	0.427
	Male	9/130	10			
Age	< 5	9/130	10	0.669	0.247-1.812	0.427
	5-10	8/80	6.92			
Biome	Cerrado	13/156	8.33	1.136	0.354-3.646	0.829
	Amazon-Cerrado	4/54	7.41			
	Transition					
Acaricidal treatment	Yes	2/53	3.77	0.371	0.082-1.680	0.182
	No	15/157	9.55			
Presence of ticks	Yes	2/34	5.88	0.733	0.159-3.362	0.688
	No	15/176	7.85			

+, Number of positive animals; n, number of samples; 95% CI, 95% confidence interval.

## Discussão

Os resultados do presente estudo foram semelhantes aos obtidos em outros países, como Espanha, Itália, Romênia, Irã, Cuba e Egito, onde através de técnicas moleculares foram diagnosticados um quantitativo maior de amostras positivas para *T. equi* em relação à *B. caballi* (Abedi et al., 2014; Gallusová et al., 2014; Del Pino et al., 2016; Mahmoud et al., 2016; Díaz-Sánchez et al., 2018; Camino et al., 2019). Resultado contrário foi obtido por Munkhjargal et al. (2013) na Mongólia, onde utilizando-se nPCR, verificou-se que 42,4% dos animais foram positivos para *B. caballi* e 6,4% para *T. equi*.

Uma maior ocorrência de *T. equi* em relação a *B. caballi* também foi observada em outros estudos realizados no Brasil, mais precisamente nos estados de Mato Grosso, Bahia, Paraná e Maranhão (Nogueira et al., 2017; Schein et al., 2018; Costa et al., 2019; Valente et al., 2019). No entanto, Braga et al. (2017) ao investigarem a diversidade genética de espécies de piroplasmídeos em equídeos na Ilha de São Luís, Maranhão, verificaram uma maior proporção de animais positivos para *B. caballi* (55,4%) em relação à *T. equi* 21,6%.

Segundo Rüegg et al. (2008), infecções por *T. equi* tendem a persistir no hospedeiro no decorrer de sua vida, enquanto que infecções por *B. caballi* tem um período de duração mais restrito. Outra característica de *T. equi* é sua capacidade de resistir à maior parte dos fármacos utilizados para terapia de PE (Rothschild, 2013), o que pode favorecer sua maior prevalência em equinos quando comparada a *B. caballi*. Ainda assim, tais fatores não impedem que em algumas localidades possa existir uma maior predominância de equinos infectados por *B. caballi* em relação à *T. equi*, mesmo que isto seja menos habitual.

Todos os animais co-infectados (12,3%) no presente estudo pertenciam a área de Cerrado. Ausência de co-infecção na área de transição Amazônia-Cerrado (São Francisco do Brejão) pode estar associado ao menor número de animais amostrados neste território. A maior parte dos equinos infectados por *B. caballi* estavam co-infectados com *T. equi*, o que pode estar associado ao alto número de animais positivos para *T. equi* (71,4%).

Nenhum animal positivo apresentou sinais clínicos compatíveis com PE, sendo que todos apresentaram-se assintomáticos no momento da coleta. A constante exposição aos vetores e, conseqüentemente aos piroplasmídeos, permite que os animais adquiram imunidade a ponto de não desenvolverem doença clínica. Esta interação ao longo do tempo é importante para que determinadas localidades sejam classificadas como áreas de estabilidade enzoótica.

Segundo Onyiche et al. (2019), o diagnóstico de patógenos através de PCR apresenta mais eficiência comparado a outras técnicas, apresentando maior sensibilidade, sendo eficaz no diagnóstico de animais com PE crônica. É importante enfatizar que equinos cronicamente infectados podem transmitir piroplasmídeos aos carrapatos vetores quando estes realizam repasto sanguíneo, permitindo a manutenção destes patógenos numa determinada localidade e, conseqüentemente na sua propagação para outras regiões, quando estes animais são transportados.

As espécies de carrapatos identificadas foram *D. nitens*, *R. (B.) microplus* e *A. sculptum*, sendo a última restrita ao Cerrado, onde sua presença vem sendo associada a este bioma (Szabó et al., 2007; Martins, 2014). Não foram observadas espécies do complexo *Amblyomma cajennense* na área de transição, embora *Amblyomma cajennense sensu stricto* tenha sido relatado por outros autores em áreas de transição Amazônia-Cerrado (Martins, 2014; Nava et al., 2014). Todas as espécies de carrapatos coletadas dos equinos amostrados estão associadas à ocorrência de PE, sendo as mesmas identificadas em outros estudos realizados no Brasil (Battsetseg et al., 2002; Kerber et al., 2009; Campos et al., 2019; Costa et al., 2019; Minervino et al., 2019; Valente et al., 2019).

A taxa de infestação por carrapatos (15,7%) nos equinos amostrados foi inferior às taxas encontradas na Paraíba (47%), Rio de Janeiro (81,6%), Paraná (24,27%), Pará (63,5%) e Mato Grosso do Sul (51,7%), sendo superior às taxas verificadas em Pernambuco (4,3%) e Rio Grande do Sul (0%) (Ferreira et al., 2016; Vieira et al., 2018; Campos et al., 2019; Dos Santos et al., 2019; Souza et al., 2019; Minervino et al., 2019; Valente et al., 2019).

Fatores como clima e vegetação podem favorecer uma maior ou menor incidência de carrapatos em determinada região, influenciando em sua dinâmica sazonal. No decorrer deste estudo, as coletas concentraram-se no período de estiagem, no qual verifica-se uma menor incidência de estágios adultos das espécies *A. sculptum* e *D. nitens*. Tais espécies são mais abundantes nos meses mais húmidos e chuvosos (Labruna et al., 2002). Apesar disto, é importante ressaltar a necessidade de pesquisas sobre a dinâmica sazonal destas espécies de carrapatos na região Nordeste, uma vez que diferentes regiões e, até mesmo diferentes localidades numa mesma região apresentam características geográficas e climáticas próprias.

Equinos são considerados hospedeiros secundários de *R. (B.) microplus*, sendo os bovinos seus hospedeiros primários. A ocorrência de parasitismo desta espécie de carrapato em equinos geralmente está associada a presença de bovinos ocupando o mesmo território (Labruna et al., 2001; Labruna et al., 2002). Grande parte dos equinos amostrados era utilizada no manejo do gado em fazendas, sendo um fator preponderante para que alguns animais estivessem infestados por *R. (B.) microplus*.

Nas análises moleculares referentes à *A. phagocytophilum*, os percentuais de equinos positivos para os genes *msp4* (8,1%) e *msp2* (4,7%) estiveram abaixo dos percentuais verificados no Paquistão (10,67%), Tunísia (13%), Itália (8,14%),

Guatemala (13%) e Chile (13,6%) (Teglas et al., 2005; Passamonti et al., 2010; M'Ghirbi et al., 2012; Saleem et al., 2018b; Hurtado et al., 2020). No entanto, foram superiores ao observado por Seo et al. (2018) na Coreia do Sul (0,2%), e Slivinska et al. (2016) na Ucrânia (0%), Polônia (2,63%) e Eslováquia (2,56%), onde investigou-se a presença de *A. phagocytophilum* nestes países por meio de nPCR.

No Brasil, observou-se menores percentuais em equinos infectados nos estados do Rio de Janeiro (1%), Pará (2,58%) e Minas Gerais (1,94%) (Everton, 2014; Prado et al., 2018; Dos Santos et al., 2019). No Mato Grosso do Sul, Campos et al. (2021) ao pesquisarem agentes zoonóticos transmitidos por carrapatos em equinos utilizando Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real (qPCR), não conseguiram diagnosticar amostras positivas para *A. phagocytophilum*, embora tenha sido constatada a presença de títulos de anticorpos em 31,6% dos animais por Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Na microrregião da Baixada Maranhense, estado do Maranhão, também não foram identificados animais positivos através de PCR, porém foram detectadas amostras positivas por RIFI (11,34%) (Nogueira et al., 2017). A presença de anticorpos nos animais indica uma exposição prévia, embora não tenha sido detectado DNA de *A. phagocytophilum* em nenhum dos carrapatos coletados em tais estudos.

No mundo, carrapatos dos gêneros *Ixodes* spp., *Dermacentor* spp., *Rhipicephalus* spp., *Hyalomma* spp. e *Haemaphysalis* spp., atuam como vetores de *A. phagocytophilum*, dependendo de sua distribuição geográfica (Dzięgiel et al., 2013). No Brasil ainda não se sabe qual o vetor responsável por sua transmissão (Dos Santos et al., 2019), apesar do DNA ter sido detectado por qPCR num exemplar de *A. sculptum* e, em exemplares de *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* coletados de cães no estado do Rio de Janeiro. Ainda que o DNA de *A. phagocytophilum* tenha sido detectado nestes vetores, as amostras de sangue dos cães infestados testaram negativas por qPCR (Santos et al., 2013).

Mesmo não bem esclarecido quais vetores estão envolvidos na transmissão de *A. phagocytophilum* no Brasil, é sabido que este patógeno infecta uma variedade de espécies animais pelo mundo, tanto domésticas quanto silvestres, também infectando pessoas (De La Fuente et al., 2005; Stuen, 2007; Carrade et al., 2009; Rikihisa, 2011; Mongrue et al., 2017). Roedores, cervídeos e aves podem atuar como reservatórios, favorecendo a manutenção do agente no meio ambiente (De La Fuente et al., 2005; Thomas et al., 2009; Nieto et al., 2010; Machado et al., 2012).

Co-infecção entre equinos positivos para o gene *msp4* e piroplasmídeos foi observada em 4,2% (9/210) dos animais, enquanto que em equinos positivos para o gene *msp2* e piroplasmídeos foi de 2,3% (5/210). Não foi observada a presença de piroplasmas nos esfregaços sanguíneos, assim como mórulas de *A. phagocytophilum*. Geralmente baixas parasitemias tendem a ocorrer nas fases crônicas da AGE e PE, levando a resultados falso-negativos. Segundo Onyiche et al. (2019), baixa carga parasitária pode ocorrer mesmo na fase aguda da PE, assim como em infecções mais severas (Wise et al., 2014), enquanto que mórulas de *A. phagocytophilum* são detectáveis em esfregaços sanguíneos em período restrito na fase aguda da AGE (Butler et al., 2008).

Os resultados obtidos neste trabalho, associados a dados prévios de outros estudos no Maranhão, demonstram que *T. equi*, *B. caballi* e *A. phagocytophilum* infectam equinos tanto no Cerrado quanto na Amazônia maranhense, havendo co-infecção entre estes patógenos. A presença de animais positivos para *A. phagocytophilum* torna necessária a inclusão da AGE como diagnóstico diferencial de PE no estado.

### **Agradecimentos**

A Profa. Dra. Júlia Angélica Gomes da Silveira e a doutoranda Andreina de Carvalho Araújo pelo suporte técnico-científico no Laboratório de Protozoologia Veterinária do Instituto de Ciências Biológicas – ICB, da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. Os autores gostariam de agradecer a Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) pelo suporte financeiro. Agradecemos também a Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) pela bolsa de mestrado do pós-graduando Leandro Macedo Miranda.

## Referências

- Abedi V, Razmi G, Seifi H, Naghibi A. Molecular and serological detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infection in horses and ixodid ticks in Iran. *Ticks Tick Borne Dis* 2014; 5(3): 239-244. [http:// dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.11.008](http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.11.008).
- Baldani CD, Nakaghi AC, Machado RZ. Occurrence of *Theileria equi* in horses raised in the Jaboticabal microregion, São Paulo State, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2010; 19(4): 228-232. [http://dx.doi.org/10.1590/ S1984-29612010000400007](http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612010000400007).
- Barros-Battesti DM, Arzua M, Bechara GH. Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. 1 ed. São Paulo: VOX/ICTTD-3/BUTANTAN, 2006. p. 223.
- Battsetseg B, Lucero S, Xuan X, Claveria FG, Inoue N, Alhassan A, et al. Detection of natural infection of *Boophilus microplus* with *Babesia equi* and *Babesia caballi* in Brazilian horses using nested polymerase chain reaction. *Vet Parasitol* 2002; 107(4): 351-357. [http://dx.doi.org/10.1016/ S0304-4017\(02\)00131-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00131-0).
- Bjöersdorff A, Bagert B, Massung RF, Gusa A, Eliasson, I. Isolation and characterization of two European strains of *Ehrlichia phagocytophila* of equine origin. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9(2): 341-343. <http://dx.doi.org/10.1128/CDLI.9.2.341-343.2002>.
- Bown KJ, Lambin X, Ogden N H, Petrovec M, Shaw S E, Woldehiwet Z, et al. High-resolution genetic fingerprinting of European strains of *Anaplasma phagocytophilum* by use of multilocus variable-number tandem-repeat analysis. *J Clin Microbiol*, 2007; 45(6): 1771-1776. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00365-07>.
- Braga MSCO, Costa FN, Gomes DRM, Xavier DR, André MR, Gonçalves LR, et al. Genetic diversity of piroplasmids species in equids from island of São Luís, northeastern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2017; 26(3): 331-339. <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-29612017046>.

Butler CM, Nijhof AM, Jongejan F, Van der Kolk JH. Anaplasma phagocytophilum infection in horses in the Netherlands. *Veterinary record* 2008; 162(7): 216-217. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.162.7.216>.

Camino E, Dorrego A, Carvajal KA, Buendia-Andres A, de Juan L, Dominguez Cruz-Lopez F. Serological, molecular and hematological diagnosis in horses with clinical suspicion of equine piroplasmiasis: Pooling strengths. *Vet Parasitol* 2019; 275: 108928. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.108928>.

Campos JBV, André MR, Gonçalves LR, Freschi CR, Santos FM, Oliveira CE, et al. Assessment of equine piroplasmids in the Nhecolândia sub-region of Brazilian Pantanal wetland using serological, parasitological, molecular, and hematological approaches. *Ticks Tick Borne Dis* 2019; 10(3): 714-721. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.03.002>.

Campos JBV, Martins FS, De Oliveira CE, Taveira AA, De Oliveira JR, Gonçalves LR, et al. Tick-borne zoonotic agents infecting horses from an urban area in Midwestern Brazil: epidemiological and hematological features. *Trop Anim Health Prod* 2021; 53(5): 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11250-021-02887-w>

Carrade DD, Foley JE, Borjesson, DL, Sykes, JE. Canine granulocytic anaplasmosis: a review. *J Vet Intern Med* 2009; 23(6): 1129-1141. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0384.x>.

Costa SCL, Freitas, JDS, Silva, AND, Lacerda, LC Cruz, RDS, Carvalho, FS et al. 2019. Frequency and factors associated with *Theileria equi*, *Babesia caballi* and *Trypanosoma evansi* in equids from Bahia (Northeast Brazil). *Rev Bras Parasitol Vet* 2019; 28(1): 47-58. <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-296120180090>.

De La Fuente J, Naranjo V, Ruiz-Fons F, Höfle U, Fernández De Mera IG, Villanúa D, et al. Potential vertebrate reservoir hosts and invertebrate vectors of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum* in central Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2005; 5(4): 390-401. <https://doi.org/10.1089/vbz.2005.5.390>.

Del Pino LEB, Roberto N, Vincenzo V, Francesca I, Antonella C, Luca AG, et al. *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses in Central-Southern Italy: Sero-molecular survey and associated risk factors. *Ticks Tick Borne Dis* 2016; 7(3): 462-469. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.01.011>.

Díaz-Sánchez AA, Pires MS, Estrada CY, Cañizares EV, del Castillo Domínguez SL, Cabezas-Cruz A, et al. First molecular evidence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses in Cuba. *Parasitol Res* 2018; 117(10): 3109-3118. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6005-5>.

dos Santos TM, Roier ECR, Pires MS, Santos HA, Vilela JAR, Peckle M, et al. Molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Theileria equi* coinfection in horses from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Anim Sci* 2019; 7: 100055. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2019.100055>.

Dzięgiel B, Adaszek Ł, Kalinowski M, Winiarczyk S. Equine granulocytic anaplasmosis. *Res Vet Sci* 2013; 95(2): 316-320. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.05.010>.

Everton, EB. *Diagnóstico e Epidemiologia Molecular da Anaplasmosose e Theileriose Equina no Estado do Pará* [Dissertação]. Pará: Universidade Federal do Pará; 2014.

Ferreira EP, Vidotto O, Almeida JC, Ribeiro LPS, Borges MV, Pequeno WHC, et al. Serological and molecular detection of *Theileria equi* in sport horses of northeastern Brazil. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2016; 47: 72-76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2016.06.004>.

Gallusová M, Qablan MA, D'Amico G, Oborník M, Petrželková KJ, Mihalca AD, et al. Piroplasms in feral and domestic equines in rural areas of the Danube Delta, Romania, with survey of dogs as a possible reservoir. *Vet Parasitol* 2014; 206(3-4): 287-292. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.10.018>.

Heim A, Passos LM, Ribeiro MF, Costa LM Jr, Bastos CV, Cabral DD, et al. Detection and molecular characterization of *Babesia caballi* and *Theileria equi* isolates from

endemic areas of Brazil. *Parasitol Res* 2007; 102(1): 63-68. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-007-0726-1>.

Hurtado C, Torres R, Pérez-Macchi S, Sagredo K, Uberti B, de Souza Zanatto DC, Müller A. Serological and molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Thoroughbred horses from Chilean racecourses. *Ticks Tick Borne Dis* 2020, 101441. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101441>.

Ikadai H, Xuan X, Igarashi I, Tanaka S, Kanemaru T, Nagasawa H, et al. Cloning and expression of a 48-kilodalton *Babesia caballi* merozoite rhoptry protein and potential use of the recombinant antigen in an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1999; 37(11): 3475-3480.

Kerber CE, Labruna MB, Ferreira F, de Waal DT, Knowles DP, Gennari SM. Prevalence of equine piroplasmiasis and its association with tick infestation in the State of São Paulo, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2009; 18(4): 1-8. <http://dx.doi.org/10.4322/rbpv.01804001>.

Labruna MB, Kerber CE, Ferreira F, Faccini JLH, De Waal DT, Gennari SM. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the state of São Paulo, Brazil. *Vet Parasitol* 2001; 97(1): 1-14. [http://dx.doi.org/10.1016/s0304-4017\(01\)00387-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0304-4017(01)00387-9).

Labruna MB, Kasai N, Ferreira F, Faccini JL, Gennari SM. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. *Vet Parasitol* 2002; 105(1): 65-77. [http://dx.doi.org/10.1016/s0304-4017\(01\)00649-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0304-4017(01)00649-5).

Machado RZ, Andre MR, Werther K, Sousa E, Gavioli FA, Junior JFRA. Migratory and Carnivorous Birds in Brazil: Reservoirs for *Anaplasma* and *Ehrlichia* Species? *Vector Borne Zoonotic Dis* 2012; 12(8): 705-708. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2011.0803>.

Mahmoud MS, El-Ezz NTA, Abdel-Shafy S, Nassar SA, El Namaky AH, Khalil WK, et al. Assessment of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in equine populations in Egypt by molecular, serological and hematological approaches. *Parasit Vectors* 2016; 9(1): 260. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1539-9>.

Martins TF. *Estudo do complexo Amblyomma cajennense no Brasil* [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2014.

McQuiston JH, McCall CL, Nicholson WL. Ehrlichiosis and related infections. *J Am Vet Med Assoc* 2003; 223(12): 1750-1756. <https://doi.org/10.2460/javma.2003.223.1750>.

M'ghirbi Y, Yaïch H, Ghorbel A, Bouattour A. *Anaplasma phagocytophilum* in horses and ticks in Tunisia. *Parasit Vectors* 2012; 5(1): 180. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-5-180>.

Minervino AHH, Torres AC, Moreira TR, Vinholte BP, Sampaio, BM, Bianchi. Factors associated with the prevalence of antibodies against *Theileria equi* in equids of Western Pará, Brazil. *Transbound Emerg Dis* 2019. <https://doi.org/10.1111/tbed.13268>.

Mongruel ACB, Benevenuto JL, Ikeda P, André MR, Machado RZ, Carrasco ADOT, et al. Detection of *Anaplasma sp.* phylogenetically related to *A. phagocytophilum* in a free-living bird in Brazil. *Braz J Vet Parasitol* 2017; 26(4): 505-510. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612017042>.

Munkhjargal T, Sivakumar T, Battsetseg B, Nyamjargal T, Aboulaila M, Purevtseren B, et al. Prevalence and genetic diversity of equine piroplasms in Tov province, Mongolia. *Infect Genet Evol* 2013; 16: 178-185. PMID:23416256. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.02.005>.

Nava S, Beati, L, Labruna MB, Cáceres AG, Mangold AJ, Guglielmone AA. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* () with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae n. sp.*, *Amblyomma interandinum n. sp.* and *Amblyomma patinoi n. sp.*, and reinstatement of *Amblyomma mixtum*, and *Amblyomma sculptum* (Ixodida: Ixodidae). *Ticks Tick Borne Dis* 2014; 5(3): 252-276. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.11.004>.

Nicolaiewsky TB, Richter MF, Lunge VR, Cunha CW, Delagostin O, Ikuta N, et al. Detection of *Babesia equi* (Laveran, 1901) by nested polymerase chain reaction. *Vet*

*Parasitol* 2001; 101(1): 9-21. PMID:11587829. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00471-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00471-X).

Nieto NC, Madigan JE, Foley JE. The dusky-footed woodrat (*Neotoma fuscipes*) is susceptible to infection by *Anaplasma phagocytophilum* originating from woodrats, horses, and dogs. *J Wildl Dis* 2010; 46(3): 810-817. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-46.3.810>.

Nogueira RMS, Silva AB, Sato TP, Sá JC, Santos ACG, Amorim Filho EF, et al. Molecular and serological detection of *Theileria equi*, *Babesia caballi* and *Anaplasma phagocytophilum* in horses and ticks in Maranhão, Brazil. *Pesq Vet Bras* 2017; 37(12): 1416-1422. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-736x2017001200010>.

Madigan JE, Pusterla N. Equine granulocytic anaplasmosis (formerly ehrlichiosis). In: *Current Therapy in Equine Medicine*. 7th ed. St. Louis: Elsevier; 2014. p. 193-195.

Onyiche TE, Sukanuma K, Igarashi I, Yokoyama N, Xuan X, Thekiso, O. A review on equine piroplasmiasis: epidemiology, vector ecology, risk factors, host immunity, diagnosis and control. *Int J Environ Res Public Health* 2019; 16(10): 1736. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph16101736>.

Prado LG, Palhares MS, Bastos CV, Silveira JAGD, Ribeiro ÁAR, Miranda ALS, et al. Detecção direta e evidência da exposição a *Anaplasma phagocytophilum* em equinos de dois haras em Minas Gerais, Brasil. *Arq Inst Biol* 2018; 85. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000902017>.

Passamonti F, Fabrizia V, Katia C, Stefano C, Giacomo C, Luisa MM, et al. *Anaplasma phagocytophilum* in horses and ticks: a preliminary survey of Central Italy. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 2010; 33(1): 73-83. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2008.08.002>.

Peckle M, Pires MS, Dos Santos, TM, Roier EC, Da Silva, CB, Vilela JA, et al. Molecular epidemiology of *Theileria equi* in horses and their association with possible

tick vectors in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitol res* 2013; 112(5): 2017-2025. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3360-0>.

Pusterla N, Madigan, JE. Equine granulocytic anaplasmosis. *J Equine Vet Sci* 2013; 33(7): 493-496. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.03.188>.

Rikihisa Y. Mechanisms of obligatory intracellular infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Clin Microbio Rev* 2011; 24(3): 469-489. <https://doi.org/10.1128/CMR.00064-10>.

Rolim MF, Oliveira FCR, Graça FAZ, Brasil FC. Serological evidence of exposure to *Anaplasma phagocytophilum* in horses from the Rio de Janeiro state mounted police bred in the urban zone. *Ciênc Anim Bras* 2015; 16: 377-387. <https://doi.org/10.1590/1089-6891v16i319865>.

Rosales R, Rangel-Rivas A, Escalona A, Jordan LS, Gonzatti MI, Aso PM, et al. Detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in Venezuelan horses using Competitive-Inhibition ELISA and PCR. *Vet Parasitol* 2013; 196(1-2): 37-43. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.02.004>.

Rothschild CM. Equine piroplasmiasis. *J Equine Vet Sci* 2013; 33(7): 497-508. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2013.03.189>.

Rüegg SR, Heinzmann D, Barbour AD, Torgerson PR. Estimation of the transmission dynamics of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses. *Parasitology* 2008; 135(05): 555-565. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182008004204>.

Saleem S, Ijaz M, Farooqi SH, Ghaffar A, Ali A, Iqbal K, et al. Equine granulocytic anaplasmosis 28 years later. *Microb Pathog* 2018a; 119: 1-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2018.04.001>.

Saleem S, Ijaz M, Farooqi SH, Rashid MI, Khan A, Masud A, et al. First molecular evidence of equine granulocytic anaplasmosis in Pakistan. *Acta Trop* 2018b; 180: 18-25. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.12.032>.

Salim B, Bakheit MA, Kamau, J, Sugimoto, C. Current status of equine piroplasmosis in the Sudan. *Infect Genet Evol* 2013, 16: 191-199. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.02.008>.

Salvagni CA, Dagnone AS, Gomes TS, Mota JS, Andrade GM, Baldani CD, et al. Serologic evidence of equine granulocytic anaplasmosis in horses from central West Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2010; 19(3): 135-140. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612010000300002>.

Santos HA, Thomé SMG, Baldani CD, Silva CB, Peixoto MP, Pires MS, et al. Molecular epidemiology of the emerging zoonosis agent *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) in dogs and ixodid ticks in Brazil. *Parasit Vectors* 2013; 6(1): 348. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-6-348>.

Schein FB, Maia MO, Witter R, Marcili A, Camargo LM, Dutra V, et al. Molecular survey and genetic diversity of piroplasmids in equids from Midwestern Brazil. *Braz J Vet Parasitol* 2018; 27(4): 464-472. <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-296120180048>.

Scoles GA, Ueti MW. Vector ecology of equine piroplasmosis. *Annu Rev Entomol* 2015; 60(1): 561-580. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-021110>.

Seo MG, Yun SH, Choi SK, Cho GJ, Park, YS, Cho KH, et al. Molecular and phylogenetic analysis of equine piroplasms in the Republic of Korea. *Res Vet Sci* 2013; 94(3): 579-583. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.01.014>.

Seo MG, Ouh I O, Choi E, Kwon OD, Kwak D. Molecular detection and phylogenetic analysis of *Anaplasma phagocytophilum* in horses in Korea. *Korean J Parasitol* 2018; 56(6): 559. <https://doi.org/10.3347/kjp.2018.56.6.559>.

Slivinska K, Vichová B, Werszko J, Szewczyk T, Wróblewski Z, Pet'ko B, et al. Molecular surveillance of *Theileria equi* and *Anaplasma phagocytophilum* infections in horses from Ukraine, Poland and Slovakia. *Vet Parasitol* 2016; 215: 35-37. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.10.025>.

Stuen S. *Anaplasma phagocytophilum* the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. *Vet Res Commun* 2007; 31(1): 79-84. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00064>.

Szabó MPJ, Olegário MMM, Santos ALQ. Tick fauna from two locations in the Brazilian savannah. *Exp Appl Acarol* 2007; 43(1): 73. <https://doi.org/10.1007/s10493-007-9096-8>.

Teglas M, Matern E, Lein S, Foley P, Mahan S M, Foley J. Ticks and tick-borne disease in Guatemalan cattle and horses. *Vet Parasitol* 2005; 131(1-2): 119-127. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.04.033>.

Thomas R J, Dumler JS, Carlyon JA. Current management of human granulocytic anaplasmosis, human monocytic ehrlichiosis and *Ehrlichia ewingii* ehrlichiosis. *Expert Rev Anti Infect* 2009; 7(6): 709-722. <https://doi.org/10.1586/eri.09.44>.

Valente JD, Mongruel AC, Machado CA, Chiyo L, Leandro AS, Britto AS, et al. Tick-borne pathogens in carthorses from Foz do Iguacu City, Paraná State, southern Brazil: A tri-border area of Brazil, Paraguay and Argentina. *Vet Parasitol* 2019; 273: 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.08.008>.

Veronesi F, Passamonti F, Moretti A, Morganti G, Vardi DM, Laus F, et al. Evaluation of the performance of a rapid enzyme-linked immunosorbent assay in the detection of *Anaplasma phagocytophilum* antibodies in horses. *Vector Borne and Zoonotic Dis* 2010; 14(5): 317-323. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2013.1424>.

Vieira MIB, Costa MM, de Oliveira MT, Gonçalves LR, André MR, Machado RZ. Serological detection and molecular characterization of piroplasmids in equids in Brazil. *Acta Trop*; 2018 179: 81-87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.12.028>.

Wise LN, Kappmeyer LS, Mealey RH, Knowles DP. Review of equine piroplasmosis. *J Vet Intern Med* 2013; 27(6): 1334-1346. <http://dx.doi.org/10.1111/jvim.12168>.

Wise LN, Pelzel-McCluskey AM, Mealey RH, Knowles DP. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2014; 30(3): 677-693. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cveq.2014.08.008>.

Woldehiwet Z. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet parasitol* 2010; 167(2-4): 108-122. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.013>.

Zeidner NS, Burkot TR, Massung R, Nicholson WL, Dolan MC, Rutherford JS, et al. 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. *J Infect Dis* 2000; 182(2): 616-619. <http://dx.doi.org/10.1086/315715>.