

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**  
**(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

**DISSERTAÇÃO**

**IMPORTÂNCIA DE *ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM*, *BABESIA CABALLI* E *THEILERIA EQUI* COMO AGENTES ETIOLÓGICOS ASSOCIADOS A EQUINOS COM SUSPEITA CLÍNICA DE PIROPLASMOSE NA MESORREGIÃO METROPOLITANA DO RIO DE JANEIRO – BRASIL**

**Celina Vieira de Albuquerque**

**2023**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA  
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

**IMPORTÂNCIA DE *ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM*, *BABESIA CABALLI* E *THEILERIA EQUI* COMO AGENTES ETIOLÓGICOS ASSOCIADOS A EQUINOS COM SUSPEITA CLÍNICA DE PIROPLASMOSE NA MESORREGIÃO METROPOLITANA DO RIO DE JANEIRO – BRASIL**

**CELINA VIEIRA DE ALBUQUERQUE**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Paulo de Tarso Landgraf Botteon**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Ciências Clínicas

Seropédica, RJ  
Julho de 2023

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A345i Albuquerque, Celina Vieira de, 1991-  
Importância de Anaplasma phagocytophilum, Babesia  
caballi e Theileria equi como agentes etiológicos  
associados a equinos com suspeita clínica de  
piroplasmose na mesorregião metropolitana do Rio de  
Janeiro - Brasil / Celina Vieira de Albuquerque. -  
Seropédica, 2023.  
79 f.: il.

Orientador: Paulo de Tarso Landgraf Botteon.  
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária, 2023.

1. Anaplasmosse granulocítica equina. 2.  
Piroplasmose equina. 3. Brasil. I. Botteon, Paulo de  
Tarso Landgraf, 1964-, orient. II Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós  
Graduação em Medicina Veterinária III. Título.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**CELINA VIEIRA DE ALBUQUERQUE**

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas), Área de Concentração em Ciências Clínicas.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 07/08/2023

---

Paulo de Tarso Landgraf Botteon. Dr. UFRRJ  
(Orientador)

---

Huarrisson Azevedo Santos. Dr. UFRRJ

---

Cristiane Divan Baldani. Dra. UFRRJ

---

Julia Angélica Gonçalves da Silveira. Dra. UFMG.

---

Camila de Valgas e Bastos Castro. Dra. UFMG



Emitido em 2023

TERMO Nº 944/2023 - PPGMV (12.28.01.00.00.00.51)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

*(Assinado digitalmente em 12/09/2023 12:07)*

CRISTIANE DIVAN BALDANI  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DeptMCV (12.28.01.00.00.00.53)  
Matrícula: ###724#0

*(Assinado digitalmente em 23/08/2023 08:28)*

HUARRISSON AZEVEDO SANTOS  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DESP (12.28.01.00.00.00.52)  
Matrícula: ###014#2

*(Assinado digitalmente em 30/08/2023 11:04)*

PAULO DE TARSO LANDGRAF BOTTEON  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DeptMCV (12.28.01.00.00.00.53)  
Matrícula: ###816#9

*(Assinado digitalmente em 18/08/2023 14:06)*

CAMILA DE VALGAS E BASTOS CASTRO  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: ###.###.946-##

*(Assinado digitalmente em 18/08/2023 14:37)*

JÚLIA ANGÉLICA GONÇALVES DA SILVEIRA  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: ###.###.996-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrj.br/documentos/> informando seu número: 944, ano: 2023, tipo: TERMO, data de emissão: 18/08/2023 e o código de verificação: 9164c948dd

## RESUMO

ALBUQUERQUE, Celina Vieira de. **Importância de *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia caballi* e *Theileria equi* Como Agentes Etiológicos Associados a Equinos com Suspeita Clínica de Piroplasmose na Mesorregião Metropolitana do Rio de Janeiro – Brasil.** 2023. 69p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Patologia e Ciências Clínicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

A Piroplasmose Equina (PE) e Anaplasmoses Granulocítica Equina (AGE) são enfermidades transmitidas por carrapatos ixodídeos, que acometem equinos em várias regiões do mundo. São causadas pelos protozoários *Babesia caballi*, *Theileria equi* e *Theileria haneyi* e pela bactéria *Anaplasma phagocytophilum*, respectivamente. As duas enfermidades podem se manifestar como condições subclínicas ou agudas, provocando doença febril inespecífica, o que dificulta a diferenciação clínica. No entanto, as abordagens terapêuticas são distintas. Estudos sorológicos e moleculares realizados em cavalos no Brasil evidenciaram a presença de *A. phagocytophilum*, mas a identificação desse agente em equinos com manifestações clínicas no país ainda são poucas, o que coloca em dúvida a sua relevância clínica. Desta forma, objetivou-se com o presente trabalho avaliar a importância de *A. phagocytophilum*, *B. caballi* e *T. equi*, como agentes etiológicos em equinos com manifestações clínicas sugestivas de PE, além de determinar a proporção de pacientes infectados com cada agente e descrever clínico e laboratorialmente os achados obtidos de acordo com o hemopatógeno identificado e, com isso, dar subsídios aos clínicos veterinários para a realização do diagnóstico, que orientará a escolha terapêutica. Amostras de sangue da veia jugular de animais que apresentassem pelo menos três sinais clínicos de PE foram submetidas a análises hematológicas e moleculares (qPCR). Dos 45 animais avaliados com sinais clínicos, em nenhum deles (0%) ocorreu detecção de *A. phagocytophilum*, em cinco (11,2%) foi detectado apenas de *B. caballi*, em 16 (35,5%) apenas de *T. equi*, sete (15,5%) demonstraram a presença dos dois hemoprotozoários e em 17 (37,8%) não houve detecção de DNA de nenhum dos agentes pesquisados. A análise estatística dos dados demonstrou que a PE é significativamente mais importante do que a AGE. Entre os casos de PE, *T. equi* foi o agente etiológico associado a maioria dos casos clínicos. Outras etiologias também podem causar síndromes com sinais inespecíficos em cavalos. Os sinais clínicos e os parâmetros hematológicos tendem a ser semelhantes nas doenças febris inespecíficas. Edema de membros demonstrou ser mais comum nos casos de outra etiologia do que nas infecções por *T. equi* e coinfeções por Piroplasmidas. Hiporexia é mais frequentemente observada nos casos de *B. caballi* do que nas coinfeções por Piroplasmidas e letargia está mais presente nos animais coinfectados pelos dois protozoários do que em outras causas. VCM e HCM também demonstraram tendência a um valor inferior nas coinfeções por Piroplasmidas quando comparada a outras causas. Por fim, AGE não deve ser considerada como uma suspeita principal nos casos de síndrome febril inespecífica na Mesorregião Metropolitana do estado do Rio de Janeiro. Protozoários causadores de PE em infecções simples ou múltiplas são frequentemente encontrados em cavalos com manifestações clínicas, representando um importante diagnóstico diferencial nos casos suspeitos nessa região. Os clínicos veterinários devem se atentar não só aos sinais clínicos e exames hematológicos, mas também ao histórico do animal e à epidemiologia da região para levantar a suspeita diagnóstica. Exames moleculares possibilitam a determinação de um diagnóstico definitivo e devem ser usados sempre que possível, guiando a escolha terapêutica adequada para cada caso.

**Palavras-chave:** Anaplasmoses, piroplasmose, Brasil.

## ABSTRACT

ALBUQUERQUE, Celina Vieira de. **Importance of *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia caballi* and *Theileria equi* as etiological agents associated with horses with clinical suspicion of piroplasmosis in the Metropolitan Mesoregion of Rio de Janeiro – Brazil.** 2023. 69p. Dissertation (Master's degree in Veterinary Medicine). Instituto de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Patologia e Ciências Clínicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

Equine Piroplasmosis (EP) and Equine Granulocytic Anaplasmosis (EGA) are diseases transmitted by ixodid ticks, which affect horses in various regions of the world. They are caused by the protozoa *Babesia caballi*, *Theileria equi* and *Theileria haneyi* and by the bacterium *Anaplasma phagocytophilum*, respectively. Both diseases can manifest as subclinical or acute conditions, causing nonspecific febrile illness, which makes clinical differentiation difficult. However, the therapeutic approaches are different. Serological and molecular studies carried out in horses in Brazil have shown the presence of *A. phagocytophilum*, but the identification of this agent in horses with clinical manifestations in the country are still few, which puts its clinical relevance in doubt. Thus, the aim of this study was to evaluate the importance of *A. phagocytophilum*, *B. caballi* and *T. equi* as etiological agents in horses with clinical manifestations suggestive of EP, in addition to determining the proportion of patients infected with each agent and to describe the clinical and laboratorial findings obtained according to the identified hemopathogen and, therefore, provide subsidies to veterinary clinicians to carry out the diagnosis, which will guide the therapeutic choice. Blood samples from the jugular vein of animals that presented at least three clinical signs of EP were submitted to hematological and molecular analyzes (qPCR). Of the 45 animals evaluated with clinical signs, none of them (0%) detected *A. phagocytophilum*, in five (11.2%) only *B. caballi* was detected, in 16 (35.5%) only *T. equi*, seven (15.5%) demonstrated the presence of both hemoprotozoa and in 17 (37.8%) there was no detection of DNA from any of the investigated agents. Statistical analysis of the data showed that EP is significantly more important than EGA. Among EP cases, *T. equi* was the etiologic agent associated with most clinical cases. Other etiologies can also cause syndromes with nonspecific signs in horses. Clinical signs and haematological parameters tend to be similar in non-specific febrile illnesses. Limb edema has been shown to be more common in cases of other etiology than in *T. equi* infections and Piroplasmid co-infections. Hyporexia is more frequently observed in cases of *B. caballi* than in Piroplasmid co-infections, and lethargy is more present in animals co-infected with both protozoa than in other causes. VCM and HCM also tended towards a lower value in Piroplasmid co-infections when compared to other causes. Finally, EGA should not be considered as a prime suspect in cases of nonspecific febrile syndrome in the metropolitan mesoregion of the state of Rio de Janeiro. Protozoa that cause EP in single or multiple infections are often found in horses with clinical manifestations, representing an important differential diagnosis in suspected cases in this region. Veterinarians should pay attention not only to clinical signs and hematological exams, but also to the animal's history and the epidemiology of the region to raise the diagnostic suspicion. Molecular exams make it possible to determine a definitive diagnosis and should be used whenever possible, guiding the appropriate therapeutic choice for each case.

**Keywords:** Anaplasmosis, piroplasmosis, Brazil.

## LISTAS DE TABELAS, QUADROS E FIGURAS

- Figura 1:** Distribuição dos animais incluídos no estudo de acordo com a região de origem no estado do Rio de Janeiro (adaptado de IBGE - <https://cidades.ibge.gov.br/>).....**30**
- Tabela 1:** Frequência de *Anaplasma phagocytophilum* e Piropasmidas (*Babesia caballi* e/ou *Theileria equi*) por PCR em tempo real em cavalos com manifestações clínicas na Mesorregião Metropolitana do Rio de Janeiro, Brasil.....**31**
- Tabela 2:** Frequência de *Babesia caballi* e *Theileria equi* por PCR em tempo real em cavalos com manifestações clínicas na Mesorregião Metropolitana do Rio de Janeiro, Brasil.....**31**
- Figura 2:** Frequência de observação dos sinais clínicos em cavalos com manifestações clínicas na Mesorregião Metropolitana do Rio de Janeiro, Brasil, de acordo com cada agente detectado por PCR em tempo real.....**32**
- Tabela 3:** Frequência de observação de alterações no hemograma em cavalos com manifestações clínicas na Mesorregião Metropolitana do Rio de Janeiro, Brasil, de acordo com cada agente detectado por PCR em tempo real.....**33**
- Tabela 4:** Médias  $\pm$  DP e medianas (mínimo - máximo) de parâmetros hematológicos em cavalos com manifestações clínicas na Mesorregião Metropolitana do Rio de Janeiro, Brasil, de acordo com cada agente detectado por PCR em tempo real.....**34**

## LISTAS DE ABREVIACOES, SIGLAS OU SÍMBOLOS

AGE	Anaplasmosse granulocítica equina
AGH	Anaplasmosse granulocítica humana
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CAT	Atividade enzimática de catalase
cELISA	Ensaio imunoenzimático competitivo
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CK	Creatinoquinase
DNA	cido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio imunoenzimático
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GGT	Gamaglutamiltransferase
gltA	Citrato sintase
GPx	Glutaciona peroxidase
groEL	Proteína de choque térmico
GSH	Glutaciona
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IFAT	Imunofluorescência indireta
IFN	Interferon
IL	Interleucina
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídeo
MDA	Malondialdeído
MHC	Complexos maiores de histocompatibilidade
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	ácido ribonucleico mitocondrial
msp	Proteínas de superfície principal
NO	xido nítrico
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PCR	Reação da polimerase em cadeia
PE	Piroplasmose equina
PGE2	Prostaglandina E2
qPCR	Reação da polimerase em cadeia quantitativa em tempo real
rRNA	ácido ribonucleico ribossmico
RT-PCR	Reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
SOD	Superóxido dismutase
TAC	Capacidade antioxidante total
TAS	<i>Status</i> antioxidante total
TIBC	Capacidade total de ligação do ferro
TNF	Fator de necrose tumoral
TOS	<i>Status</i> oxidante total
VCM	Volume corpuscular médio
VG	Volume globular ou hematócrito
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1 Objetivos Específicos</b> .....	<b>2</b>
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>2</b>
<b>3.1 Anaplasmosse Granulocítica Equina</b> .....	<b>2</b>
3.1.1 Etiologia .....	2
3.1.2 Epidemiologia .....	3
3.1.3 Patogenia .....	4
3.1.4 Sinais clínicos .....	7
3.1.5 Diagnóstico .....	9
3.1.6 Tratamento .....	10
3.1.7 Prevenção .....	11
3.1.8 Importância zoonótica .....	11
<b>3.2 Piroplasmose Equina</b> .....	<b>12</b>
3.2.1 Etiologia .....	12
3.2.2 Epidemiologia .....	12
3.2.3 Patogenia .....	14
3.2.4 Sinais clínicos .....	19
3.2.5 Diagnóstico .....	21
3.2.6 Tratamento .....	23
3.2.7 Prevenção .....	24
<b>3.3 Diagnósticos Diferenciais</b> .....	<b>24</b>
<b>3.4 Carrapatos Parasitos de Equinos no Brasil</b> .....	<b>25</b>
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>27</b>
4.1 Animais .....	27
4.2 Critérios de inclusão .....	27
4.3 Tamanho amostral .....	27
4.4 Amostragem .....	27
4.5 Extração de DNA .....	28
4.6 Ensaio de PCR em tempo real TaqMan .....	28
4.7 Análise Estatística .....	29
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>35</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	<b>49</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>50</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>63</b>
Anexo A - Certificado CEUA/IV – UFRRJ .....	64
Anexo B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – CEUA/IV – UFRRJ .....	65
Anexo C - Certificado CEUA/IZ – UFRRJ .....	67
Anexo D - Resultado dos hemogramas e qPCR dos animais incluídos no estudo .....	68

## 1 INTRODUÇÃO

A Piroplasmose Equina (PE) e a Anaplasmosse Granulocítica Equina (AGE) são duas enfermidades transmitidas por carrapatos da família Ixodidae e que podem se manifestar como condições subclínicas ou agudas semelhantes, com sinais inespecíficos, provocando doença febril. Os sinais clínicos podem envolver febre, apatia, letargia, hiporexia, perda de peso, queda de performance, membranas mucosas pálidas ou ictericas, sinais de cólica, edema ventral, de pálpebras ou de membros, o que, pela semelhança entre ambas, torna muito difícil o diagnóstico clínico.

Apesar da semelhança na apresentação clínica e no vetor, as doenças se diferem quanto ao agente etiológico e, conseqüentemente, quanto ao tratamento. A PE é causada pelos protozoários intraeritrocitários obrigatórios *Babesia caballi*, *Theileria equi* e *Theileria haneyi*, enquanto a AGE é causada por *Anaplasma phagocytophilum*, uma bactéria Gram negativa intracelular obrigatória, que tem tropismo e se multiplica em granulócitos. Com relação ao tratamento, diaceturato de diminazeno e dipropionato de imidocarb são as drogas de escolha contra os protozoários, enquanto os casos de anaplasmosse demonstram responder bem à terapia antimicrobiana com oxitetraciclina.

O diagnóstico dos casos agudos vai envolver o histórico e os sinais clínicos, além da microscopia de esfregaços de sangue periférico, no qual observam-se inclusões parasitárias nas hemácias para os casos de piroplasmose ou corpúsculos de inclusão em granulócitos nos casos de *A. phagocytophilum*. Para o diagnóstico de AGE, o esfregaço também pode ser realizado da capa leucocitária, aumentando a sensibilidade da técnica. Embora a microscopia seja muito específica, trata-se de um exame pouco sensível, devido à baixa parasitemia e bacteremia presente nos casos clínicos. Por outro lado, a reação da polimerase em cadeia (PCR) permite o diagnóstico de casos agudos e subclínicos, de maneira sensível e específica, já que identifica os agentes infecciosos pela amplificação de sequências do DNA. A PCR pode ser feita com sangue total para os dois agentes ou com a capa leucocitária para *A. phagocytophilum*.

A Anaplasmosse Granulocítica Humana (AGH) também é causada por *A. phagocytophilum*, o que indica a sua importância na saúde pública, embora os equinos pareçam não desenvolver infecções crônicas, sendo improvável que atuem como reservatórios importantes da bactéria. *Anaplasma phagocytophilum* infectando equinos já foi reportado em vários países do mundo, tanto por sorologia quanto por detecção molecular, com prevalências variadas e a infecção clínica foi comprovada em modelos experimentais. Como um país de clima tropical e subtropical, o Brasil é endêmico para carrapatos, o que torna fator de risco para o desenvolvimento da doença. Embora a exposição a esse agente tenha sido identificada por técnicas sorológicas e moleculares também no Brasil, não só em cavalos, mas em cães e carrapatos, mostrando a circulação da bactéria no país, os estudos que identifiquem *A. phagocytophilum* em equinos com sinais clínicos ainda são escassos, o que coloca em dúvida a sua relevância como agente causador de doença clínica. A hipótese é que *A. phagocytophilum* não é um agente etiológico relevante nas manifestações clínicas suspeitas de piroplasmose nos equinos do estado do Rio de Janeiro.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo geral da pesquisa é avaliar a importância dos hemopatógenos *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia caballi* e *Theileria equi* como agentes etiológicos em equinos com manifestações clínicas sugestivas de piroplasmose

### 2.1 Objetivos Específicos

- Determinar a proporção de equinos clinicamente suspeitos infectados pelos agentes causadores da PE e AGE;
- Descrever os achados clínicos e laboratoriais dos equinos identificados com cada um dos hemopatógenos pesquisados;
- Dar subsídios aos clínicos veterinários para a realização do diagnóstico, que orientará a escolha terapêutica.

## 3 REVISÃO DA LITERATURA

A piroplasmose equina (PE) é uma importante doença transmitida por carrapatos, com impacto econômico mundial na indústria equina, causada pelos protozoários parasitos de hemácias *Babesia caballi*, *Theileria equi* e *Theileria haneyi*. A Anaplasmosse Granulocítica Equina (AGE) é causada pela bactéria intracelular obrigatória *Anaplasma phagocytophilum*, com tropismo e multiplicação em granulócitos de eucariotos, provocando doenças febris inespecíficas em animais e humanos (VON LOEWENICH et al., 2003). As duas doenças são transmitidas por carrapatos da família Ixodidae. Em equinos, é difícil a distinção clínica as condições, pois ambas podem se manifestar como subclínicas ou agudas, normalmente apresentando-se como um mal-estar agudo inespecífico. Embora a profilaxia apresente um importante ponto em comum, que é o controle de carrapatos vetores (JOACHIM et al., 2022), a PE e a AGE apresentam etiologias muito diferentes, requerendo abordagens terapêuticas distintas.

A seguir é apresentada a revisão de literatura dividida em tópicos relacionados à AGE e à PE separadamente e em tópicos comuns às duas doenças, como os diagnósticos diferenciais e as principais espécies de carrapatos parasitos de equinos encontradas no Brasil.

### 3.1 Anaplasmosse Granulocítica Equina

#### 3.1.1 Etiologia

*Anaplasma phagocytophilum* é um pequeno coco pleomórfico Gram-negativo (RIKIHISA, 2011). Pertence à família Anaplasmataceae (ordem Rickettsiales), que é composta por bactérias intracelulares obrigatórias, não móveis e podem ser patogênicas ou não patogênicas (RIKIHISA, 2010; SILAGHI et al., 2017).

Após reorganização da família Anaplasmataceae, *A. phagocytophilum* passou a incluir os agentes anteriormente denominados *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila* e o agente da erliquiose granulocítica humana (DUMLER et al., 2001). Os membros dessa família replicam-

se em vacúolos ligados à membrana dentro do citoplasma das células hospedeiras eucarióticas (inclusões ou vacúolos parasitóforos), permanecendo compactadas dentro das inclusões, formando aglomerados chamados mórulas, o que permite que os granulócitos infectados mantenham a sua plasticidade para poderem entrar na circulação capilar (RIKIHISA, 2011; SILAGHI et al., 2017).

### 3.1.2 Epidemiologia

A infecção clínica por *A. phagocytophilum* em equinos foi confirmada em modelos experimentais através de transfusão sanguínea (FRANZÉN et al. 2005), exposição a vetores infectados experimentalmente (PUSTERLA et al., 2002) ou naturalmente (REUBEL et al., 1998) e casos de infecção natural foram reportados em vários países (BERMANN et al., 2002; VON LOEWENICH et al., 2003; JAHN et al., 2010; ; UEHLINGER et al., 2011; BURGESS et al., 2012; GUSSMANN et al., 2014), inclusive no Brasil (PRADO et al., 2017), sendo confirmados por microscopia e/ou PCR. A detecção sorológica e molecular da bactéria também foi reportada por diferentes autores, confirmando a presença de *A. phagocytophilum* em diferentes países, com prevalências variadas (LAUS et al., 2013; SLIVINSKA et al., 2015; SALEEM et al., 2018b; HURTADO et al., 2020). Com base na detecção molecular em carrapatos, *A. phagocytophilum* parece apresentar distribuição em todos os países da Europa, nos Estados Unidos, Rússia, China, Japão e Coreia (STUEN et al., 2013).

Estudos sorológicos foram realizados no Brasil para verificar a presença de anticorpos IgG anti-*A. phagocytophilum* nos estados de Goiás e Distrito Federal (SALVAGNI et al., 2010), Maranhão (NOGUEIRA et al., 2017), Minas Gerais (PRADO et al., 2018) e Rio de Janeiro (ROLIM; OLIVEIRA; BRASIL, 2015; SANTOS et al., 2019). Santos et al. (2013) confirmaram a presença de *A. phagocytophilum* em cães naturalmente infectados e em carrapatos Ixodídeos no estado do Rio de Janeiro por métodos moleculares. Prado et al. (2018) e Santos et al. (2019) evidenciaram, também por métodos moleculares, a presença de *A. phagocytophilum* infectando cavalos nos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro, respectivamente. Contudo, nestes estudos, apesar de serem encontradas inclusões em leucócitos na microscopia e PCR positiva para *A. phagocytophilum* em algumas amostras, o que caracterizaria a fase aguda da AGE, não foram encontrados animais com sinais clínicos (PRADO et al., 2018). A detecção molecular do agente foi observada em apenas um animal com sintomatologia, mas este apresentava co-infecção por *T. equi* (SANTOS et al., 2019). Pela similaridade clínica das duas doenças, não se pode afirmar qual o agente foi o responsável pelas manifestações observadas. Apesar do estudo de Salvagni et al. (2010) ter sido realizado em animais com suspeita clínica, nenhum deles apresentou resultado positivo para *A. phagocytophilum* nos exames de microscopia e PCR. Com esses relatos sobre a presença de *A. phagocytophilum* infectando cavalos no Brasil, a doença passou a ser considerada nos diagnósticos de enfermidades febris inespecíficas, principalmente quando não há resposta ao tratamento para a piroplasmose (SALVAGNI et al. 2010), embora faltem dados que confirmem a relevância clínica da bactéria no país.

Em hospedeiros vertebrados, apesar da capacidade do *A. phagocytophilum* de variar os antígenos, a infecção aguda e autolimitada é típica e a imunidade do hospedeiro consegue conter a infecção em 2 a 4 semanas em cavalos, humanos e bovinos (FOLEY et al., 2009a). A mortalidade é baixa, e quando ocorrem tendem a estar relacionadas com complicações por infecção secundária oportunista e lesões por ataxia (MADIGAN; GRIBBLE, 1987).

*Anaplasma phagocytophilum* é transmitido por carrapatos duros e um hospedeiro reservatório vertebrado é necessário na natureza para manter o ciclo endêmico (STUEN et al., 2013). Por isso, a sazonalidade da doença provavelmente depende da atividade do carrapato (JAHN et al., 2010). A bactéria é capaz de persistir entre as estações de atividade de carrapatos em várias espécies de mamíferos e o movimento de hospedeiros e carrapatos infectados em

animais migratórios pode favorecer a sua disseminação (STUEN et al., 2013). Vários mamíferos podem servir como hospedeiros e reservatórios. Na Europa, Ásia e América, *A. phagocytophilum* foi detectado em espécies locais de ruminantes selvagens, pequenos mamíferos, como roedores e insetívoros, e outros mamíferos, como javalis, raposas e ursos, além de aves, répteis e espécies domésticas, como cães, gatos, cavalos, ovinos, caprinos, bovinos e iaques (STUEN et al., 2013). Na Europa, *A. phagocytophilum* infecta gado, roedores e humanos, diferentemente do que ocorre nos Estados Unidos, onde a infecção do gado é rara apesar de ser comum em outras espécies (FOLEY et al., 2009b). A detecção por PCR foi negativa em 11 cavalos saudáveis selecionados aleatoriamente de três fazendas onde AGE foi diagnosticada em três cavalos afetados clinicamente em momento anterior (JAHN et al., 2010). Isso é um indicativo de que a infecção crônica em equinos não ocorra, o que reduz as chances dessa espécie atuar como reservatório da bactéria.

Os carrapatos são considerados vetores primários, com diferentes tipos de células alvo em um ciclo de replicação, incluindo invasão de glândulas salivares e transmissão na saliva liberada durante a alimentação sanguínea (SILAGHI et al., 2017). Os dados de prevalência na detecção molecular de *A. phagocytophilum* em carrapatos mostram grandes variações de acordo com a região geográfica, tendo sido detectados em espécies dos gêneros *Ixodes* spp., *Amblyomma* spp., *Dermacentor* spp. e *Haemaphysalis* spp. (STUEN et al., 2013). Pelo menos 5 espécies de carrapatos (*I. angustus*, *I. ochotonae*, *I. pacificus*, *I. spinipalpis* e *I. woodi*) podem servir como vetores para *A. phagocytophilum* na Califórnia (REJMANEK et al., 2013). *Ixodes pacificus* pode funcionar como um vetor de diferentes cepas de *A. phagocytophilum* (REJMANEK et al., 2013). Mas a competência vetorial de muitas das espécies de carrapatos e sua contribuição para o ciclo endêmico ainda precisam ser mais pesquisadas (STUEN et al., 2013). A presença de *A. phagocytophilum* em carrapatos *I. scapularis* aumenta sua capacidade de sobreviver no frio pela regulação positiva de uma glicoproteína anticongelante de *I. scapularis*, permitindo que a bactéria e o vetor persistam no ambiente por mais tempo (RIKIHISA, 2011). Nos carrapatos ocorre a transmissão transestadial, mas não há evidências de que a transmissão transovariana ocorra, de forma que as larvas são consideradas livres de *A. phagocytophilum*, mas as ninfas infectadas e os carrapatos adultos são capazes de transmitir a bactéria (RIKIHISA, 2011; STUEN et al., 2013; SILAGHI et al., 2017).

Apesar da organização em uma única espécie, *Anaplasma phagocytophilum*, há evidências de que diferentes hospedeiros variam em suscetibilidade a cepas locais desse patógeno (FOLEY et al., 2008). Nos Estados Unidos, várias espécies de roedores foram apontadas como reservatórios naturais de *A. phagocytophilum*, mas a presença de múltiplas cepas de *A. phagocytophilum* tornou difícil determinar quais hospedeiros reservatórios representam o maior risco para humanos e animais domésticos (REJMANEK et al., 2012). Estudos genéticos mostram cepas altamente distintas em ratos silvestres em comparação com aquelas de hospedeiros clínicos, e estudos experimentais falharam em transferir infecção de ratos silvestres para cavalos (FOLEY et al., 2008). Esses dados sugerem que várias cepas distintas de *A. phagocytophilum* podem circular nos diferentes ecossistemas (FOLEY et al., 2008).

### 3.1.3 Patogenia

Após entrar na derme através da inoculação pela picada do carrapato, e através da disseminação por via linfática ou sanguínea, as bactérias invadem as células-alvo dos sistemas hematopoiético e linforreticular (LEPIDI et al., 2000). Por ser uma bactéria intracelular obrigatória, a replicação de *A. phagocytophilum* ocorre no interior dos granulócitos de mamíferos e das glândulas salivares e células do intestino de carrapatos (RIKIHISA, 2011). Durante a fase aguda da doença, as mórulas envelopadas em vacúolos parasitóforos são

encontradas no citoplasma de neutrófilos e eosinófilos, individualmente ou em grupos de duas ou mais (LEWIS; GEORGE, 1976). No entanto, o agente da anaplasiose granulocítica é capaz de estabelecer infecção em neutrófilos circulantes e de vários órgãos e tecidos, principalmente em baço, pulmões e fígado (LEPIDI et al., 2000).

Após a infecção, a bactéria altera o tráfego vesicular das células para criar um compartimento ligado à membrana intracelular que permite a replicação isolada dos lisossomos (RIKIHISA, 2011). Apesar de não sintetizar, *A. phagocytophilum* requer colesterol para sua sobrevivência e crescimento, necessitando adquirir da célula do hospedeiro a partir da via de absorção mediada pela lipoproteína de baixa densidade (LDL) regulando positivamente a expressão do receptor de LDL nas células infectadas (RIKIHISA, 2010). Os genomas de *A. phagocytophilum* também carecem dos genes para a biossíntese do lipopolissacarídeo (LPS) e do peptidoglicano que ativam os leucócitos do hospedeiro, inibindo uma série de respostas imunes inatas, e são incapazes de utilizar glicose como fonte de carbono ou energia (RIKIHISA, 2010). A infecção por *A. phagocytophilum* é capaz de inibir a apoptose espontânea e induzida de neutrófilos humanos isolados do sangue periférico por até 48 ou 96h, e isso permite à bactéria tempo suficiente para replicação (RIKIHISA, 2011).

À medida que as bactérias se dividem e proliferam, as inclusões se expandem para ocupar a maior parte do citoplasma das células infectadas (RIKIHISA, 2011). Também pode ocorrer colonização de células endoteliais, permitindo persistência prolongada da bactéria devido à maior longevidade das células do endotélio vascular e por permitir a transferência do microorganismo para os granulócitos marginais, alterando seu comportamento para evitar efeitos imunológicos do hospedeiro (RESTIFO et al., 2015).

Durante o período de bacteremia, o repasto de sangue por carrapatos pode levar a infecção de células do intestino e glândulas salivares do vetor. A bactéria é capaz de regular vários genes críticos para a infecção de carrapatos e prolongar a sobrevivência do carrapato em temperaturas congelantes (RIKIHISA, 2011). Uma vez presente na glândula salivar do carrapato, *A. phagocytophilum* pode ser transmitido para um novo hospedeiro por meio do repasto sanguíneo. A transmissão transplacentária de *Anaplasma phagocytophilum* em equinos foi documentada recentemente, com o nascimento de um potro sintomático e PCR positivo para *A. phagocytophilum* de uma égua apresentando sinais clínicos de AGE (DIXON; BEDENICE, 2021). A fisiopatologia da transmissão intrauterina de *A. phagocytophilum* pode estar associada a uma vasculite, resultando em placentite, ou ser facilitada pelo tipo de placentação microcotiledonária não decídua, epiteliocorial e difusa da égua; embora a histopatologia da placenta desse caso não tenha identificado evidências de placentite, o potro exibiu anormalidades associadas à insuficiência placentária e hipóxia tecidual (DIXON; BEDENICE, 2021).

A patogênese ainda é pouco compreendida, mas acredita-se que a doença clínica seja mediada por citocinas pró-inflamatórias. Como *A. phagocytophilum* é raramente encontrado nos tecidos, pode-se especular que a patogênese não é causada diretamente pelo organismo, mas pode ser em parte mediada pelo hospedeiro (LEPIDI et al., 2000). Os neutrófilos infectados podem liberar citocinas induzindo o recrutamento e ativação de células inflamatórias mononucleares, principalmente fagócitos mononucleares, (LEPIDI et al., 2000). Uma vez que *A. phagocytophilum* não possui LPS e peptidoglicanos, outros PAMPs (Padrões Moleculares Associados a Patógenos) podem estimular monócitos a induzir citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para a depuração bacteriana, patogênese e manifestação da doença (RIKIHISA, 2011). Quando ativados, monócitos/macrófagos produzem espécies reativas de oxigênio (ROS), como superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila. Logo, a infecção causa estresse oxidativo/nitrosativo, o que provavelmente induz os sinais clínicos, já que os níveis de marcadores pró-inflamatórios que podem levar a prejuízos funcionais foram encontrados elevados em animais infectados (MIS; OĞUZ, 2022). Além disso, níveis elevados de colesterol

no sangue facilitam a infecção por *A. phagocytophilum* e regulam positivamente a expressão de IL-8 (RIKIHISA, 2011), aumentando a migração de neutrófilos. As lesões inflamatórias precipitadas por neutrófilos infectados aderentes provavelmente recrutam números muito maiores de leucócitos e plaquetas derivados do sangue não infectados (LEPIDI et al., 2000). Dessa forma, mais células estariam disponíveis e próximas para a manutenção da infecção.

Alguns fatores do hospedeiro foram identificados como alterados pela presença de *A. phagocytophilum*, o que ajuda na manutenção da infecção e no desenvolvimento dos sinais clínicos. Animais positivos para *A. phagocytophilum* apresentaram níveis maiores de TOS (*status* oxidante total), peroxinitrito, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1, IL-18 e Ferro; ao contrário dos níveis de TAS (*status* antioxidante total), SOD (superóxido dismutase), GPx (glutathiona peroxidase), MPO (mieloperoxidase), G6PD (glicose-6-fosfato desidrogenase), Cobre, Manganês, Selênio e Zinco, que foram maiores no grupo controle negativo (MIS; OĞUZ, 2022). Também regula positivamente a expressão de seu receptor de IL-8 em neutrófilos, induzindo uma maior migração de neutrófilos para locais de infecção (RIKIHISA, 2011). Isso indica que a infecção estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias, gerando uma resposta de fase aguda como consequência do dano celular provocado pela bactéria, assim como reduz a atividade antioxidante (MIS; OĞUZ, 2022). A manutenção de citocinas em altas concentrações favorece a produção contínua de espécies reativas de oxigênio, mantendo o dano celular (MIS; OĞUZ, 2022).

A comparação da patologia e distribuição de bactérias em humanos, cavalos e ovelhas com infecção por *A. phagocytophilum* demonstrou ser semelhante, incluindo os principais achados de depleção linfóide e eritrofagocitose no baço; pequenos agregados de células inflamatórias sinusoidais e perivenulares e hepatócitos apoptóticos ocasionais no fígado; hiperplasia paracortical e histiocitose nos linfonodos; e regiões de infiltrados inflamatórios intersticiais nos pulmões; também foram encontradas células infectadas em coração e rins, mas sem lesões teciduais (LEPIDI et al., 2000). A imunocoloração revelou que mais de 95% das células infectadas nos tecidos eram neutrófilos maduros e a maioria deles foram vistos dentro dos lúmens dos vasos; raramente outras células que não neutrófilos também foram encontradas infectadas, incluindo fibroblastos, células endoteliais e fagócitos mononucleares (LEPIDI et al., 2000). Esses achados refletem a distribuição disseminada do agente infeccioso e a resposta imune e inflamatória local e sistêmica do hospedeiro. Em equinos com AGE também é comum encontrar durante a necrópsia hemorragias petequiais e equimóticas, edema, icterícia, orquite, vasculite e neurite de membros, fâscias, subcutâneo, ovários e testículos (LEWIS; GEORGE, 1976).

A principal via de transmissão de *A. phagocytophilum* é através do repasto sanguíneo por vetores competentes infectados. Para estudar a AGE, muitos pesquisadores utilizam a inoculação de sangue ou leucócitos por via intravenosa em cavalos sadios, mas isso altera algumas características da evolução da infecção. A comparação entre a inoculação intravenosa com leucócitos infectados ou por carrapatos infectados experimentalmente demonstrou que há diferenças no período de incubação, duração da bacteremia e cargas bacterianas iniciais e máximas entre as duas vias de infecção (PUSTERLA et al., 1999), mas a gravidade da doença é semelhante e a dose infectante parece não alterar a gravidade dos sinais clínicos, mas o período de incubação tende a ser mais curto na inoculação experimental intravenosa do que com a rota do carrapato (PUSTERLA et al., 1999; FRANZÉN et al., 2005). No entanto, foram observadas infecções leves e assintomáticas por *A. phagocytophilum* após exposição a carrapatos naturalmente infectados, com o período de incubação, a duração e a gravidade dos sinais clínicos consideravelmente reduzidos em comparação com estudos usando carrapatos infectados experimentalmente ou inoculação intravenosa de sangue infectado (REUBEL et al., 1998). O período de incubação é significativamente maior nos cavalos infectados por carrapatos infectados experimentalmente (média de 10,5 dias) do que nos cavalos infectados por via

intravenosa (média de 5,5 dias) (PUSTERLA et al., 1999), e maior ainda na transmissão experimental de *A. phagocytophilum* por carrapatos *Ixodes pacificus* naturalmente infectados (aproximadamente 3 semanas em 2 dos 3 cavalos utilizados, enquanto um cavalo permaneceu assintomático) (REUBEL et al., 1998). Cavalos infectados por via intravenosa apresentaram carga bacteriana inicial maior do que cavalos infectados pela via do carrapato, mas ambas são seguidas por um rápido aumento, atingindo pico de bacteremia 6 a 7 dias após a infecção, e uma posterior diminuição lenta; no entanto, a carga bacteriana média do dia 7 ao dia 9 de bacteremia foi significativamente maior no grupo infectado por carrapatos, assim como um período maior de detecção do agente pela PCR (PUSTERLA et al., 1999). A menor carga bacteriana transferida pela picada do carrapato pode explicar o período prodromico mais longo, já que é necessário um maior tempo inicial para a replicação do agente até que atinja carga bacteriana suficiente para produzir os sinais clínicos. Embora as diferenças na carga inicial sejam provavelmente o resultado de diferentes doses infecciosas, uma bacteremia maior e mais longa do que aqueles que receberam inoculação intravenosa podem estar relacionadas ao local da infecção, à reação imune do hospedeiro, à quantidade de bactérias transferidas ou às alterações do agente no vetor à medida que ele é transmitido para um hospedeiro mamífero (PUSTERLA et al., 1999).

Após 12 a 16 dias da inoculação intravenosa de *A. phagocytophilum*, já é possível detectar anticorpos específicos, mesmo com a presença de sinais clínicos em alguns casos, e atingem um pico rapidamente, entre 3 e 7 dias a partir da identificação da soropositividade (FRANZÉN et al., 2005). Durante o período de convalescença, a titulação diminui gradativamente, se não houver reinfecção. A sorologia negativa ocorre após 8 a 15 meses na maioria dos cavalos, independentemente da duração do período de recuperação clínica (ARTURSSON et al., 1999). Na infecção natural por carrapatos, a dose infecciosa é presumivelmente menor ou administrada em um período mais longo, o que pode induzir uma resposta de anticorpos mais lentas (FRANZÉN et al., 2005). Cavalos infectados por inoculação intravenosa com leucócitos infectados soroconverteram mais cedo (média, 10,5 dias) do que os cavalos parasitados por carrapatos experimentalmente infectados (média, 15,2 dias) (PUSTERLA et al., 1999). Na transmissão experimental de *A. phagocytophilum* por carrapatos *Ixodes pacificus* naturalmente infectados, apenas em animais sintomáticos ocorreu a soroconversão, após dias 22 e 32 da exposição (REUBEL et al., 1998). A resposta de anticorpos não mostrou diferenças marcantes entre as duas vias de infecção, mas o maior tempo de soroconversão observado após a infecção pelo carrapato parece ser mais resultado da via de infecção e do número de bactérias inicialmente transmitidas (PUSTERLA et al., 1999).

### 3.1.4 Sinais clínicos

A AGE aguda é normalmente leve a moderada, a mortalidade é baixa e os sinais podem persistir por vários dias (LEWIS; GEORGE, 1976). Os principais sinais clínicos incluem febre, apatia, letargia, hiporexia ou anorexia, mucosas pálidas e/ou ictéricas, petequiações, vasculite, edema ventral e de membros, rigidez e relutância em se mover, ataxia, sinais gastrointestinais, anemia, trombocitopenia, leucopenia por neutropenia (às vezes, neutrofilia) e/ou linfopenia e hiperfibrinogenemia (MADIGAN; GRIBBLE, 1987; ARTURSSON et al., 1999; PUSTERLA et al., 1999; BERMANN et al., 2002; PUSTERLA et al., 2002; VON LOEWENICH et al., 2003; FRANZÉN et al., 2005; BONI et al., 2009; LEWIS et al., 2009; JAHN et al., 2010; ADASZEK; WINIARCZYK, 2011; UEHLINGER et al., 2011; GUSSMANN et al., 2014; PRADO et al., 2017). A análise bioquímica sérica indica alterações eletrolíticas e bioquímicas menores e inespecíficas, como hiponatremia, hipocloremia, hipocalemia, hipocalcemia, hipofosfatemia, hipomagnesemia, diminuição do nitrogênio ureico, hiperglicemia, hipoalbuminemia, hiperglobulinemia, diminuição sérica da atividade das enzimas AST e CK, aumento de ALT e GGT e aumento da bilirrubina total (BERMANN et al., 2002; PUSTERLA

et al., 2002; VON LOEWENICH et al., 2003; BONI et al., 2009; LEWIS et al., 2009; UEHLINGER et al., 2011; GUSSMANN et al., 2014; PRADO et al., 2017; FIELDING et al., 2018). Sinais incomuns também podem ser encontrados na infecção por *A. phagocytophilum*, como alterações respiratórias superiores, linfadenopatia submandibular, derrames cavitários, sangramento nasal e morte súbita (FRANZÉN et al., 2005; ADASZEK; WINIARCZYK, 2011; UEHLINGER et al., 2011; RESTIFO et al., 2015; DEANE et al., 2021).

Normalmente, o sinal inicial é a febre, acompanhada de depressão e aumento da frequência cardíaca e respiratória (FRANZÉN et al., 2005). Ataxia e edema distal geralmente ocorrem alguns dias após o início da febre e podem persistir por mais tempo do que os outros sinais (REUBEL et al., 1998; FRANZÉN et al., 2005). A maioria das manifestações clínicas presentes (letargia, inapetência, depressão etc.) está associada à febre (LEWIS et al., 2009).

A vasculite tem sido citada como a patogênese mais provável do edema distal dos membros e pode ser a causa de derrames cavitários (JAHN et al., 2010; RESTIFO et al., 2015). A inflamação de vasos na infecção por AGE pode ocorrer por dano direto e indireto ao endotélio vascular, por meio da colonização de células endoteliais e produção de citocinas mielossupressoras e pró-inflamatórias pelos neutrófilos (RESTIFO et al., 2015). Neutrófilos infectados aderentes ao endotélio nos tecidos, levam a lesão tecidual subsequente mediada localmente pelo acúmulo de células inflamatórias e sistematicamente pela indução de respostas pró-inflamatórias (LEPIDI et al., 2000). O influxo de células inflamatórias em resposta à presença de bactérias resulta na liberação local de mediadores químicos e no aumento da permeabilidade vascular, permitindo que o líquido escape da vasculatura para os tecidos circundantes (LEWIS et al., 2009). A relação causal entre infecção por *A. phagocytophilum* e sinais respiratórios superiores é especulativa. Uma hipótese é que a vasculite causada pela infecção leve ao edema das vias respiratórias e a neurite periférica de faringe e laringe (DEANE et al., 2021).

As alterações hematológicas tendem a ser inespecíficas e pouco se sabe sobre o mecanismo que leva a neutropenia e trombocitopenia, podendo estar relacionados a destruição dos neutrófilos parasitados e destruição periférica possivelmente imunomediada de plaquetas, sequestro ou trombocitopoiese disfuncional (SISKA et al., 2013). As contagens de neutrófilos e linfócitos diminuem próximos ao momento em que a febre ocorre e a contagem de eritrócitos diminuiu gradualmente ao longo do período de doença clínica (REUBEL et al., 1998). A trombocitopenia tende a persistir por mais tempo do que a fase de leucopenia (FRANZÉN et al., 2005) e pode ser a causa de sangramentos espontâneos. Existem casos de AGE que não demonstram neutropenia e, portanto, podem se assemelhar mais a um leucograma viral típico (LEWIS et al., 2009). A anemia encontrada na AGE ocorre devido ao estresse oxidativo, que gera não só a ruptura das hemácias na circulação, mas também alterações de membrana, que fazem essas células serem identificadas e fagocitadas por macrófagos na medula óssea, baço e/ou fígado, e que provavelmente resulta na liberação de Fe e aumento da sua concentração sérica (MIS; OGUZ, 2022). A hemólise intravascular pode levar ao surgimento de icterícia e hiperbilirrubinemia. A estimulação aberrante mediada por citocinas pode provocar eritrofagocitose (LEPIDI et al., 2000), contribuindo para a anemia pela destruição de hemácias. Por outro lado, a infecção também é capaz induzir a expressão atrasada e fraca de TNF- $\alpha$  e IL-6 e expressão significativa de IL-8 na medula óssea, o que suprime a proliferação de células progenitoras mieloides (RIKIHISA, 2011). Mas a presença de celularidade normal ou hiperplasia difusa da medula óssea, combinada com a presença de hemofagocitose no baço e no linfonodo, e células infectadas no baço e no pulmão, sustentam o sequestro periférico, consumo ou destruição de elementos sanguíneos normais como o principal mecanismo para a pancitopenia induzida (LEPIDI et al., 2000).

A maioria das anormalidades bioquímicas séricas pode ser explicada pelo histórico de hiporexia e anorexia (LEWIS et al., 2009). A anorexia está associada a altas concentrações de

bilirrubina em equídeos, e pode ser que a anorexia em equídeos com infecção por *A.phagocytophilum* seja mais profunda do que em equídeos com algumas outras condições clínicas (FIELDING et al., 2018). A constatação de uma diminuição na concentração plasmática de sódio pode ser devida a alterações na função renal ou aumento da ingestão de água livre e as baixas atividades de CK circulantes foram descritas em uma variedade de doenças clínicas e podem estar associadas à falta de atividade física ou a processos patológicos (FIELDING et al., 2018).

### 3.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico de AGE fundamenta-se na epidemiologia da doença na região, no histórico, sinais clínicos, achados laboratoriais e é confirmado na microscopia ou, de maneira mais acurada, pela PCR, ambos de sangue total ou da capa leucocitária. Em vertebrados, a observação microscópica de esfregaços de sangue tem sido tradicionalmente usada para diagnosticar anaplasiose clínica e identificação de reservatórios e são obtidos durante a fase aguda inicial dos sintomas e antes do início da terapia antimicrobiana eficaz (SILAGHI et al., 2017). As mórulas podem ser detectadas na microscopia a partir de  $2,6 \pm 1,5$  dias após o início da febre, persistindo por uma média de até 7,6 dias (FRANZÉN et al., 2005).

A coloração diferencial é obtida com corantes do tipo Romanovsky, como Giemsa e Diff-Quik e as mórulas aparecem como formações azul-escuras a roxas (RIKIHISA, 2011; SILAGHI et al., 2017). A coloração de Gram não é adequada para visualizar bactérias intracelulares devido à falta de contraste com o citoplasma do hospedeiro (RIKIHISA, 2011). Nesse exame, são visualizados aglomerados bacterianos cocóides característicos (mórulas), como corpúsculos de inclusão redondos e basofílicos pálidos, semelhantes a amoras, em granulócitos circulantes, únicas ou múltiplas, com aproximadamente 1,5 a 4µm de diâmetro (LEWIS et al., 2009; RIKIHISA, 2011; UEHLINGER et al., 2011). A proporção de células infectadas pode variar durante o período de detecção de 0,5 a 16% neutrófilos com inclusões (FRANZÉN et al., 2005). Pode ser difícil visualizar as mórulas, mesmo em casos confirmados de AGE, pois certas cepas infectam apenas 1% dos neutrófilos, e os cavalos geralmente são leucopênicos (LEWIS et al., 2009). Para espécies leucocitotrópicas, como *A. phagocytophilum*, esfregaços de camada leucocitária são preferidos a preparações regulares de sangue total, aumentando a sensibilidade do exame (SILAGHI et al., 2017).

A microscopia de luz é o teste laboratorial mais barato e rápido, mas também o menos sensível e altamente dependente da experiência do examinador, quantidade relativa de células-alvo, níveis de bacteremia, grau de neutropenia e estado de infecção, de forma que um resultado negativo não exclui infecção (SILAGHI et al., 2017). A presença de inclusões neutrofílicas como ferramenta diagnóstica é específica para a doença, mas falta sensibilidade diagnóstica, pois as inclusões aparecem por um período limitado durante o curso da doença (FRANZÉN et al., 2005). A presença de mórulas na microscopia do esfregaço sanguíneo pode demorar a aparecer e o exame se torna pouco sensível, a não ser em casos de alta bacteremia (SISKA et al., 2013). Inclusões muito pequenas ou únicas devem ser avaliadas com cautela para a determinação de positividade, pois há o risco de alterações tóxicas ou outras alterações citoplasmáticas serem confundidas com inclusões precoces (FRANZÉN et al., 2005). Além disso, interpretações falso-positivas podem ocorrer devido a corpúsculos de Döhle, outras inclusões, partículas e fragmentos nucleares sobrepostos a leucócitos (SILAGHI et al., 2017).

Após a fase aguda da AGE ocorre um rápido aumento no título de anticorpos, detectados por imunofluorescência indireta (IFAT), muitas vezes ainda na presença de sinais clínicos (ARTURSSON et al., 1999). Titulação alta ainda na fase aguda pode refletir um efeito de reforço, devido a uma infecção anterior, ou como uma resposta primária de anticorpos rápida, possivelmente em combinação com um atraso na manifestação clínica (ARTURSSON et al.,

1999; JAHN et al., 2010). Aumento repentino de anticorpos durante a fase de convalescência sugere uma reinfecção, mesmo que não haja presença de sinais clínicos, o que sugere imunidade protetora (ARTURSSON et al., 1999). A persistência de níveis de anticorpos sugere reforço periódico por um episódio de infecção subclínica (JAHN et al., 2010), e pode ser também o motivo da baixa prevalência de doença sintomática.

É apropriado assumir que muitos cavalos sorologicamente positivos estão infectados subclínicamente ou estão no estágio de convalescência de uma infecção anterior (ARTURSSON et al., 1999). No entanto, todos os isolados de *A. phagocytophilum* parecem ter reatividade sorológica cruzada (RIKIHISA, 2011). Reações cruzadas com várias espécies de *Anaplasma* spp. são observadas após a soroconversão, fazendo com que os testes diretos sejam a melhor abordagem tanto para a definição de caso quanto para estudos epidemiológicos (SILAGHI et al., 2017). Os testes sorológicos geralmente são específicos de um grupo e não podem ser usados para distinguir cepas individuais (RIKIHISA, 2011).

Sangue total anticoagulado e capa leucocitária são as melhores amostras para triagem molecular de vertebrados infectados por *Anaplasma* (SILAGHI et al., 2017). A sensibilidade da detecção molecular depende de vários fatores, tais como: natureza e qualidade da amostra, o número de cópias genômicas dos genes-alvo e o comprimento do amplicon (SILAGHI et al., 2017). Independentemente da via de transmissão (experimental ou natural), a detecção de *A. phagocytophilum* por PCR é possível de 2 a 4 dias antes dos sinais clínicos aparecerem e permanece positiva por pelo menos mais 13 a 16 dias (REUBEL et al., 1998; FRANZÉN et al., 2005). Entre os genes mais visados de *Anaplasma* spp. são aqueles para 16S rRNA, proteína de choque térmico (groEL), citrato sintase (gltA) e principais proteínas de superfície (msp1, msp2, msp4, msp5) (SILAGHI et al., 2017).

O diagnóstico baseado na detecção microscópica de inclusões durante os primeiros dias de febre pode ser negativo, enquanto a PCR é positiva mesmo antes do aparecimento dos sinais clínicos (FRANZÉN et al., 2005). A detecção de *A. phagocytophilum* por PCR é possível com 3 a 4 dias antes do início dos sinais clínicos até 13 a 15 dias após, além de permitir a detecção de infecções subclínicas. (REUBEL et al., 1998; FRANZÉN et al. 2005; PUSTERLA et al., 2002). Em cavalos assintomáticos, é possível a detecção do agente por PCR por volta dos dias 12, 13 e 14 pós-exposição ao vetor infectado. (REUBEL et al., 1998).

O isolamento e propagação *in vitro* de espécies de *Anaplasma* é menos utilizado no diagnóstico direto de rotina e na vigilância, mas é de grande valia para comprovação da etiologia em ocorrências clínicas atípicas/novas ou casos fatais (SILAGHI et al., 2017). A cultura *in vitro* é uma tarefa exigente em termos de tempo e experiência, e apenas um número limitado de instituições de pesquisa está apto a realizá-la (SILAGHI et al., 2017).

### 3.1.6 Tratamento

Apesar de ser considerada autolimitante, a AGE pode ser tratada de forma eficaz com antibióticos de tetraciclina, encurtando significativamente o curso da doença (LEWIS et al., 2009). Após o início do tratamento para AGE, os sinais clínicos tendem a começar a melhorar após 12 a 24h (MADIGAN; GRIBBLE, 1987; SISKI et al., 2013) e, caso isso não ocorra, é bem provável que a causa da doença seja outra.

O tratamento normalmente realizado é a oxitetraciclina intravenosa, na dose de 5 a 10 mg/kg, uma vez ao dia, por cinco a sete dias (BERMANN et al., 2002; VON LOEWENICH et al., 2003; BONI et al., 2009; LEWIS et al., 2009; JAHN et al., 2010; ADASZEK; WINIARCZYK, 2011; UEHLINGER et al., 2011; SISKI et al., 2013; GUSSMANN et al., 2014). A doxiciclina também é uma opção terapêutica, com maior biodisponibilidade oral, podendo-se utilizar a dose de 10 mg/kg por via oral, a cada 12 horas (LEWIS et al., 2009). Também pode ser necessário tratamento sintomático, podendo-se utilizar, dependendo do caso,

flunixin meglumine (0,5 – 1,1 mg/kg, IV, dose única) e dexametasona (20 mg/animal IM dose única) (LEWIS et al., 2009; ADASZEK; WINIARCZYK, 2011; UEHLINGER et al., 2011).

Por penetrarem nas células e poderem agir sobre patógenos intracelulares, as tetraciclinas são o tratamento de escolha em muitas infecções, incluindo aquelas com espécies de riquetsias (LEWIS et al., 2009). O período de recuperação completa varia de alguns dias até vários meses, o que pode ser influenciado pela escolha terapêutica, já que o tratamento antibiótico inadequado ou insuficiente também pode contribuir para uma recuperação prolongada (ARTURSSON et al., 1999).

Podem ocorrer sequelas após a doença, como rigidez persistente, claudicação, falta de ganho muscular e de peso e doença respiratória crônica (ARTURSSON et al., 1999). Doses altas de oxitetraciclina podem causar colite, associada à proliferação de microrganismos como *Clostridium* spp. e *Salmonella* spp. (LEWIS et al., 2009). Todas as tetraciclinas quelam cálcio e magnésio, podendo causar hipotensão e colapso quando administrada muito rápida por via intravenosa (LEWIS et al., 2009).

### 3.1.7 Prevenção

As estratégias atuais de prevenção de doenças em animais domésticos são baseadas na redução da infestação de carrapatos, já que vacinas contra *A. phagocytophilum* ainda não estão disponíveis (STUEN et al., 2013). Parâmetros relacionados ao manejo, como suplementação alimentar, condições higiênicas, manejo reprodutivo e aplicação de acaricidas, apresentaram significância estatística quanto à prevalência de anti-*A. phagocytophilum* em soros equinos e o uso de acaricidas tem se mostrado um fator protetor contra a presença de anticorpos anti-*A. phagocytophilum* (OLIVEIRA et al., 2020).

### 3.1.8 Importância zoonótica

*Anaplasma phagocytophilum* apresenta importância veterinária e de saúde pública devido à sua natureza zoonótica, causando a Anaplasmoose Granulocítica Humana – AGH (SALEEM et al., 2018a). Enquanto os sinais clínicos em ruminantes podem ser o início súbito de febre alta (>41°C) e queda na produção de leite, e os sintomas em equinos, cães e gatos tendem a ser mais vagos e inespecíficos (STUEN et al., 2013), em pacientes humanos a suspeita clínica de AGH ocorrem quando sinais inespecíficos, como febre, dor de cabeça, mialgia, mal-estar, linfadenopatia e outros achados sistêmicos como anemia, leucopenia, trombocitopenia e elevação de AST e/ou ALT, estão presentes após exposição a carrapatos (LEPIDI et al., 2000). No entanto, doença febril inespecífica humana também apresenta uma vasta lista de diagnósticos diferenciais, incluindo anaplasmoose granulocítica humana, erliquiose monocítica humana, febre maculosa, tifo murino, leptospirose, febre amarela e dengue (CALIC et al., 2004).

A maioria das infecções humanas provavelmente resulta em manifestações clínicas mínimas ou inexistentes, semelhante a sintomas de gripe, 2 a 3 semanas após a exposição ao carrapato (STUEN et al., 2013). Complicações incluem falência de múltiplos órgãos, choque, hemorragia gastrointestinal e óbito (LEPIDI et al., 2000). Doxíciclina oral ou intravenosa tem sido eficaz no tratamento de casos clínicos de AGH, com melhora clínica em 24 a 48 horas (STUEN et al., 2013).

Mesmo com pesquisa em diferentes bases de dados, não foi encontrado nenhum relato que confirme ou sugira doença causada por *A. phagocytophilum* em humanos no Brasil. Dois casos de doença inespecífica relatados em Minas Gerais em 2004 foram sorologicamente negativos para diversas agentes causadores de doença inespecífica, inclusive *A. phagocytophilum*, mas detectou anticorpos anti-*Ehrlichia chaffeensis*, sendo as primeiras

suspeitas relatadas de erliquiose monocítica humana no país, cujo diagnóstico foi sugerido pelo exame de IFAT (CALIC et al., 2004).

## 3.2 Piroplasmose Equina

### 3.2.1 Etiologia

A PE é causada pelos protozoários intraeritrocitários *Babesia caballi*, *Theileria equi* e *Theileria haneyi*. Os gêneros *Theileria* e *Babesia* pertencem às famílias Theileriidae e Babesiidae e ordem Piroplasmida, dentro do filo Apicomplexa, mas a classificação de gênero ainda permanece controversa, já que *T. equi* apresenta características comuns aos gêneros *Theileria* spp. e *Babesia* spp. (WISE et al., 2013; TIROSH-LEVY et al., 2020a). *Theileria haneyi* foi descoberta nos EUA a partir de um cavalo negativo para *T. equi* em PCR, mas limítrofe positivo usando o teste sorológico de cELISA (KNOWLES et al., 2018).

### 3.2.2 Epidemiologia

A piropilasmose equina já é bem caracterizada sorológica, molecular e clinicamente, apresentando distribuição mundial, com exceção países considerados livres da doença. Poucos países são considerados não endêmicos, incluindo Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, Irlanda, Islândia, Groenlândia, Cingapura, Japão, Nova Zelândia e Austrália (SCOLES et al., 2011; SCOLES; UETI, 2015; TIROSH-LEVY et al., 2020a). Nesses países, a entrada e o trânsito animal são restritos e baseados na resposta sorológica ao agente (SCOLES et al., 2011). Vários estudos epidemiológicos relataram a circulação de *Theileria equi* no Brasil, através de métodos sorológicos e moleculares (HEIM et al., 2007; SALVAGNI et al., 2010; FERREIRA et al., 2016; PECKLE et al., 2013; NOGUEIRA et al., 2017; VIEIRA et al., 2018; SANTOS et al., 2019). Usando qPCR, Peckle et al. (2013) relataram positividade de 81% de *T. equi* em cavalos e 7,7% em carrapatos no estado do Rio de Janeiro.

A doença é endêmica na maior parte do mundo e demonstra uma tendência a estar se espalhando para climas mais temperados (TIROSH-LEVY et al., 2020a). A prevalência é variada e coincide com a distribuição dos vetores competentes para completar o ciclo da doença (DE WAAL, 1992; WISE et al., 2013). Logo, regiões de clima tropical e subtropical, como o Brasil, onde os carrapatos estão presentes durante todo o ano, são endêmicas para os protozoários (HEIM et al., 2007). Estima-se que 90% da população global de cavalos resida em áreas endêmicas (TIROSH-LEVY et al., 2020a). Nessas regiões, os casos clínicos ocorrerem o ano todo, o que pode ser relacionado a infecções subclínicas ou assintomáticas, típicas de áreas endêmicas, ou pela presença contínua de carrapatos em regiões onde as condições climáticas são amenas durante o inverno (ZOBBA et al., 2008).

As taxas de infecção de equinos domésticos em regiões endêmicas são frequentemente superiores a 60%, sendo que a maioria destes está persistentemente infectado sem qualquer sinal de doença clínica (SCOLES; UETI, 2015). Em áreas consideradas endêmicas, existem subpopulações de cavalos que diferem na exposição a carrapatos vetores e, conseqüentemente, à infecção por PE e ao desenvolvimento de imunidade (TIROSH-LEVY et al., 2020a).

A prevalência geral de *T. equi* é maior do que a de *B. caballi* em todo o mundo e em todos os continentes (TIROSH-LEVY et al., 2020a). A soroprevalência mundial de *T. equi* e *B. caballi* é de 33,2% e 20,5%, respectivamente, enquanto a prevalência molecular para essas duas espécies é de 34,6% e 7,5%, respectivamente (TIROSH-LEVY et al., 2020a). A prevalência de ambos os parasitos foi maior na África, América do Sul e Central, Europa e Ásia; a prevalência na região do Mediterrâneo e no Oriente Médio foi geralmente maior do que no norte da Europa e no Extremo Oriente (TIROSH-LEVY et al., 2020a).

A semelhança entre a prevalência sorológica e molecular é consistente com a manutenção do parasito ao longo da vida do hospedeiro (TIROSH-LEVY et al., 2020a). Ambos os protozoários são capazes de persistir nos cavalos, mas apenas *B. caballi* é capaz de ser transmitido através das gerações de carrapatos, que se transformam em reservatórios do protozoário (WISE et al., 2013). No entanto, a soroprevalência global de *B. caballi* é consideravelmente maior que sua prevalência molecular e esse fato pode ser atribuído à eliminação do parasito, com persistência de anticorpos (TIROSH-LEVY et al., 2020a). Em áreas endêmicas, os animais geralmente são expostos desde novos, desenvolvendo imunidade e, como a infecção por *T. equi* geralmente dura toda a vida, a prevalência observada tende a aumentar com a idade e os cavalos passam a atuar como principal reservatório dos parasitos (TIROSH-LEVY et al., 2020a).

A prevalência de *B. caballi* tende a ser maior em animais mais jovens (TIROSH-LEVY et al., 2020a). Infecção persistente em hospedeiros mamíferos, juntamente com a reprodução no carrapato vetor, promove a dispersão entre diferentes hospedeiros, proporcionando assim um ambiente que facilita a evolução contínua dos parasitos, expostos a um conjunto distinto de pressões seletivas que pode levar a possíveis mudanças na virulência, transmissibilidade, detectabilidade e imunogenicidade dos parasitos (KNOWLES et al., 2018). A virulência envolve a capacidade do agente em causar doença e relacioná-la a taxa de mortalidade, pico de parasitemia e declínio do hematócrito em cavalos esplenectomizados (SEARS et al., 2022). A alta taxa de sobrevivência (87,5%) observada em cavalos esplenectomizados e infectados por *T. haneyi*, além da parasitemia menor, quadro clínico discreto e alterações mínimas nos parâmetros hematológicos, sugerem que o parasito possa ser menos virulento quando comparado a *T. equi* (SEARS et al., 2019; SEARS et al., 2022).

A principal via de transmissão para equídeos é vetorial, pelo repasto de sangue por carrapatos infectados (TIROSH-LEVY et al., 2020a). Por ser uma relação próxima e coadaptada, a associação vetor-hospedeiro é restrita a apenas algumas espécies de carrapatos competentes e a sua presença é crítica para a epidemiologia da PE, mas outros fatores, como comportamento, abundância e distribuição do vetor, podem afetar a dinâmica da transmissão (SCOLES; UETI, 2015). Pelo menos 33 espécies de carrapatos ixodídeos em seis gêneros foram listados como vetores competentes para *B. caballi*, *T. equi* ou ambos (SCOLES; UETI, 2015). Nos carrapatos, *T. equi* é transmitido transtetradialmente ou intraestadialmente e *B. caballi* é transmitido por via transovariana e intraestadial (SCOLES; UETI, 2015). Transmissão transplacentária de *T. equi* também pode ocorrer, levando a abortos, natimortos, infecção neonatal ou nascimento de potro portador (WISE et al., 2013; TIROSH-LEVY et al., 2020b). Na nova espécie, denominada *Theileria haneyi*, embora seja esperada a sua transmissão também por carrapatos, os vetores específicos ainda não foram identificados (KNOWLES et al., 2018).

Espécies do complexo *Amblyomma cajennense* não tem sua competência vetorial transtetradial comprovada, mas demonstrou ser um vetor intraestadial competente, além de ter sido o principal vetor encontrado em animais acometidos por piroplasmose em um surto no Texas em 2009 (SCOLES et al., 2011; SCOLES; UETI, 2015). Os carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* alimentados em condições de baixa parasitemia, durante infecções crônicas de *T. equi*, adquiriram o parasito, que foi detectado nas glândulas salivares, e conseguiram transmiti-lo para um cavalo não-infectado, confirmando por esfregaço sanguíneo, cELISA e PCR (UETI et al., 2005). Espécies do gênero *Rhipicephalus* spp. são listadas como vetor de piroplasmas, sendo altamente suscetíveis à infecção e frequentemente associados a surtos de *T. equi*, mas como este é um carrapato monoxeno e *T. equi* não é transmitido por via transovariana, não está claro qual o papel que esse carrapato desempenha nos ciclos de transmissão natural (SCOLES; UETI, 2015). *Dermacentor (Anocentor) nitens* é vetor de *B. caballi*, mas não é comprovada a sua ação como vetor de *T. equi*, embora exista uma associação epidemiológica com esse parasito (SCOLES et al., 2011; SCOLES; UETI, 2015).

Espécies dos gêneros *Haemaphysalis* spp. e *Hyalomma* spp. também demonstraram competência para transmissão de piroplasmidas (SCOLES; UETI, 2015).

Os agentes da PE também apresentam diferentes genótipos, que podem variar de acordo com a localização de origem. A maioria das sequências do gene 18S rRNA de *T. equi* pertencem ao genótipo A, que foram relatados em vários locais e em todos os continentes; o genótipo B foi relatado apenas na África e na área do Mediterrâneo; o genótipo C também foi relatado em todos os continentes, mas principalmente no Brasil; o genótipo D foi relatado principalmente na África, na região do Mediterrâneo e no Oriente Médio; e o genótipo E foi relatado apenas na Ásia e na Europa (TIROSH-LEVY et al., 2020a). Sequências do gene 18S rRNA de *B. caballi* demonstram ser a maioria do genótipo A, seguida do genótipo B1 e do genótipo B2; quando analisadas as sequências do gene rap-1 de *B. caballi*, o principal genótipo foi o B, seguido do A1 e depois o A2 (TIROSH-LEVY et al., 2020a). Em áreas endêmicas, muitos cavalos podem ser co-infectados com vários genótipos, embora não haja uma correlação entre o genótipo e a patogenicidade, é provável que as relações entre parasitos ou genótipos dentro do hospedeiro faça parte da manutenção da estabilidade enzoótica em áreas endêmicas (TIROSH-LEVY et al., 2020a).

### 3.2.3 Patogenia

As espécies de parasitos que causam PE têm ciclos de vida complexos, incluindo um estágio haploide que se replica assexuadamente no hospedeiro mamífero e um estágio sexual diploide no carrapato, que é o hospedeiro definitivo e o vetor biológico desses parasitos (SCOLES; UETI, 2015). Os carrapatos absorvem gametócitos e merozoítos dos eritrócitos infectados através do repasto sanguíneo, e a reprodução sexuada dos parasitos ocorre no intestino médio do carrapato (gamogonia), formando cinetos (WISE et al., 2013; SCOLES; UETI, 2015). Os cinetos migram para as glândulas salivares do carrapato e vão se desenvolver de maneira variável dependendo da espécie envolvida (WISE et al., 2013). Nas glândulas salivares ocorre uma rodada de replicação assexuada (esporogonia), gerando os esporozoítos haplóides infectantes que serão transmitidos aos equinos durante o repasto sanguíneo (WISE et al., 2013; SCOLES; UETI, 2015). Nos carrapatos, os cinetos se movem pela hemolinfa e infectam vários órgãos internos, incluindo os ovários, o que permite a transmissão vertical (SCOLES; UETI, 2015).

Esporozoítos infecciosos de *B. caballi* e *T. equi* são transmitidos da saliva do carrapato para o equino, invadindo hemácias, onde irão se desenvolver em trofozoítos e depois em merozoítos, que vão ser liberados para infectar novos eritrócitos após a lise celular (WISE et al., 2013). *Theileria equi* passa por dois estágios de replicação assexuada no equino: esporozoítos invadem primeiramente células mononucleares do sangue periférico (esquizogonia) desenvolvendo esquizontes, que invadem os eritrócitos (merogonia) e formam merozoítos para infectar outras hemácias aproximadamente após 9 dias (WISE et al., 2013; SCOLES; UETI, 2015). *Babesia caballi* passa por apenas um estágio de replicação assexuada no equino: esporozoítos infectantes de *B. caballi* invadem os glóbulos vermelhos diretamente (merogonia) para formar os merozoítos (SCOLES; UETI, 2015). Alguns merozoítos se desenvolvem em gametócitos no sangue periférico e serão absorvidos pelos carrapatos para a manutenção do ciclo (WISE et al., 2013). A infecção a longo prazo é perpetuada através da infecção e proliferação de merozoítos nos eritrócitos, tornando este estágio de merozoíto mais relevante para a intervenção quimioterapêutica (HINES et al., 2015).

A patogênese da piroplasmose inclui a transmissão por carrapatos e lise de hemácias, o que leva a variados graus de anemia hemolítica, icterícia e doença sistêmica com sinais inespecíficos (WISE et al., 2013). A anidrase carbônica é a proteína mais abundante dos eritrócitos e regula a homeostase interna dessas células. A lesão das hemácias, característica da

piroplasmose, é indicada pelo aumento da atividade da anidrase carbônica no plasma, resultado da liberação dessa enzima para o espaço extracelular (DEDE et al., 2008). A hemólise ocorre por ação do complemento, macrófagos, granulócitos e células natural killer, assim como pelo baço (KNOWLES et al., 1994).

Proteínas e fosfolipídios de membrana de eritrócitos e a concentração de malondialdeído (MDA) demonstram um aumento conforme a parasitemia fica maior, indicando que alterações na composição da membrana de hemácias, devido a presença do parasito e ao estresse oxidativo, podem ser responsáveis pelos sinais clínicos e alterações laboratoriais (AMBAWAT et al., 1999). Na PE, o maior nível de MDA pode ser devido à peroxidação lipídica e ao dano oxidativo nos eritrócitos causado pela interação dos ácidos graxos poliinsaturados na estrutura da membrana eritrocitária com as espécies reativas de oxigênio (ÖZDEK et al., 2020). Alterações na composição da membrana de eritrócitos favorecem a hemólise tanto por danos oxidativos quanto pela fagocitose por neutrófilos/monócitos, devido à presença de antígeno de origem parasitária depositado, aderido ou transportado para a superfície eritrocitária (AMBAWAT et al., 1999).

A resposta inflamatória de fase aguda, que é uma reação de defesa inespecífica, é estimulada como resultado do dano tecidual causado por parasitos ou outros agentes infecciosos, e estimulada por citocinas pró-inflamatórias liberadas de leucócitos ativados na área de dano tecidual (ÖZDEK et al., 2020). As citocinas também atuam na migração e ativação leucocitária. Uma vez ativados, os macrófagos eliminam os parasitos produzindo mediadores tóxicos, como os agentes oxidantes peroxinitrito e superóxido (ÖZDEK et al., 2020). Citocinas e óxido nítrico (NO) são moléculas importantes para a imunidade, ajudando na eliminação do parasito, mas sua produção de maneira desregulada pode contribuir para os danos teciduais (HANAFUSA et al., 1998; ÖZDEK et al., 2020). Com isso, o processo inflamatório e o estresse oxidativo se tornam parte da manifestação clínica da doença.

A avaliação da expressão do mRNA de citocinas em cavalos infectados experimentalmente por *B. caballi*, demonstrou aumento de TNF- $\alpha$  e o pico da expressão de citocinas está associado ao aumento da temperatura corporal (HANAFUSA et al., 1998). Cavalos soropositivos para *T. equi* apresentaram concentrações séricas de MDA, IFN- $\gamma$ , ferro, cloreto, sódio e cobre e concentrações de glutathiona (GSH), albumina, capacidade total de ligação do ferro (TIBC), cálcio, fósforo, magnésio, potássio, zinco, manganês e atividade enzimática de catalase (CAT) menores quando comparadas aos cavalos saudáveis (ÖZDEK et al., 2020). A piroplasmose equina também afeta acentuadamente os biomarcadores de estresse oxidativo, com aumento do estado oxidante total e diminuição da capacidade antioxidante total (TAC) e da atividade da paraoxonase e da arilesterase (BASIT et al., 2020). O aumento dos parâmetros oxidantes e a diminuição dos parâmetros antioxidantes devido à infecção por *T. equi* indicam que o estresse oxidativo ocorre em equinos infectados (ZAEEMI et al., 2016; ÖZDEK et al., 2020). A diminuição observada nos antioxidantes pode ser causada pelo seu uso na eliminação de oxidantes que são produzidos de maneira aumentada nas infecções parasitárias (ÖZDEK et al., 2020).

O estresse oxidativo é definido como a ruptura do equilíbrio existente entre pró-oxidantes e antioxidantes em favor dos pró-oxidantes, levando a lesão celular (ÖZDEK et al., 2020). Assim, é necessário que o organismo consiga equilibrar a produção de citocinas e espécies reativas de oxigênio para controlar a parasitemia e sobreviver à doença. A presença de antioxidantes enzimáticos intracelulares e endógenos não enzimáticos é importante para garantir e manter o equilíbrio oxidativo (ÖZDEK et al., 2020). Em contrapartida, o sistema imune participa do controle dessa reação inflamatória, já que em cavalos submetidos a imunodepressão com dexametasona, a produção de NO aumentou significativamente mesmo com um baixo nível de parasitemia (0,23%), levando os animais ao óbito (HANAFUSA et al., 1998). No entanto, o NO participa do controle da parasitemia. O tratamento com um inibidor

de NO (aminoguanidina) em um cavalo resultou no aumento da parasitemia (0,74%) e no óbito do animal (HANAFUSA et al., 1998).

Cavalos infectados com *T. equi* também apresentam alterações nos níveis plasmáticos de microelementos (DEDE et al., 2008). Microelementos têm importantes funções bioquímicas no sistema imunológico, respiração celular e processos redox, funcionando como cofatores ou componentes de compostos orgânicos na ativação de sistemas enzimáticos (DEDE et al., 2008; ÖZDEK et al., 2020). Dessa forma, é necessário um suprimento adequado para as células imunes manterem a estrutura e a função das metaloproteínas nas respostas às infecções, além de afetar a síntese e secreção de citocinas e quimiocinas que modulam as atividades de células imunes (DEDE et al., 2008). São essenciais para sistemas antioxidantes contra danos induzidos por radicais livres e a redução desses elementos em equídeos infectados pode proporcionar condições para ocorrência de estresse oxidativo (ZAEEMI et al., 2016). Os distúrbios nas concentrações de microelementos observados são geralmente o resultado de um mecanismo complexo, incluindo seu uso nos sistemas enzimáticos, efeito indireto da infecção, alterações hormonais e aumento da demanda pelo próprio parasito, enquanto as alterações em macrominerais podem estar relacionadas a déficit nutricional, má absorção intestinal, desidratação e distúrbios renais (ÖZDEK et al., 2020). As alterações em biomarcadores de estresse oxidativo em cavalos soropositivos, ocorre principalmente durante o inverno, destacando o impacto sazonal da doença (BASIT et al., 2020). Durante o inverno, a queda da qualidade dos alimentos ofertados aos cavalos pode ser um fator importante para as mudanças encontradas no estado oxidante, o que pode contribuir para a ocorrência de mais casos clínicos em áreas endêmicas nessa estação.

Cavalos afetados por piroplasmose também podem desenvolver baixo desempenho e miopatia inflamatória, possivelmente resultado de uma patogênese imunomediada com regulação positiva de citocinas inflamatórias: na imunohistoquímica, foi identificada imunorreatividade das fibras musculares para complexos maiores de histocompatibilidade (MHC) classes I e II e populações de linfócitos T, principalmente CD3+, CD8+ e CD4+; na imunofluorescência indireta do soro de cavalos afetados para ligação de imunoglobulinas a seções de músculo equino normal foi observada coloração distinta do sarcolema, indicando presença de autoanticorpos circulantes contra antígenos musculares; a RT-PCR de músculos de animais afetados revelou um aumento significativo de INT- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$  (PASOLINI et al., 2018).

Uma vez que há algum grau de parasitemia, os protozoários são transportados por todo o corpo, podendo atingir diversos tecidos. Em éguas gestantes, a theileriose pode ser transmitida entre 40 e 150 dias de gestação, que corresponde ao estágio de nutrição histotrófica, antes do desenvolvimento completo da placenta, quando o embrião é exposto a eritrócitos maternos que podem fornecer uma via direta para a passagem de parasitos (ALLSOPP et al., 2007; SOUSA et al., 2017). Em áreas endêmicas, a infecção congênita por *T. equi* em potros parece ter uma ocorrência relativamente normal, sem necessariamente resultar em abortos, natimortos ou piroplasmose neonatal (ALLSOPP et al., 2007; SANT et al., 2016). Provavelmente, perda embrionária precoce, abortos e natimortos causados pela PE estão mais relacionados à infecção e resposta sistêmica da própria égua do que à infecção do feto. Insuficiência placentária por lesão tecidual mediada por citocinas e estresse oxidativo pode ser uma explicação para alguns casos. Por outro lado, o nível de parasitemia do feto também pode estar relacionado à consequência da infecção (ALLSOPP et al., 2007). No Brasil, aborto por infecção por *T. equi* já foi relatado: o feto abortado aos 7 meses de gestação apresentou alta parasitemia de eritrócitos (80%) pelas formas oval e cruz de Malta de *T. equi* demonstradas por microscopia de esfregaços de impressão de baço, fígado e cérebro e testou positivo para *T. equi* e negativos para *B. caballi* por PCR, assim como a égua (SOUSA et al., 2017). Há evidências de que a transmissão transplacentária de *B. caballi* também seja possível: de 91 amostras de DNA de potros testadas

por qPCR, 7 (8%) das amostras de sangue total foram positivas para *T. equi* e 6 (7%) (5 amostras de sangue total e 1 baço de um feto abortado aos 8,5 meses) foram positivos para *B. caballi* (SANT et al., 2016). Os cinco potros positivos para *B. caballi* não apresentaram anormalidades clínicas no primeiro mês pós-parto (SANT et al., 2016). O feto abortado positivo para *B. caballi* por PCR estava sendo gestado por uma égua que foi sorologicamente positiva e PCR negativa para *B. caballi* no quinto mês de gestação e o exame de necropsia revelou placentite leve a moderada e septicemia como a causa do aborto (SANT et al., 2016). É possível que reagudização de uma parasitemia inicialmente indetectável ou nova infecção tenha levado às alterações na placenta que resultaram no aborto.

Potros infectados durante a vida intrauterina nascem sorologicamente negativos e só após a colostragem mostram títulos de anticorpos positivos e resultados positivos flutuantes na PCR; assim, os anticorpos colostrais demonstram não eliminar a infecção congênita por *T. equi*, mas podem estar envolvidos no controle da parasitemia, permitindo o desenvolvimento de um estado endemicamente estável e reduzindo a incidência de piroplasmose neonatal clínica (ALLSOPP et al., 2007). A presença de anticorpos contra piroplasmas equinos ocorre devido à ingestão de colostro, já que os fetos equinos só começam a desenvolver células produtoras de anticorpos após 240 dias de gestação e, devido ao tipo de placentação, dependem de anticorpos colostrais para o estabelecimento de resposta imune nos primeiros meses de vida (SANT et al., 2016). Pela presença de parasitos desde fases iniciais da gestação, o organismo pode reconhecê-los como próprios, já que a transmissão ocorre muito antes do sistema imunológico fetal estar suficientemente desenvolvido para reconhecer moléculas como estranhas (ALLSOPP et al., 2007). Devido à transferência de anticorpos pelo colostro um potro nascido de uma égua soropositiva para *T. equi* tem 55,7 vezes mais chances de ser sorologicamente positivo para *T. equi* do que um potro nascido de uma égua soronegativa para *T. equi*; da mesma forma, um potro nascido de uma égua soropositiva para *B. caballi* tem 39,4 vezes mais chances de ser sorologicamente positivo para *B. caballi* do que um potro nascido de uma égua sorologicamente negativa para *B. caballi* (SANT et al., 2016). Os anticorpos colostrais duram apenas pelos primeiros meses de vida do potro e conforme essa proteção vai diminuindo a susceptibilidade à doença aumenta e a maioria de potros em áreas endêmicas são infectados até 2 anos de idade (WISE et al., 2013). Por isso o desenvolvimento de imunidade prolongada vai depender de nova exposição ao protozoário para estimular a produção própria de anticorpos.

Piroplasmose clínica neonatal pode ocorrer quando o feto está infectado e não ocorreu transferência de anticorpos suficientes durante a colostragem. Éguas sorologicamente positivas que tiveram potros sorologicamente negativos podem ter passado por uma diminuição dos níveis de anticorpos específicos coincidindo com o período de produção do colostro e os baixos níveis de anticorpos passados para o potro podem não ser em quantidade suficiente para um resultado sorológico positivo (SANT et al., 2016). Outra possibilidade é a ingestão insuficiente de colostro durante o período de capacidade de absorção de imunoglobulinas no intestino do potro, caracterizando falha na transferência de imunidade passiva. Se não há anticorpos suficientes, a parasitemia pode aumentar e causar o quadro clínico característico da doença em potros recém-nascidos.

Durante a necropsia, animais infectados por piroplasmídeos podem apresentar variado grau de emagrecimento, anemia, edema de subcutâneo e icterícia; linfonodos aumentados; pulmões congestos e edematosos, com petéquias e efusão pleural; ascite, hidrotórax, efusão pericárdica, hemorragias petequiais epi e endocárdicas; fígado aumentado, edemaciado e pálido, com bordas arredondadas e necrose centrolobular; baço fibrosado, aumentado, com algumas hemorragias e evidentes processos fagocíticos aumentados, incluindo macrófagos contendo eritrócitos em seu citoplasma (eritrofagocitose), muitas vezes contendo parasitos; rins aumentados, pálidos a avermelhados, com poucas petéquias e cápsula um pouco aderida; eritrofagocitose ativa em macrófagos dos linfonodos, baço, fígado e pulmões (ALLEN et al.,

1975 a; DE WAAL, 1992; KNOWLES et al., 1994; HANAFUSA et al., 1998; WISE et al., 2013). As alterações musculares em cavalos cronicamente infectados são comuns mas em diferentes graus: infiltrado leucocítico nos músculos, ao redor dos vasos sanguíneos perimisiais e endomisiais (perivasculite) e no endomísio, variado grau de atrofia das fibras não angulares, anormalidades mitocondriais, principalmente nas fibras musculares adjacentes aos infiltrados inflamatórios, fibras necróticas associadas à sarcoclastose (fagócitos invadindo fibras necróticas), fibras degeneradas hipereosinofílicas, redondas e edemaciadas e fibrose perimisial leve; quanto maior os escores de inflamação e presença de MHC I, maior o grau de atrofia muscular encontrada (PASOLINI et al., 2018). Os fetos abortados por infecção por *T. equi* demonstram congestão de órgãos, icterícia, sangue com baixa viscosidade, petéquias nas superfícies pulmonares e espleno e hepatomegalia pronunciadas; mas nem sempre a placenta e tecidos fetais demonstram alterações histopatológicas como inflamação e necrose (SOUSA et al., 2017). Isso reforça a teoria de que a infecção intrauterina não depende de alterações na placenta.

A resposta do sistema imune na PE ainda não é totalmente compreendida, mas é aceito que ambos os parasitos podem transformar o cavalo em um portador, conferindo proteção contra novas infecções (WISE et al., 2013). Sabe-se que o baço é um órgão importante no controle dos hemopatógenos (WISE et al., 2013). Esse órgão é responsável pela hemocaterese, removendo hemácias envelhecidas e/ou danificadas da circulação. O controle da piroplasmose envolve uma resposta imune específica mediada por linfócitos T e B, com produção de anticorpos detectáveis a partir de 7 dias da infecção, em animais normais (KNOWLES et al., 1994). Respostas com anticorpos são detectadas de 7 – 11 dias após a infecção natural, com pico de produção com 30 a 45 dias (WISE et al., 2013). Aparentemente, a infecção primária com *T. haneyi* pode atrasar o tempo para a detecção de anticorpos anti-*T. equi*, mas o inverso parece não ocorrer (SEARS et al., 2019). A coinfeção com *T. equi* e *T. haneyi* também parece alterar a resposta imune, persistência dos parasitos após tratamento e gravidade dos sinais clínicos. Após dois ciclos de tratamento, em cavalos co-infectados com *T. equi* e *T. haneyi*, no grupo em que a infecção inicial foi realizada com *T. haneyi* valores de *T. equi* no cELISA mantiveram-se superiores a 80%, em contraste ao grupo com infecção inicial de *T. equi* que exibiram valores decrescentes no cELISA (SEARS et al., 2020). Dessa forma, a ordem de infecção poderia desempenhar um papel na capacidade de resistência de *T. equi* ao tratamento (SEARS et al., 2020).

Sem tratamento, os cavalos infectados com PE geralmente permanecem persistentemente infectados (portadores assintomáticos) por períodos prolongados ou por toda a vida (WISE et al., 2013; TIROSH-LEVY et al., 2020a). A infecção pode se manter cronicamente por mecanismos de sequestro pelo organismo hospedeiro e por estratégias de evasão do sistema imune (WISE et al., 2013). *Theileria haneyi* é capaz de estabelecer infecção na presença de imunidade anti-*T. equi* e co-persistir de longo prazo com *T. equi* (SEARS et al., 2019). Pode ocorrer remissão da infecção por *B. caballi* mesmo sem tratamento (WISE et al., 2013).

A infecção crônica permite o desenvolvimento de imunidade adaptativa, o que pode contribuir para a manutenção de uma parasitemia mais baixa e sinais clínicos muito discretos ou inaparentes, além de permitir um controle mais rápido durante os períodos de recrudescência (SEARS et al., 2022). Em animais portadores, situações que levem a uma queda da imunidade podem provocar a reagudização da doença e o aparecimento de sinais clínicos. Cavalos de esporte, por exemplo, quando submetidos a rigorosos programas de treinamento, podem ter sua imunocompetência afetada e permitir a reativação de infecções subclínicas (RISSO et al., 2022). A capacidade de persistência assintomática pode permitir o aumento da oportunidade de transmissão e promover mudanças evolutivas competitivas no parasito (SEARS et al., 2019).

### 3.2.4 Sinais clínicos

As manifestações clínicas da PE após a infecção com qualquer espécie de parasito variam de infecção inaparente a doença aguda grave (TIROSH-LEVY et al., 2020a). Os sinais clínicos comuns são inespecíficos e incluem: febre, apatia ou letargia, hiporexia ou anorexia, perda de peso, baixo escore de condição corporal, pelame de baixa qualidade, queda de performance, membranas mucosas pálidas ou congestionadas, icterícia, hemoglobinúria, taquicardia, taquipneia, linfonodos aumentados, desidratação leve, polidipsia, secreção ocular ou nasal, edema (ventral, de pálpebras, de membros ou pulmonar), atrofia muscular, mialgia, sudorese, sinais de cólica, esplenomegalia, hepatomegalia, hemorragia, dispneia, tosse e, eventualmente, levar à falência de órgãos e óbito (DE WAAL, 1992; HANAFUSA et al., 1998; ZOBBA et al., 2008; TAKEET et al., 2009; KNOWLES et al., 2018; PASOLINI et al., 2018; SEARS et al., 2019; TIROSH-LEVY et al., 2020a; SEARS et al., 2022). O tempo de coagulação pode ser normal ou aumentado (WISE et al., 2013). Potros podem ser infectados durante a gestação, demonstrando sinais logo ao nascimento ou após 2 ou 3 dias (piroplasmose neonatal), tornando-se progressivamente letárgicos, incapazes de levantar-se e mamar, podem apresentar febre, icterícia e petequiações (DE WAAL, 1992; SANT et al., 2016).

Exames hematológicos de cavalos com a infecção por *T. equi*, *T. haneyi* e *B. caballi* normalmente demonstram anemia, com redução do hematócrito, contagem de hemácias e concentração de hemoglobina, também podendo ocorrer leucopenia por neutropenia e/ou linfopenia, ou leucocitose discreta por neutrofilia e/ou linfocitose, monocitose, trombocitopenia ou trombocitose, hiper ou hipofibrinogenemia (ALLEN et al., 1975a; DE WAAL et al., 1987; DE WAAL, 1992; ZOBBA et al., 2008; TAKEET et al., 2009; PASOLINI et al., 2018; SEARS et al., 2019; BASIT et al., 2020; SEARS et al., 2022). Cavalos infectados por *T. equi* apresenta neutropenia mais marcada do que aqueles com *T. haneyi*, que demonstram neutropenia ou neutrofilia madura com alterações tóxicas leves (SEARS et al., 2019). Também pode acontecer de os parâmetros hematológicos estarem normais (ZOBBA et al., 2008).

Na bioquímica sérica, as alterações podem ser ainda mais inespecíficas. Podem ser encontrados hiperbilirrubinemia, alteração nas enzimas hepáticas (atividades aumentadas de ALP, AST e GGT), hiperproteinemia, hipoalbuminemia, hiperglobulinemia, diminuição da razão albumina:globulina, aumento das concentrações de ureia, lactato, glicose, triglicerídeos e de VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade), atividade de CK aumentada, concentrações diminuídas de colesterol total e HDL, aumento de sódio e cloreto, diminuição ou aumento de fósforo, ferro e cobre, redução de cálcio, magnésio, potássio, zinco e manganês e maior relação cobre/zinco (ALLEN et al., 1975a; DE WAAL et al., 1987; DE WAAL, 1992; DEDE et al., 2008; ZOBBA et al., 2008; TAKEET et al., 2009; ZAEEMI et al., 2016; PASOLINI et al., 2018; ÖZDEK et al., 2020).

A doença inespecífica causada por piroplasmidas não permite a diferenciação clínica de qual espécie é a responsável pela manifestação clínica. No entanto, cavalos infectados por *T. haneyi*, ou co-infectados com *T. haneyi* e *T. equi*, apresentaram apenas doença leve a inaparente (SEARS et al., 2020). A infecção por *T. haneyi* mostra-se clinicamente discreta, com apenas mudanças leves nos parâmetros do exame físico, e evolui subsequentemente para um estado de infecção assintomática persistente (KNOWLES et al., 2018; SEARS et al., 2019; SEARS et al., 2020; SEARS et al., 2022). Mesmo após esplenectomia, os sinais clínicos da infecção aguda são leves e transitórios, apresentando apenas períodos breves e intermitentes de fraqueza e intolerância ao exercício e não ocorrendo o desenvolvimento de hemoglobinúria ou icterícia (SEARS et al., 2022). A infecção por *T. equi*, ao contrário, geralmente leva a um pico de parasitemia consistentemente maior e a um maior declínio no hematócrito, resultando em hemoglobinúria, icterícia, fraqueza e intolerância ao exercício (SEARS et al., 2022).

Assim como na AGE, muitos dos sinais clínicos podem ser explicados pela estimulação pró-inflamatória gerada pela presença dos parasitos. O estresse oxidativo pode levar não só à hemólise intravascular, como também a lesões em diversos tecidos, resultando em mais sinais inespecíficos. A lesão endotelial, por exemplo, é capaz de causar edema em diferentes regiões, inclusive no pulmão, podendo levar à dispnéia e morte em casos muito graves (HANAFUSA et al., 1998). Alterações na composição da membrana de eritrócitos podem estar relacionadas com o aumento da rigidez celular e redução da deformabilidade, o que contribuiria para a estase vascular e, conseqüentemente, para a formação de edemas e trombos (AMBAWAT et al., 1999).

Independentemente dos sinais clínicos, a maioria dos animais demonstram algum grau de anemia e a queda do hematócrito é um bom indicador de alteração patológica precoce induzida pelos piroplasmas, sendo uma ferramenta barata e útil para o clínico monitorar o paciente (DE WAAL et al., 1987; WISE et al., 2013). A anemia tende a ser mais severa em animais que demonstraram maior parasitemia (ALLEN et al., 1975a). Após a patência, os cavalos infectados com *T. equi* apresentam um declínio constante na contagem de eritrócitos, hematócrito e níveis de hemoglobina, breve linfocitose seguida de leucocitose e uma resposta febril coincidindo com o pico de parasitemia, reduzindo gradativamente até que os parasitos sejam eliminados, momento a partir do qual ocorre um aumento da hematopoiese (OLADOSU; OLUFEMI, 1992). A anemia ocorre devido à hemólise intravascular promovida pela infecção, de maneira direta ou indireta, e pela remoção de hemácias infectadas no baço, indicada pelo aumento da atividade fagocítica do sistema retículo endotelial estimulado e proliferante, caracterizado pela esplenomegalia e a aparente alta atividade dos macrófagos (ALLEN et al., 1975a; WISE et al., 2013). A anemia é responsável pela coloração pálida das membranas mucosas e a icterícia acompanha o grau de hemólise intravascular. O maior grau de anemia ocorre junto ou logo após o pico de parasitemia ter sido atingido (SEARS et al., 2022). Animais pré-imunizados não demonstraram uma diminuição prolongada na contagem de hemácias, mostrando apenas reduções transitórias nos valores hematológicos (ALLEN et al., 1975a).

A leucocitose acompanhada de linfocitose apresentada após a fase hemolítica de *T. equi*, provavelmente ocorre como resultado da resposta imune à infecção (OLADOSU; OLUFEMI, 1992), enquanto a linfopenia pode estar relacionada à destruição celular após a primeira fase de replicação desse parasito.

Redução da contagem de plaquetas pode ocorrer de maneira variada por mecanismo ainda não conhecido, que pode incluir destruição imunomediada, sequestro esplênico e/ou excesso de consumo, como observado em casos de coagulação intravascular disseminada (ALLEN et al., 1975b; WISE et al., 2013). As plaquetas podem formar focos de trombos, devido a uma estase mais longa do que o normal do fluxo sanguíneo em alguns vasos ou podem ser fagocitados em grande número por um sistema retículo endotelial estimulado (ALLEN et al., 1975b). Os períodos de trombocitopenia também são próximos ao pico de parasitemia, precedendo o maior grau de anemia, o que sugere um possível envolvimento das plaquetas no controle dos parasitos (SEARS et al., 2022). Em animais pré-imunizados, os valores de plaquetas e fibrinogênio permanecem normais ou discretamente alterados (ALLEN et al., 1975b). Já a trombocitose pode ser fisiológica, secundária à contração esplênica, ou reativa, associada a inflamação, infecção ou neoplasia (WALTON, 2013).

A monocitose ocorre tipicamente quando os parasitos são observados por microscopia de luz, desenvolvendo picos de monócitos após o pico de parasitemia ter sido atingido, diminuindo à medida que os parasitos desapareciam (SEARS et al., 2022). Essa resposta foi observada em cavalo esplenectomizado, o que pode ser uma compensação para a falta de macrófagos da polpa vermelha do baço: outras células fagocíticas, como monócitos e neutrófilos, podem contribuir para a fagocitose e remoção de células infectadas da circulação (SEARS et al., 2022). É possível que resposta semelhante ocorra quando o sistema retículo

endotelial esteja saturado. O sistema retículo endotelial dos animais com piroplasmose aguda pode ficar temporariamente saturado com células fagocitadas, permitindo assim um acúmulo na circulação não apenas do número total de hemácias, mas também das células parasitadas, o que explicaria o aumento da contagem celular antes do primeiro pico de parasitemia (ALLEN et al., 1975a).

Alterações hepáticas podem repercutir na bioquímica sérica de animais infectados e a hepatomegalia é indicativo de que esse órgão é acometimento durante a PE. O aumento da bilirrubina coincide com o período de redução dos eritrócitos, hemoglobina e hematócrito e com o pico de parasitemia, mas não ocorre em animais pré-imunizados (ALLEN et al., 1975a). A hiperbilirrubinemia, achado bioquímico mais frequente, já é amplamente descrita na infecção natural como uma das consequências da anemia hemolítica, mas pode também estar relacionada à disfunção hepática (ZOBBA et al., 2008; ÖZDEK et al., 2020). Os níveis de triglicérides aumentados e os de colesterol total e HDL diminuídos podem ser causadas por disfunção hepática, alterando a produção ou remoção de triglicérides e a síntese normal de colesterol (ÖZDEK et al., 2020). Da mesma forma, aumentos das enzimas hepáticas podem estar relacionados com a redução do fluxo sanguíneo para o fígado (WISE et al., 2013). Aumento de proteína e globulina e diminuição de pode refletir uma resposta à estimulação antigênica, resposta inflamatória de fase aguda e/ou disfunção hepática (ÖZDEK et al., 2020). O aumento do nível de glicose em cavalos infectados pode ser devido ao estresse ou aumento do nível de cortisol ou devido ao aumento da mobilização de glicose (ÖZDEK et al., 2020).

Cavalos afetados por piroplasmose também podem desenvolver baixo desempenho e miopatia inflamatória (PASOLINI et al., 2018). A maior atividade de CK e AST pode refletir algum grau de dano muscular (ZAEEMI et al., 2016).

Alterações em microelementos podem ser atribuídas à presença do parasito nos eritrócitos do hospedeiro e às alterações bioquímicas que sua presença induz como parte dos mecanismos de defesa contra ele (DEDE et al., 2008). Níveis reduzidos de zinco podem ocorrer por alterações hormonais, aumento da demanda de zinco pelo próprio parasito ou como resultado de um efeito indireto da relação parasito-hospedeiro (DEDE et al., 2008). Níveis séricos de cobre significativamente mais altos podem estar relacionados à anemia e ao aumento de ceruloplasmina, um marcador inflamatório positivo de fase aguda, da qual é um componente importante (DEDE et al., 2008).

Apesar da parasitemia por *T. equi* ser igual em cavalos e burros, a infecção por esse hemopatógeno em cavalos levou a ocorrência de sinais clínicos mais graves e a mais alterações bioquímicas séricas em cavalos em comparação com burros, o que indica que os cavalos são mais sensíveis à infecção e isso parece ser devido a diferenças entre as espécies (ZAEEMI et al., 2016).

### 3.2.5 Diagnóstico

O diagnóstico da piroplasmose envolve o histórico, observação dos sinais clínicos, avaliação de esfregaços de sangue periférico em casos agudos, testes sorológicos em casos crônicos e inaparentes e testes moleculares em todas as fases. Após o tratamento, nos casos de quimioesterilização, a ausência de patógenos pode ser demonstrada pela combinação de testes indiretos e diretos, realizados de maneira seriada, para averiguar a diminuição dos títulos de anticorpos na sorologia e a ausência do parasito no exame de PCR (JOACHIM et al., 2022).

A sensibilidade da microscopia de esfregaços de sangue corados com Giemsa como método diagnóstico é baixa, levando a resultados falso-negativos, principalmente em casos crônicos e subclínicos, devido à baixa parasitemia (TIROSH-LEVY et al., 2020a). A parasitemia geralmente não ultrapassa 0,1 a 1% para *B. caballi* e 1 a 5% para *T. equi* na fase aguda da doença (DE WAAL, 1992; HEIM et al., 2007; WISE et al., 2014). Mesmo na fase

aguda, a parasitemia em equídeos infectados por *T. equi* pode não ultrapassar 0,01-0,03% (ZAEEMI et al., 2016). Na infecção aguda por *B. caballi*, ocorrem dois picos de parasitemia com aproximadamente 6 dias de diferença entre si, seguidos de redução dos valores hematológicos (ALLEN et al., 1975a). O pico de parasitemia de *T. haneyi*, em cavalos esplenectomizados, varia de 1,08 a 7,32%, observado dentro de 29 a 52 dias após a infecção (KNOWLES et al., 2018; SEARS et al., 2019). A parasitemia por *T. haneyi* demonstra ocorrer em ondas durante o curso da infecção, com alguns picos acontecendo em intervalos que variam de 9 a 20 dias, aproximadamente (SEARS et al., 2022).

Grandes merozoítos piriformes intraeritrocitários são detectados nas infecções por *B. caballi* (ZOBBA et al., 2008). *Theileria equi* demonstra pequenos merozoítos piriformes ou estágios esféricos/ovóides dentro de hemácias (ZOBBA et al., 2008), podendo ou não estar em formação de Cruz de Malta. *Theileria haneyi* demonstra merozoítos parasitando hemácias de tamanho menor quando comparados aos de *T. equi*, variando de formas esféricas imaturas a piriformes maduras, com formação em Cruz de Malta ocasionalmente (KNOWLES et al., 2018). Animais pré-imunizados apresentam parasitemia mais baixa, não sendo observados parasitos nos esfregaços sanguíneos (ALLEN et al., 1975a).

Infecções assintomáticas podem ser detectadas por exames sorológicos e/ou PCR (SCOLES et al., 2011). O diagnóstico sorológico tem melhor sensibilidade e especificidade para a detecção de cavalos portadores inaparentes, mas não fornecem informações sobre a carga parasitária atual (TIROSH-LEVY et al., 2020a).

Vários testes sorológicos foram desenvolvidos para a detecção da doença, principalmente dos casos crônicos e sem sinais clínicos, incluindo o teste de fixação de complemento (CFT), imunofluorescência indireta (IFAT), western blot e ensaio imunoenzimático competitivo (cELISA) (WISE et al., 2013). Enquanto CFT e IFAT apresentam boa especificidade e baixa sensibilidade, cELISA é considerado o método de detecção mais sensível para infecções crônicas de *T. equi* (WISE et al., 2013). Em outro estudo, o teste de anticorpos de imunofluorescência (IFAT) e cELISA deram resultados semelhantes para *T. equi*, mas com *B. caballi* o cELISA foi mais eficaz (JAFFER et al., 2010). Os cavalos infectados por *T. haneyi* demonstraram resultados negativos quando submetidos ao teste cELISA comercial para a presença de anticorpos anti-*T. equi* (KNOWLES et al., 2018). O cELISA é atualmente o teste recomendado pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) e pela Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) para triagem internacional de transporte de cavalos (TIROSH-LEVY et al., 2020a). O teste de fixação de complemento, anteriormente usado para o controle de trânsito, apresenta baixa sensibilidade, o que pode ter favorecido a ocorrência de surtos esporádicos em países livres da doença (SCOLES et al., 2011).

Títulos de anticorpos podem ser detectados por IFAT e CFT, respectivamente, entre os dias 10-19 e 12-38 para *T. equi* e 6-8 dias para *B. caballi*, por IFAT, após a infecção (DE WAAL et al., 1987). Não houve diferença significativa no tempo para o desenvolvimento de uma resposta detectável de anticorpos pelo cELISA para *T. equi* e *T. haneyi*, mas quando realizada avaliação por imunoblot, o tempo médio para detecção inicial de uma resposta de anticorpo à infecção primária com *T. equi* (11,67 dias) foi significativamente menor que o tempo médio para detecção de uma resposta de anticorpo para infecção primária com *T. haneyi* (26,67 dias) (SEARS et al., 2019). *Theileria haneyi* também parece atrasar a resposta de anticorpos anti-*T. equi* nas coinfeções, pois o tempo para detecção da infecção secundária com *T. equi* foi significativamente prolongado (51,3 dias) quando comparado com a resposta à inoculação primária desse agente (SEARS et al., 2019).

A reação da polimerase em cadeia (PCR) detecta a presença do organismo pela amplificação de fragmentos específicos do DNA, apresentando alta especificidade e alta sensibilidade (WISE et al., 2013). O diagnóstico molecular é mais sensível do que o exame

microscópico e clinicamente mais útil do que a sorologia, pois representam infecção atual, além de também ser capaz de diferenciar espécies e genótipos dos parasitos (TIROSH-LEVY et al., 2020a). O estado de parasitemia indetectável por PCR é consistente com eliminação aparente, mesmo que os animais não tenham sido submetidos ao tratamento (SEARS et al., 2022); mas testes moleculares e sorológicos seriados devem ser realizados para a confirmação da eliminação dos parasitos.

### 3.2.6 Tratamento

A PE é normalmente tratada dipropionato imidocarb, com variação na dosagem e frequência de administração de acordo com a suscetibilidade ou resistência das diferentes cepas, o propósito do tratamento e a resposta alcançada. O objetivo do tratamento muda de acordo com a região de ocorrência: em regiões endêmicas deve-se priorizar o controle da infecção, redução dos sinais clínicos e dos casos fatais, para manter infecções inaparentes, prevenindo surtos clínicos; nas regiões não endêmicas a doença deve ser erradicada (WISE et al., 2013; TIROSH-LEVY et al., 2020a). A quimioesterilização é raramente recomendada em áreas endêmicas, exceto quando os animais serão transportados para alguma região livre da doença ou para pesquisa, já que a presença dos parasitos é importante para a manutenção da imunidade (DE WAAL, 1992; WISE et al., 2013).

O dipropionato de imidocarb é uma diamidina dicática da série de carbanilidas de compostos antiprotozoários, e é a droga mais comumente usada para tratar infecções causadas por *T. equi* e *Babesia caballi* (HINES et al., 2015). O imidocarb é absorvido rapidamente após administração intramuscular única, mantendo uma concentração plasmática alta por aproximadamente 2h (BELLOLI et al., 2002). Devido a sua ampla distribuição em fluidos e tecidos corporais, após esse período, há um declínio acentuado na concentração, refletindo, uma fase de distribuição rápida seguida de uma eliminação mais lenta e, com 12h do tratamento, nenhuma concentração plasmática é detectável (BELLOLI et al., 2002). Em éguas gestantes, o imidocarb demonstrou conseguir ultrapassar a barreira placentária e foi detectado em fetos abortados em níveis semelhantes ao encontrado no sangue materno, o que sugere que o fármaco também estaria disponível para atividade antiparasitária na circulação fetal (LEWIS et al., 1999). O imidocarb é considerado o fármaco mais efetivo, tanto para controle quanto para quimioesterilização (WISE et al., 2013). A dosagem comumente utilizada é a de 2,2 mg/kg IM para o tratamento de *B. caballi* e 4,4 mg/kg IM para o tratamento de *T. equi*. No entanto, cerca de apenas 10% do medicamento se liga às células sanguíneas em cavalos e a sua curta persistência no sangue não pode ser considerada um bom comportamento cinético para uma droga contra hemopatógenos (BELLOLI et al., 2002).

*Theileria equi* é relativamente resistente à terapia, sendo necessário em alguns casos a repetição do tratamento para controlar a infecção (DE WAAL, 1992). Normalmente, essa repetição é realizada a cada 72h, por até 4 dias, tanto para o controle dos sinais clínicos quanto para a quimioesterilização. É importante lembrar que após dosagens repetidas aumenta-se o armazenamento nos tecidos reservatórios, como fígado e rim (BELLOLI et al., 2002), o que pode potencializar os efeitos tóxicos do imidocarb nesses órgãos, sem necessariamente prolongar a eliminação dos merozoítos, já que não será mantida concentração sanguínea o suficiente para tal. Além disso, vestígios de imidocarb liberados lentamente após o sequestro tecidual podem resultar em pressão de seleção prolongada, principalmente em locais onde o tratamento ocorre com frequência, como em países endêmicos (HINES et al., 2015), o que favorece o desenvolvimento de cepas resistentes ao tratamento. O ensaio *in vitro* de inibição do crescimento de *T. equi* usando imidocarb mostrou que a parasitemia de algumas cepas pode mais que dobrar mesmo em altas concentrações do fármaco e a exposição contínua a concentrações crescentes aumenta a concentração de inibição de 50% (IC50), sugerindo que a

resistência pode surgir em populações naturais de parasitos com exposição a imidocarb quando os animais são tratados, particularmente se a inibição completa do crescimento do parasito não puder ser alcançada (HINES et al., 2015). A inibição incompleta do parasito leva ao ressurgimento da parasitemia *in vivo*, o que aumenta a preocupação sobre o potencial de desenvolvimento de resistência nesses parasitos sobreviventes expostos ao medicamento (HINES et al., 2015). O dipropionato de imidocarb não é eficaz para a quimioesterilização de cavalos infectados com *T. haneyi* e parece ser inconsistentemente eficaz na eliminação de *T. equi* em cavalos co-infectados com *T. haneyi* (SEARS et al., 2020).

O desenvolvimento de resistência ao imidocarb é preocupante, pois existem poucas opções atualmente disponíveis para o tratamento da piroplasmose equina. Diaceturato de diminazeno é uma opção terapêutica, embora esteja relacionado com significativa lesão muscular no local de aplicação e não há descrição de quimioesterilização alcançada com o fármaco (WISE et al., 2013). Alguns cavalos demonstram recuperação da PE após tratamento com oxitetraciclina (ZOBBA et al., 2008). É possível que piroplasmas também sejam sensíveis à oxitetraciclina ou que os animais submetidos a esse tratamento conseguiram controlar a infecção, independentemente da ação do fármaco. Tratamento sintomático também deve ser instituído em casos agudos, incluindo hidratação, antiinflamatórios, analgésicos e, em alguns casos, transfusões sanguíneas (WISE et al., 2013).

Dada a escassez de opções de tratamento para *T. equi* e *T. haneyi* e o potencial de resistência aos medicamentos, novos estudos estão avaliando medicamentos alternativos. Os inibidores de quinase colidida (BKIs), por exemplo, vem sendo investigados para eficácia contra doenças protozoárias, atuando pela inibição seletiva de proteínas quinases apicomplexanas dependentes de cálcio (CDPKs), que são críticas para múltiplas funções fisiológicas parasitárias, mas que estão ausentes em vertebrados, tornando-os excelentes candidatos quimioterapêuticos (HINES et al., 2015).

### 3.2.7 Prevenção

Não existem vacinas para a PE e o controle é baseado em uma combinação de terapia medicamentosa, controle de vetores e transporte restrito de cavalos infectados (TIROSH-LEVY et al., 2020a). A má gestão das populações equinas, incluindo cuidados veterinários inadequados, má nutrição e excesso de trabalho, pode exacerbar os impactos da infecção (SCOLES; UETI, 2015).

Os carrapatos são vetores e hospedeiros definitivos dos protozoários, sendo um ponto crítico do controle e prevenção da doença, já que a manutenção dos parasitos em um ciclo natural de transmissão endêmica não pode ocorrer na ausência de vetores de carrapatos competentes, pois a transmissão por carrapatos é necessária para a conclusão do ciclo de vida (SCOLES; UETI, 2015).

### 3.3 Diagnósticos Diferenciais

Por apresentarem sintomatologia semelhante, é difícil realizar a distinção clínica de PE e AGE. As duas doenças cursam como uma síndrome febril inespecífica e compõem uma vasta lista de diagnósticos diferenciais. Síndromes febris inespecíficas em equinos podem estar relacionadas não só a PE e AGE, mas também a outras doenças de diferentes etiologias, incluindo influenza equina e outras infecções virais respiratórias, como herpesvírus equino, anemia infecciosa equina, tripanossomíase, leptospirose, doença hepática, púrpura hemorrágica, arterite viral equina, encefalites e outras vasculites imunomediadas (MADIGAN; GRIBBLE, 1987; DE WAAL et al., 1987; DE WAAL, 1992; BERMANN et al., 2002; LEWIS

et al., 2009; SALVAGANI et al., 2010; UEHLINGER et al., 2011; SISKA et al., 2013). Borreliose é outro diagnóstico a ser considerado (ARTURSSON et al., 1999). Embora pouco estudada no Brasil, a doença já foi descrita apresentando diferenças da doença de Lyme tradicionalmente encontrada no hemisfério norte e alguns estudos sorológicos em animais demonstraram a circulação da bactéria no país, mesmo sendo uma doença pouco diagnosticada em equinos e pouco compreendida por veterinários (BASILE et al., 2017).

Também é possível que a síndrome seja causada por outros agentes ainda desconhecidos ou por agentes aberrantes, que normalmente não causariam doença em cavalos, mas por uma debilidade no sistema imunológico pode levar à clínica. Seo et al. (2019), detectaram infecção por *Anaplasma bovis*, por meio de técnicas moleculares, em um cavalo de 23 anos na Coreia, causando sintomatologia inespecífica (baixo escore de condição corporal, febre, anorexia, letargia e desidratação). Através de PCR, em uma abordagem multigênica para detecção de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp., seguida de sequenciamento genético, na região centro-oeste do Brasil, 3/148 cavalos (2,03%) foram positivos para *E. minasensis*; embora o questionário clínico tenha revelado manifestações clínicas como apatia (1,35%), anemia (2,03%) e febre (0,7%) em alguns animais, não houve significância estatística entre esses sinais e os resultados de sorologia e PCR (MURARO et al., 2021b).

Nos Estados Unidos foi descoberta uma nova espécie de *Theileria*, denominada *Theileria haneyi*, a partir de um cavalo negativo para *T. equi* em PCR, mas limítrofe positivo usando um cELISA (KNOWLES et al., 2018). Semelhante a *T. equi*, a nova espécie é capaz de causar doença subclínica, aguda e crônica em cavalos, embora pareça que o parasito possa ser menos virulento do que outros isolados de *T. equi* e mais refratário ao tratamento com imidocarb (KNOWLES et al., 2018; SEARS et al., 2019; SEARS et al., 2020; SEARS et al., 2022).

A micoplasmose hemotrópica equina (MHE) é uma condição raramente relatada, sendo o relato de Happi e Oluniyi (2020) na Nigéria o terceiro caso no mundo. O cavalo apresentou achados clínicos inespecíficos (letargia, anorexia, perda de peso, pelagem áspera, desidratação, mucosas pálidas e parasitismo por carrapatos) e não respondeu ao tratamento para as infecções hemoparasitárias e bacterianas comuns e endêmicas; através de PCR, sequenciamento e análise filogenética foi identificada a presença de um micoplasma hemotrópico com mais de 98,7% de homologia com *Mycoplasma ovis*, *Candidatus Mycoplasma haemocervae* e *Mycoplasma wenyonii* (HAPPI; OLUNIYI, 2020). Embora a doença não tenha sido relatada no Brasil, foi detectado DNA de hemoplasma em 50% (22/11) dos cavalos e em carrapatos *D. nitens* e *R. microplus*, no estado do Paraná; o sequenciamento genético revelou identidade  $\geq 99\%$  com *M. ovis* (KAKIMORI et al., 2023).

### 3.4 Carrapatos Parasitos de Equinos no Brasil

No Brasil, os principais representantes da família Ixodidae que parasitam cavalos são o *Dermacentor (Anocentor) nitens*, conhecido como carrapato de orelha do cavalo, o *Amblyomma sculptum* e *Amblyomma cajennense* sensu stricto, popularmente chamados de carrapato estrela e pertencentes ao complexo *Amblyomma cajennense*, e o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, ectoparasito comum de bovinos (MARTINS, 2014; PRADO, 2014; NOGUERA et al., 2017; CAMPOS et al., 2021; MURARO et al., 2021a; KAKIMORI et al., 2023). O parasitismo por esses carrapatos pode ser encontrado em mono e coinfectações (CAMPOS et al., 2021). A criação de bovinos juntamente aos equídeos pode favorecer a presença de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* nos equinos (PRADO, 2014).

A transmissão de hemopatógenos ocorre devido a presença de vetores competentes (SCOLES et al., 2011), bem como a circulação do agente etiológico e a presença de possíveis hospedeiros e reservatórios. A competência vetorial é a capacidade do carrapato de transmitir o patógeno, que pode ocorrer de maneira mecânica, por peças bucais contaminadas, ou

biológica, quando o parasito é capaz de se desenvolver e/ou se propagar no vetor (SCOLES; UETI, 2015). Os carrapatos devem ser capazes de adquirir o agente, permitir seu desenvolvimento, replicação e invasão das suas glândulas salivares (UETI et al., 2005). Mas a eficiência geral da transmissão abrange muitos outros fatores, incluindo abundância de carrapatos, comportamento do carrapato, comportamento do hospedeiro, características fisiológicas intrínsecas do vetor, tempo de vida do vetor em comparação com o período de incubação extrínseco do parasito etc. (SCOLES; UETI, 2015). Logo, a exposição aos vetores constitui um fator de risco para o desenvolvimento das doenças transmitidas por carrapatos (SANTOS et al., 2013; SALEEM et al., 2018b), assim como o tipo de ambiente em que os cavalos são mantidos, como pastos ou em regime de confinamento (BOTTEON et al., 2002).

Além da possibilidade de transmissão de agentes causadores de doenças, os carrapatos são grandes espoliadores de sangue, podendo levar o animal a anemia quando encontrados em alta quantidade parasitando o hospedeiro (PRADO, 2014).

Nem sempre a presença de carrapatos significa transmissão de patógenos causadores de doenças, mesmo em áreas endêmicas. A presença dos agentes da PE e AGE em carrapatos, detectados por PCR, pode variar em diferentes regiões. Por exemplo, *T. equi* foi encontrada em 2,35% (4/170) dos carrapatos no estado do Maranhão, enquanto *B. caballi* foi detectada em 0,59% (1/170) e nenhum apresentava DNA de *A. phagocytophilum* (NOGUERA et al., 2017).

A competência vetorial também muda conforme o agente etiológico a ser transmitido. As espécies de carrapatos positivos por PCR para *T. equi* foram *R. (B.) microplus* e *D. nitens*, enquanto apenas *D. nitens* foi positivo para *B. caballi* (NOGUERA et al., 2017). Em um estudo epidemiológico de Rickettsia, Borrelia e Anaplasmataceae transmitidas por carrapatos, realizado em equinos do estado do Mato Grosso do Sul, não foi encontrado DNA de nenhuma bactéria estudada nos carrapatos amostrados (CAMPOS et al., 2021). No Pantanal Sul Mato-Grossense, dos carrapatos retirados de equinos e submetidos a PCR, apenas uma fêmea de *A. sculptum* amplificou DNA de *Ehrlichia* spp., tendo sido retirada de um equino soropositivo para *Ehrlichia* spp. (MURARO et al., 2021a). No Paraná, todos os carrapatos testados foram negativo para *Ehrlichia* spp. na PCR, apesar da sorologia positiva para esse gênero em 31,81% dos cavalos estudados (KAKIMORI et al., 2023). Santos et al. (2013) confirmaram a presença de *A. phagocytophilum* em cães naturalmente infectados e em carrapatos Ixodídeos no estado do Rio de Janeiro por métodos moleculares. A frequência de carrapatos, retirados de cães, positivos para *A. phagocytophilum* encontrada foi de 2,55% (n = 6/235), sendo pertencentes às espécies *A. cajennense* e *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato; embora todos os carrapatos positivos para *A. phagocytophilum* tenham sido coletados de cães negativos, os cães infectados apresentavam maior parasitismo por *A. cajennense* (SANTOS et al., 2013). Esses dados reforçam a hipótese de que os carrapatos do complexo *A. cajennense* podem desempenhar um papel na epidemiologia de erliquioses e anaplasmoses em ambientes silvestres e rurais no Brasil (MURARO et al., 2021a).

A ausência de positividade molecular para *A. phagocytophilum* em carrapatos coletados de equinos no Brasil indica que os cavalos não apresentam bacteremia persistente, sugerindo que outras espécies de mamíferos possam desempenhar um papel como hospedeiros amplificadores desse agente (CAMPOS et al., 2021).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Animais

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Veterinária – CEUA/IV da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro sob o protocolo nº: 9418171121 (anexo 1). Os animais incluídos foram equinos cujos responsáveis estavam cientes e em concordância com os procedimentos propostos, assinando previamente um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (anexo 2). Para que animais pertencentes à UFRRJ também pudessem ser utilizados no projeto de pesquisa, o estudo foi submetido e aprovado Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Zootecnia – CEUA/IZ da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro sob o processo nº: 0157-05-2022 (anexo 3), e o TCLE assinado pelo responsável do setor de origem do animal.

### 4.2 Critérios de inclusão

Neste estudo, o fator determinante foi a ocorrência clínica natural da doença, que possibilitasse o atendimento mínimo dos critérios de inclusão. Foram incluídos equídeos do estado do Rio de Janeiro que apresentassem pelo menos três dos sinais clínicos mais comuns da PE: pirexia (temperatura retal de 38,5°C ou superior), apatia, letargia, anorexia/hiporexia, icterícia, membranas mucosas pálidas, perda de peso, sinais de cólica, edema ventral, de pálpebras ou de membros ou queda de performance, que nos animais de esporte e serviço pode ser visto como redução do desempenho no trabalho e nos animais de reprodução como abortos e perdas embrionárias precoces, além de dificuldade de ganho de peso em todas as categorias, e entre outros sinais inespecíficos.

### 4.3 Tamanho amostral

Para a determinação do tamanho amostral, foram utilizados dados de ensaios de prevalência molecular dos agentes estudados, obtidos na região alvo do estudo. Logo, considerou-se a proporção de *T. equi* igual a 80% (PECKLE et al. 2013). Como os estudos de prevalência de *A. phagocytophilum* envolvem animais sem sinais clínicos, os resultados podem não representar a proporção real deste agente e sua capacidade de promover doença. Assim, foi considerada prevalência desconhecida, utilizando-se o valor de 50% para a sua proporção. O cálculo do tamanho da amostra foi realizado utilizando o software online Epistools - Epidemiological Calculators, com a função “Sample size calculations - Sample size to detect a significant difference between two proportions” (<https://epitools.ausvet.com.au/twoproportions>). O número mínimo foi definido em 90 amostras (45 para cada proporção). Como ambas foram determinadas a partir do fracionamento de alíquotas de sangue de um mesmo animal, o número mínimo de animais envolvidos no estudo foi 45.

### 4.4 Amostragem

As amostras foram coletadas em propriedades ou instituições públicas ou privadas que apresentam atendimento veterinário para equinos. Os animais foram atendidos por médicos veterinários colaboradores, que atuam a campo ou em instituições públicas ou privadas no estado do Rio de Janeiro. Após exame físico de rotina dos equinos que se encaixavam nos

critérios de inclusão, foram coletadas amostras de sangue por punção da veia jugular, após limpeza com solução alcoólica (álcool 70% ou clorexedine alcoólico 0,5%), utilizando-se uma seringa de 10ml e agulha de 18 ou 21G (40 x 1,20 ou 30 x 0,80, respectivamente). O sangue coletado foi imediatamente transferido para dois tubos estéreis, à vácuo, com anticoagulante EDTA (3 a 4ml). Um dos tubos foi encaminhado para análises hematológicas e bioquímicas para um laboratório de patologia clínica de escolha do veterinário responsável pelo atendimento e quando solicitado por ele. A outra amostra de sangue foi destinada à realização da PCR. As amostras foram transportadas em caixas de isopor resfriadas com placas de gelo artificial reutilizáveis.

Os resultados do hemograma, assim como os sinais clínicos apresentados durante o exame físico, foram compartilhados pelos veterinários responsáveis pelos atendimentos e organizados na forma de tabela.

As amostras para PCR foram encaminhadas para o Laboratório de Pesquisas Clínica em Equinos e Bovinos, onde foram divididas em duas alíquotas (1ml de sangue total e pelo menos 300µl de capa leucocitária e papa de hemácias imediatamente inferior). Para extração da capa leucocitária, o sangue total foi centrifugado a 2500 x g por 5 min, e a camada leucocitária foi cuidadosamente transferida para um microtubo de 1,5ml, com o auxílio de uma pipeta automática e ponteiras. As alíquotas foram armazenadas em freezer a -20°C para posterior realização da PCR.

Posteriormente, as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Sanidade Avícola e Multiuso do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, onde foram realizadas as etapas de extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) e exame de PCR.

#### **4.5 Extração de DNA**

Após descongelamento das amostras, o DNA foi extraído de 100µL da capa leucocitária usando o DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen®, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. As concentrações de DNA foram determinadas utilizando a NanoDrop ND-2000 espectrômetro (Wilmington, DE, EUA), e as amostras foram diluídas com solução de eluição para obter uma concentração final de aproximadamente 60ng/mL. Posteriormente, foram fracionadas em 3 alíquotas para realização da PCR para cada agente: *Babesia caballi*, *Theileria equi* e *Anaplasma phagocytophilum*, totalizando um volume final de pelo menos 15µL para cada uma delas. As alíquotas foram armazenadas em freezer a -20°C para posterior realização da PCR.

#### **4.6 Ensaio de PCR em tempo real TaqMan**

Para detecção molecular de cada agente, a PCR quantitativa em tempo real foi realizada em placas de reação ópticas de 96 poços (0,1mL) MicroAmp® (Applied Biosystems®), utilizado o sistema TaqMan PCR, com o equipamento Real-Time StepOne Plus®. Foi padronizado um volume total de reação de 12µL para todos os ensaios de qPCR, compreendendo 1X TaqMan Fast Universal PCR Master Mix® (Applied Biosystems), 900nM de cada primer, 250nM da sonda e 3µL de DNA alvo, para *B. caballi* (BHOORA et al., 2010); 2X TaqMan Fast Universal PCR Master Mix® (Applied Biosystems), 450nM de cada primer, 250nM da sonda de hidrólise, e 3µL de DNA alvo, para *T. equi* (KIM et al., 2008); e 1X TaqMan Fast Universal PCR Master Mix® (Applied Biosystems), 2nM de cada primer, 0,4nM da sonda de hidrólise e 3µL de DNA alvo, para *A. phagocytophilum* (DRAZENOVICH; FOLEY; BROWN, 2006). As condições de ciclagem da qPCR consistiram em três fases: 2min a 50°C seguida por 10min a 95°C, 40 ciclos de 15s a 95°C e 1min a 60°C. Em todas as placas foram utilizados controles positivos e

negativos e as reações foram realizadas em triplicatas. As amostras foram consideradas positivas se tivessem um valor limite de ciclo (CT) menor que 40.

Para detecção de *B. caballi* foi realizada a técnica TaqMan minor groove binder (MGB<sup>TM</sup>) qPCR, baseado no gene *18S rRNA*. Os primers Bc\_18SF402 (5'-GTA ATT GGA ATG ATG GCG ACT TAA-3') e Bc\_18SR496 (5'-CGC TAT TGG AGC TGG AAT TAC C-3' (IDT)) e a sonda TaqMan1 MGB<sup>TM</sup> Bc\_18SP (5'-6-FAM-CCT CGC CAG AGT AA-MGB-3'), marcada com o corante fluorescente 6-carboxifluoresceína na extremidade 5' e um quencher não fluorescente na extremidade 3', foram utilizados para amplificar e detectar um fragmento de 95pb na região hipervariável V4 do gene 18S rRNA (BHOORA et al., 2010).

O par de primers Be18SF (5'-GCG GTG TTT CGG TGA TTC ATA-3') e Be18SR (5'-TGA TAG GTC AGA AAC TTG AAT GAT ACA TC-3'), foi utilizado para amplificar um fragmento de DNA de *T. equi* de 81-pb do gene *18S rRNA*, juntamente com uma sonda TaqMan Be18SP (5'-AAA TTA GCG AAT CGC ATG GCT T-3'), marcada na extremidade 5' com corante fluorescente 6-carboxifluoresceína e na extremidade 3' com um quencher 6-carboxi-tetrametilrodamina (KIM et al., 2008).

Para detecção de *A. phagocytophilum*, foi realizado um ensaio TaqMan-PCR visando o gene *msp2* que tem maior sensibilidade e especificidade para diversas cepas de *A. phagocytophilum* (DRAZENOVICH; FOLEY; BROWN, 2006). Os primers 903f (5'-AGT TTG ACT GGA ACA CAC CTG ATC-3') e 1024r (5'-CTC GTA ACC AAT CTC AAG CTC AAC-3') e a sonda TaqMan 939p (5'-TTA AGG ACA ACA TGC TTG TAG CTA TGG AAG GCA-3'), marcada com um corante fluorescente 6-carboxifluoresceína na extremidade 5' e um quencher 6-carboxi-tetrametil-rodamina na extremidade 3', foram utilizados para amplificar e detectar um fragmento de 122 pb do gene *msp2* (DRAZENOVICH; FOLEY; BROWN, 2006).

#### 4.7 Análise Estatística

Os dados sobre a presença dos agentes etiológicos foram organizados em uma tabela de contingência 2 x 2 e calculada a frequência de observação de casos positivos e negativos para *A. phagocytophilum* e para pelo menos um parasito da ordem Piroplasmida (*B. caballi* e/ou *T. equi*). As frequências dos agentes etiológicos foram avaliadas pelo teste de McNemar, considerando um nível de significância  $\alpha=0,05$ . Separadamente, também foi calculada a frequência de observação de casos positivos e negativos para cada parasito da ordem Piroplasmida, em nova tabela de contingência 2 x 2. As frequências dos agentes *B. caballi* e *T. equi* também foram avaliadas pelo teste de McNemar, com um nível de significância  $\alpha=0,05$ . Nesse teste são avaliados os pares discordantes, ou seja, aqueles em que há resultado positivo para um dos grupos avaliados e negativo para o outro, não sendo considerados aqueles que tem a mesma resposta (pares concordantes), já que não trazem informações que permitam decidir qual agente etiológico foi o responsável pelos sinais clínicos.

Com relação aos sinais clínicos, os dados sobre as manifestações para cada agente etiológico foram organizados em tabela, calculando-se a frequência de observação para cada um deles. As frequências dos sinais clínicos foram comparadas entre cada par de grupo de agentes etiológicos meio do teste exato de Fisher considerando um nível de significância  $\alpha=0,05$ .

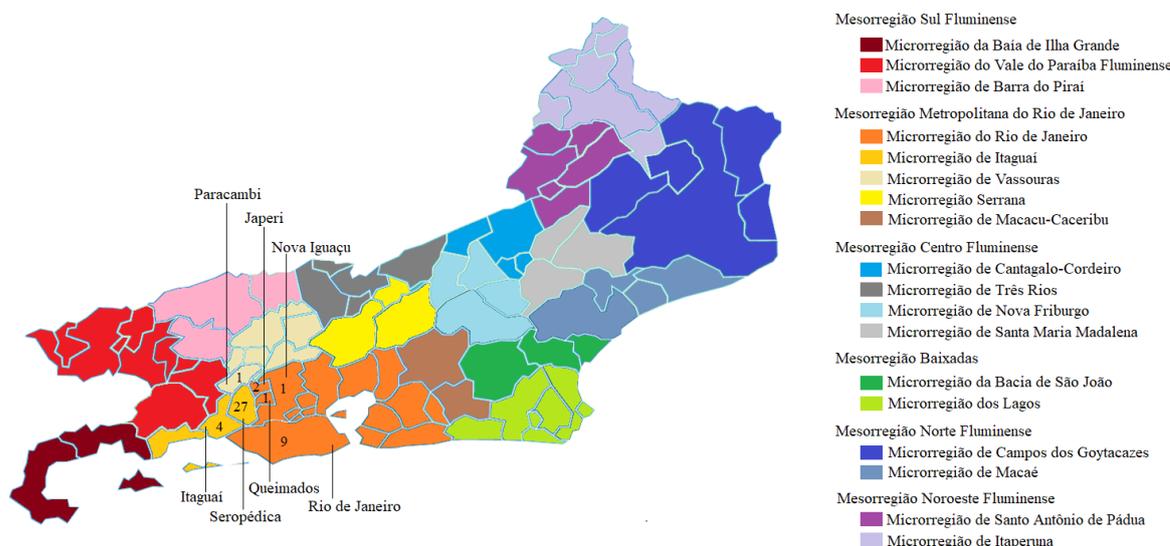
Para estimar as alterações hematológicas causadas por cada agente etiológico foram considerados os seguintes parâmetros: hematócrito (VG), concentração de hemoglobina, contagem de hemácias, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), contagem de leucócitos total e diferencial (bastões, segmentados, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos), contagem de plaquetas, concentração de proteínas plasmáticas totais, concentração de fibrinogênio. Os dados foram organizados em tabelas, calculando-se a frequência de observação

de alterações nos casos positivos de cada hemopatógeno, comparando com os valores de referência descritos para a espécie equina (ORSINI; DIVERS, 2014). Os parâmetros hematológicos foram avaliados quanto ao seu intervalo de variação. Para isso, foi verificada a normalidade da distribuição dos dados pelo teste de Shapiro Wilk. Os parâmetros com uma distribuição normal tiveram suas médias  $\pm$  desvios padrão calculados, enquanto para os dados não normais foram calculadas as medianas e amplitude de variação. Os parâmetros hematológicos com distribuição normal foram comparados entre os grupos dos diferentes agentes etiológicos por meio de um teste de análise de variância (ANOVA), complementada com um teste Tukey, considerando um nível de significância  $\alpha=0,05$ . Dados não normais foram avaliados por meio do teste Kruskal-Wallis, complementado por um teste de Dunn, considerando um nível de significância  $\alpha=0,05$ .

Toda a análise estatística foi realizada utilizando-se o programa Bioestat - versão 5.3.

## 5 RESULTADOS

O presente estudo envolveu a avaliação de 45 equinos no estado do Rio de Janeiro, sendo esse grupo composto por 20 fêmeas e 25 machos, com idades variando entre 2 meses a 25 anos (mediana = 5,5 anos). Os animais pertenciam às raças Mangalarga Marchador (12), Brasileiro de Hipismo (7), Quarto de Milha (5), American Trotter (3), Puro Sangue Inglês (2), Árabe (1), Holsteiner (1), Pônei (1) e sem raça definida (13). Todos eles eram de origem da Mesorregião Metropolitana do Rio de Janeiro, distribuídos entre as Microrregiões de Itaguaí (municípios de Seropédica (27) e de Itaguaí (4)), do Rio de Janeiro (municípios do Rio de Janeiro (9), Japeri (2), Nova Iguaçu (1) e Queimados (1)) e de Vassouras (município de Paracambi (1)), conforme mostrado na figura 1.



**Figura 1:** Distribuição dos animais incluídos no estudo de acordo com a região de origem no estado do Rio de Janeiro (adaptado de IBGE - <https://cidades.ibge.gov.br/>)

O resultado do ensaio de qPCR mostrou que dos 45 animais com sinais clínicos inespecíficos avaliados nenhum deles (0%) apresentava detecção de DNA de *A.phagocytophilum*, cinco (11,2%) apresentavam DNA apenas de *B. caballii*, 16 (35,5%)

apresentavam DNA apenas de *T. equi*, sete (15,5%) demonstraram a presença de DNA dos dois hemoprotozoários e em 17 (37,8%) não houve detecção de DNA de nenhum dos agentes pesquisados. A comparação entre os casos causados por Piroplasmidas e por *A. phagocytophilum* e entre aqueles causados por *B. caballi* e *T. equi* são mostrados nas tabelas de contingência a seguir (tabelas 1 e 2, respectivamente). A análise estatística dos dados obtidos com o ensaio qPCR demonstrou que a PE é mais significativa do que a AGE ( $p < 0,0001$ ) na região em estudo e que, entre os casos de PE, *T. equi* é responsável por mais casos clínicos do que *B. caballi* ( $p = 0,0291$ ).

**Tabela 1:** Frequência de *Anaplasma phagocytophilum* e Piroplasmidas (*Babesia caballi* e/ou *Theileria equi*) por PCR em tempo real em cavalos com manifestações clínicas na Mesorregião Metropolitana do Rio de Janeiro, Brasil

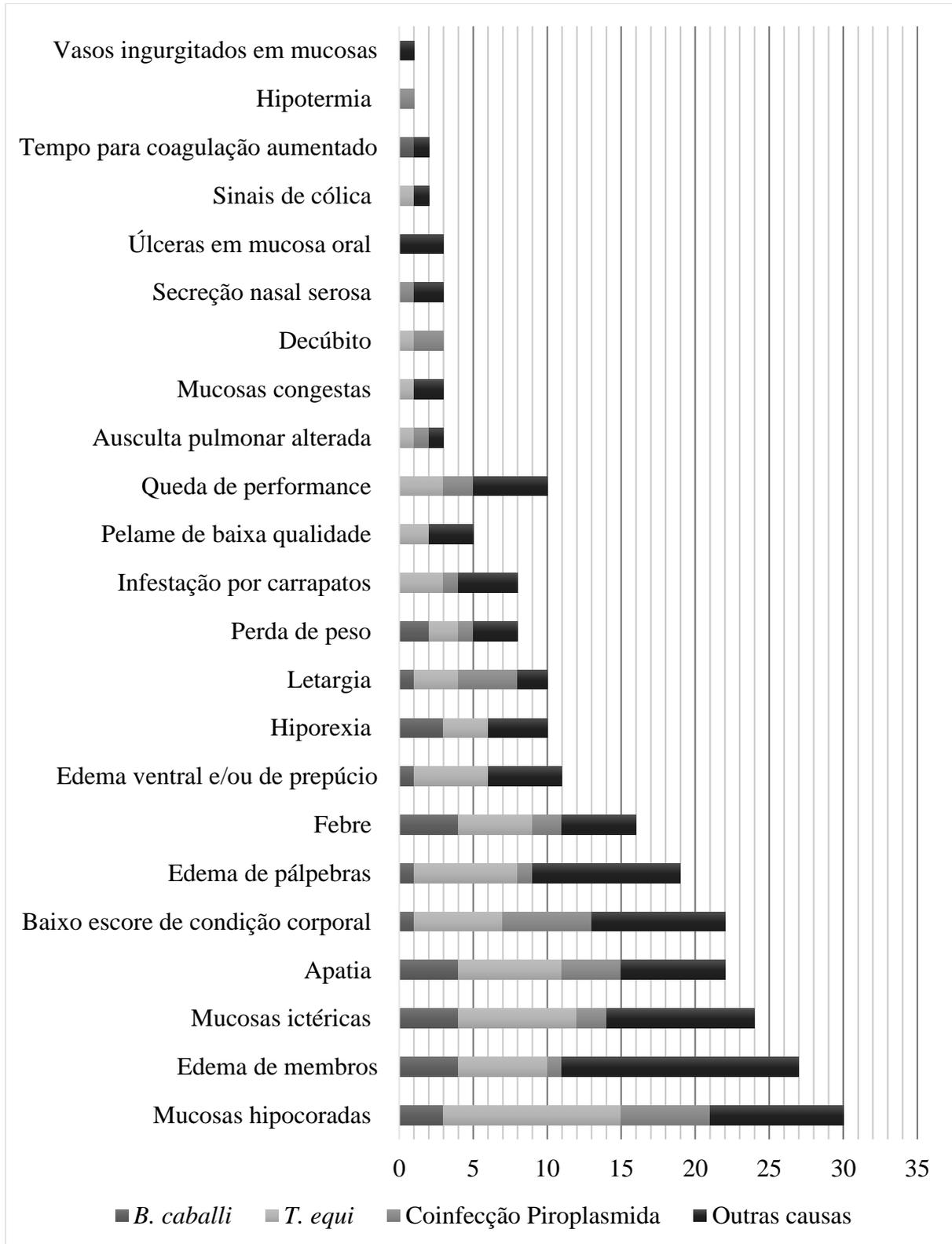
		qPCR <i>Anaplasma phagocytophilum</i>		
		Positivos	Negativos	Total
qPCR Piroplasmida ( <i>Babesia caballi</i> e/ou <i>Theileria equi</i> )	Positivos	0	28	28
	Negativos	0	17	17
	Total	0	45	45

**Tabela 2:** Frequência de *Babesia caballi* e *Theileria equi* por PCR em tempo real em cavalos com manifestações clínicas na Mesorregião Metropolitana do Rio de Janeiro, Brasil

		qPCR <i>Theileria equi</i>		
		Positivos	Negativos	Total
qPCR <i>Babesia caballi</i>	Positivos	7	5	12
	Negativos	16	17	33
	Total	23	22	45

Na avaliação clínica, os animais apresentaram pelo menos três dos seguintes sinais clínicos: mucosas hipocoradas (30 – 66,7%), edema de membros (27 – 60%), mucosas ictéricas (24 – 53,3%), apatia (22 – 48,9%), baixo escore de condição corporal (22 – 48,9%), edema de pálpebras (19 – 42,2%), febre (16 – 35,6%), edema ventral e/ou de prepúcio (11 – 24,4%), hiporexia (10 – 22,2%), letargia (10 – 22,2%), perda de peso (8 – 17,8%), infestação por carrapatos (8 – 17,8%), pelame de baixa qualidade (5 – 11,1%), queda de performance (5 – 11,1%), ausculta pulmonar alterada (3 – 6,7%), mucosas congestionadas (3 – 6,7%), decúbito (3 – 6,7%), secreção nasal serosa (3 – 6,7%), úlceras em mucosa oral (3 – 6,7%), sinais de cólica (2 – 4,4%), tempo para coagulação aumentado – avaliado subjetivamente (2 – 4,4%), hipotermia (1 – 2,2%) e vasos ingurgitados em mucosas (1 – 2,2%). A frequência de observação dos sinais clínicos relativa para cada agente em estudo é apresentada no gráfico da figura 2. Quando analisados os dados dos sinais clínicos comparativamente entre os grupos, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para edema de membros entre os grupos *T. equi* e outras causas e entre coinfeção Piroplasmida e outras causas; hiporexia entre os grupos *B. caballi* e coinfeção

Piroplasmida; e letargia entre os grupos coinfeção Piroplasmida e outras causas. Para todos os outros parâmetros avaliados, não ocorreu diferença estatisticamente significativa entre os grupos.



**Figura 2:** Frequência de observação dos sinais clínicos em cavalos com manifestações clínicas na Mesorregião Metropolitana do Rio de Janeiro, Brasil, de acordo com cada agente detectado por PCR em tempo real

Exames hematológicos foram realizados em 38 dos 45 animais incluídos no estudo. Pelo pequeno número de animais em que foram pedidos exames de bioquímica sérica, esses parâmetros não foram analisados. Dos sete animais sem hemograma, quatro foram positivos para *T. equi* e três foram negativos para todos os agentes pesquisados; logo, os exames disponíveis representaram cinco equinos infectados por *B. caballi*, 12 por *T. equi*, sete por ambos os protozoários e 14 negativos para os agentes testados. Os parâmetros avaliados (e seus respectivos valores de referência descritos por Orsini e Divers, 2014 – adaptado) foram: hematócrito (31 – 47 %), concentração de hemoglobina (11 – 18 g/dL), contagem de hemácias (5,9 - 12,9 x 10<sup>6</sup> células/μL), volume corpuscular médio – VCM (41 – 51 fL), hemoglobina corpuscular média – HCM (13 – 19 pg – adaptado), concentração de hemoglobina corpuscular média – CHCM (33 – 41 g/dL), contagem de leucócitos totais (5400 – 14300 células/μL) e diferenciais – bastões (0 – 100 células/μL – adaptado), segmentados (2260 – 8580 células/μL), linfócitos (1500 – 7700 células/μL), monócitos (0 – 1000 células/μL), eosinófilos (0 – 1000 células/μL), basófilos (0 – 400 células/μL), contagem de plaquetas (100000 – 350000 células/μL), concentração de proteínas plasmáticas totais (6,2 – 8 g/dL), concentração de fibrinogênio (0,1 – 0,6 g/dL) e pesquisa de hemopatógenos. O resultado dos exames de cada equino está apresentado no anexo 4. A tabela 3 mostra a frequência de alterações em cada parâmetro hematológico de acordo com o resultado obtido na qPCR.

**Tabela 3:** Frequência de observação de alterações no hemograma em cavalos com manifestações clínicas na Mesorregião Metropolitana do Rio de Janeiro, Brasil, de acordo com cada agente detectado por PCR em tempo real

	BC			TE			CP			O		
	Abaixo	Normal	Acima									
VG	3	2	0	6	6	0	6	1	0	7	6	1
Hb	3	2	0	6	6	0	7	0	0	8	6	0
Hm	1	4	0	4	8	0	1	6	0	3	11	0
VCM	2	3	0	0	12	0	3	4	0	0	14	0
HCM	1	3	0	1	7	0	3	3	0	0	13	0
CHCM	1	4	0	5	7	0	4	3	0	3	11	0
Ptn	1	3	1	0	9	3	1	5	1	3	10	1
Fbg	0	2	1	0	11	0	0	7	0	0	12	0
Lct	1	3	1	2	10	0	1	6	0	0	13	1
Bast	0	4	1	0	12	0	0	7	0	0	14	0
Seg	1	3	1	3	8	1	1	6	0	1	11	2
Linf	1	4	0	1	11	0	1	5	1	0	11	3
Mon	0	4	1	0	12	0	0	7	0	0	14	0
Eos	0	5	0	0	12	0	0	7	0	0	12	2
Bas	0	5	0	0	12	0	0	7	0	0	14	0
Plq	2	3	0	0	11	1	0	6	1	3	8	2

VG: hematócrito; Hb: hemoglobina; Hm: hemácias; Ptn: proteínas; Fbg: fibrinogênio; Lct: leucócitos; Bast: bastões; Seg: segmentados; Linf: linfócitos; Mon: monócitos; Eos: eosinófilos; Bas: basófilos; Plq: plaquetas; BC: *B. caballi*; TE: *T. equi*; CP: coinfeção piroplasmida; O: outras causas.

Dos 38 exames avaliados, faltaram informações sobre HCM, fibrinogênio e plaquetas em sete, cinco e um animais, respectivamente. Apenas em dois animais foram encontradas inclusões intraeritrocitárias de Piroplasmidas, dos quais um foi positivo na qPCR para *B. caballi* e um para *T. equi*. Ao todo, os 38 cavalos somaram 127 alterações hematológicas (26 acima e 101 abaixo dos valores de referência): 1 aumento e 22 diminuições do hematócrito, 24 reduções na concentração de hemoglobina, 9 diminuições na contagem de hemácias, 5 reduções em VCM e em HCM, 13 diminuições de CHCM, 6 hiper e 5 hipoproteinemias, 2 leucocitoses e 4 leucopenias, 1 resposta de bastonetes, 4 neutrofilias e 6 neutropenias, 4 linfocitoses e 3 linfopenias, 1 monocitose, 2 eosinofilias, 4 trombocitoses e 5 trombocitopenias. Não ocorreram alterações em basófilos e o único animal com hiperfibrinogenemia estava infectado com *B. caballi* e foi possível a detecção pelo esfregaço sanguíneo.

Os parâmetros de hematócrito, concentração de hemoglobina, CHCM e plaquetas apresentaram distribuição normal ( $p > 0,05$ ), enquanto contagem de hemácias, VCM, HCM, proteínas plasmáticas, fibrinogênio e contagem leucocítica (total e diferencial) não se ajustaram à distribuição normal a um nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ). As médias  $\pm$  desvio padrão (DP) para cada parâmetro hematológico com distribuição normal e as medianas (mínimo – máximo) para cada parâmetro hematológico com distribuição não normal foram calculadas para cada subgrupo de resultado da qPCR, (tabela 4).

**Tabela 4:** Médias  $\pm$  DP e medianas (mínimo - máximo) de parâmetros hematológicos em cavalos com manifestações clínicas na Mesorregião Metropolitana do Rio de Janeiro, Brasil, de acordo com cada agente detectado por PCR em tempo real

	BC	TE	CP	O
VG	30,22 $\pm$ 5,52	31,22 $\pm$ 5,74	26,74 $\pm$ 3,37	33,11 $\pm$ 5,99
Hb	10 $\pm$ 1,68	10,27 $\pm$ 2,06	8,8 $\pm$ 1,04	11,18 $\pm$ 2,29
Hm	6,79 (5,6 - 10,33)	6,89 (5 - 8,04)	6,36 (4,73 - 7,28)	6,58 (5,6 - 10,32)
VCM	42,6 (33,9 - 50)	48,49 (38 - 50,2)	43,7 (36,5 - 49,6)	47,9 (45,6 - 50,9)
HCM	13,9 (11,2 - 16,7)	16,05 (12,1 - 16,7)	13,35 (12,4 - 15,1)	15,9 (15 - 16,7)
CHCM	33,18 $\pm$ 1,23	32,78 $\pm$ 1,36	32,94 $\pm$ 1,00	33,66 $\pm$ 1,69
Ptn	7,0 (6 - 8,4)	7,6 (6,2 - 8,8)	7,0 (5,2 - 8,8)	7,0 (3,07 - 8,2)
Fbg	0,4 (0,2 - 0,8)	0,2 (0,2 - 0,4)	0,4 (0,2 - 0,6)	0,2 (0,2 - 0,6)
Lct	7440 (5200 - 15000)	7100 (4400 - 11900)	7700 (5300 - 13100)	8175 (3900 - 16900)
Bast	0 (0 - 111)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)
Seg	4818 (1820 - 10800)	3089,5 (1479 - 8806)	4323 (1113 - 5800)	5079 (1482 - 14365)
Linf	3068 (1452 - 3794)	2982 (1314 - 3772)	3500 (1190 - 8122)	2029 (1050 - 3854)
Mon	208 (111 - 1050)	184,5 (53 - 696)	285 (53 - 600)	180 (39 - 946)
Eos	104 (0 - 198)	329,5 (0 - 902)	100 (70 - 304)	221 (74 - 1630)
Bas	0 (0 - 0)	0 (0 - 357)	0 (0 - 0)	0 (0 - 172)
Plq	122400 $\pm$ 67818,14	222250 $\pm$ 90327,81	255714,29 $\pm$ 75424,83	198076,92 $\pm$ 123087,68

VG: hematócrito; Hb: hemoglobina; Hm: hemácias; Ptn: proteínas; Fbg: fibrinogênio; Lct: leucócitos; Bast: bastões; Seg: segmentados; Linf: linfócitos; Mon: monócitos; Eos: eosinófilos; Bas: basófilos; Plq: plaquetas; BC: *B. caballi*; TE: *T. equi*; CP: coinfeção piroplasmida; O: outras causas.

Quando consideradas apenas as médias, observa-se uma diminuição do hematócrito para a infecção por *B. caballi* e coinfeções de Piroplasmidas, redução do CHCM para infecções por *T. equi* e coinfeções de Piroplasmidas e redução de hemoglobina dos animais com infecção simples ou dupla dos protozoários. No entanto, quando se leva em consideração o desvio padrão, esses parâmetros podem estar tanto reduzidos quanto dentro do intervalo de referência, exceto para hematócrito e concentração de hemoglobina nas coinfeções por Piroplasmidas. Da mesma forma, as médias para contagem de plaquetas não demonstram alterações quando avaliadas isoladamente, mas, considerando o desvio padrão, podem encontrar-se dentro do intervalo de referência ou reduzidas para as infecções por *B. caballi* ou naqueles animais nos quais o resultado da qPCR foi negativo para todos os agentes testados. Nenhuma mediana calculada encontrava-se fora do intervalo de referência para o respectivo parâmetro.

Ocorreu diferença estatisticamente significativa apenas para VCM ( $p = 0,0154$ ) e HCM ( $p = 0,0183$ ), apenas quando comparados os grupos de coinfeção Piroplasmida e outras causas ( $p < 0,05$ ) em ambos os parâmetros, mas as medianas desses parâmetros estavam dentro do intervalo de referência. Os demais dados analisados não diferiram entre os grupos de agentes etiológicos.

## 6 DISCUSSÃO

A Piroplasmose Equina (PE) e a Anaplasmosse Granulocítica Equina (AGE) são doenças infecciosas, transmitidas por carrapatos, que acometem equídeos, causando sintomatologia inespecífica. Não é claro o porquê da diversidade de formas clínicas das doenças, que pode variar de completamente inaparentes a casos periagudos fatais (JOACHIM et al., 2022). Apesar da semelhança clínica, as duas possuem agentes etiológicos distintos e, portanto, tratamentos também distintos. *Babesia caballi* e *Theileria equi* são protozoários causadores da PE, enquanto a bactéria intracelular *Anaplasma phagocytophilum* é a responsável pelos casos de AGE. Dessa forma, as duas doenças são de difícil distinção clínica, sendo necessários métodos diagnósticos específicos, como a microscopia de esfregaço de sangue ou reação da polimerase em cadeia (PCR), para determinar qual o agente envolvido (JOACHIM et al., 2022). A microscopia de luz é o teste laboratorial mais barato e rápido, mas também o menos sensível e altamente dependente da experiência do examinador, quantidade relativa de células-alvo, níveis de bacteremia/parasitemia, grau de neutropenia ou anemia e estágio da doença, de forma que um resultado negativo não exclui infecção (SILAGHI et al., 2017). No presente estudo, apenas em dois animais foram encontradas inclusões intraeritrocitárias de Piroplasmidas, dos quais um foi positivo na qPCR para *B. caballi* e um para *T. equi*, o que demonstra a baixa sensibilidade da pesquisa direta por microscopia. Além disso, interpretações falso-positivas podem ocorrer devido a corpúsculos de Döhle ou Howell-Jolly, outras inclusões, partículas ou plaquetas contaminantes e fragmentos nucleares sobrepostos às células (SILAGHI et al., 2017).

A PCR em tempo real (qPCR) foi o método diagnóstico escolhido para este estudo, já que consiste na detecção da presença do organismo pela amplificação de fragmentos específicos do DNA, apresentando alta especificidade e alta sensibilidade (WISE et al., 2013). O diagnóstico baseado na detecção de inclusões durante os primeiros dias de febre pode ser negativo, enquanto a PCR mostra resultados positivos mesmo antes do aparecimento dos sinais clínicos (FRANZÉN et al., 2005). No estudo de Dzięgiel et al. (2013), a PCR mostrou-se um teste mais sensível para diagnosticar a infecção de *A. phagocytophilum* (42/234) do que o exame

microscópico de esfregaços sanguíneos (17/42), sendo que nenhuma amostra com um exame microscópico positivo teve resultado que não coincidissem com o de PCR positivo. Além disso, ensaios em tempo real são menos demorados e mais sensíveis (SILAGHI et al., 2017). O ensaio utilizado, visando o gene *msp2* de *A. phagocytophilum*, tem maior sensibilidade e especificidade, detectando uma variedade de cepas geneticamente diversas da bactéria (DRAZENOVICH; FOLEY; BROWN, 2006). Sangue total anticoagulado e capa leucocitária são as melhores amostras para triagem molecular de vertebrados infectados por *Anaplasma* spp. (SILAGHI et al., 2017). A sensibilidade dos exames moleculares para detecção de *A. phagocytophilum* pode ser aumentada pelo uso da capa leucocitária, principalmente nos casos com neutropenia (JOACHIM et al., 2022).

Aparentemente, *A. phagocytophilum* não é capaz de proliferação contínua e sobrevivência indefinida dentro de um hospedeiro imunologicamente competente, sendo improvável que cavalos atuem como reservatórios, já que a presença de *A. phagocytophilum* é limitada a uma curta fase aguda da doença (LEWIS; GEORGE, 1976). No entanto, cavalos podem atuar como sentinelas para a infecção em outras espécies, inclusive humanos (SISKA et al., 2013). O diagnóstico da bactéria no sangue periférico é limitado devido à curta duração da bacteremia, o que dificulta o isolamento em esfregaços ou biologia molecular (OLIVEIRA et al., 2020). De forma contrária, cavalos cronicamente infectados com baixos níveis de parasitemia são reservatórios competentes para a transmissão de *T. equi* por carrapatos (UETI et al., 2005). Animais portadores de *T. equi* podem não demonstrar sinais clínicos, mas ter sua performance comprometida, e quando sujeitos a situações estressantes ou baixas condições nutricionais podem demonstrar uma infecção recrudescente com sintomatologia clínica (RHALEM et al., 2001). Assim, animais com sinais clínicos (fase aguda da doença) foram incluídos no estudo por apresentarem maior probabilidade de ter o agente etiológico circulando no sangue e, com isso, aumentar as chances de detecção molecular e de chegada a um diagnóstico definitivo. Tanto a PE quanto a AGE apresentam sinais clínicos semelhantes, impossibilitando a sua distinção clínica. Nenhum achado de exame físico foi identificado como preditor significativo de resultado de PCR positivo para *A. phagocytophilum* (FIELDING et al., 2018). Por esta razão, cavalos com pelo menos três sinais clínicos inespecíficos que pudessem sugerir as doenças foram incluídos no estudo.

O grupo dos 45 equinos avaliados no estado do Rio de Janeiro, foi composto por proporção semelhante de machos e fêmeas, com ampla variação de idade e diferentes raças, indicando que doenças com sintomatologia inespecífica podem acometer diferentes categorias de equinos, independente de sexo, idade e raça. Todos eram de origem da Mesorregião Metropolitana do Rio de Janeiro. Esse fato se justifica pela maior adesão de veterinários colaboradores que atuam nessa região e pela maior facilidade de envio de amostras de sangue para o processamento em laboratório na UFRRJ, também localizada nessa área geográfica. O resultado do ensaio de qPCR mostrou que 62,2% dos animais com clínica estavam infectados por pelo menos um agente da PE e nenhum deles apresentou infecção por *A. phagocytophilum*. Isso indica que a piroplasmose equina é clinicamente mais significativa do que a AGE, na Mesorregião Metropolitana do estado do Rio de Janeiro. Apenas um outro estudo no Brasil foi realizado com a detecção de agentes etiológicos em animais com sintomas inespecíficos que levantassem a suspeita de PE ou AGE. Em 20 amostras de sangue, 45% delas foram confirmadas por PCR com infecção por *T. equi*, enquanto nenhuma apresentou resultado positivo para *A. phagocytophilum* (SALVAGNI et al., 2010). Os resultados foram semelhantes ao do presente estudo, no qual também não foi detectado o agente da AGE nas amostras avaliadas, enquanto 51,1% delas apresentaram detecção de DNA de *T. equi*.

Estudos têm sido realizados no Brasil para investigar a ocorrência da AGE no país. No estado do Rio de Janeiro, pesquisas de anticorpos anti-*A. phagocytophilum* em equídeos, por meio de IFAT com títulos  $\geq 1:80$ , resultaram em 17% (17/100) (SANTOS, 2011), 12% (11/91)

(ROLIM et al., 2015), 17,4% (n = 17 /98) (SANTOS et al., 2019) e 20,26% (124/612) (OLIVEIRA et al., 2020) de soropositividade, mas nenhum dos animais avaliados nesses estudos demonstravam sinais clínicos sugestivos da doença. A presença de anticorpos não significa necessariamente doença ativa, e sim que ocorreu uma exposição ao agente em algum momento, o que pode sugerir a circulação da bactéria no estado, ou reações cruzadas com outros agentes. No entanto, a detecção direta do agente foi pouquíssimas vezes alcançada. Estudos utilizando PCR identificaram (3/350) (SANTOS, 2011), 1/187 (OLIVEIRA, 2012) e 1,0% (n = 1/98) (SANTOS et al., 2019) de equinos positivos; no primeiro deles, nenhum animal demonstrava sinais clínicos sugestivos (SANTOS, 2011); no segundo, apenas o resumo do trabalho estava disponível para a leitura e não informava sobre a presença de sinais clínicos nos animais avaliados (OLIVEIRA, 2012); e no terceiro, o animal apresentava sinais clínicos inespecíficos, mas estava coinfestado por *T. equi* (SANTOS et al., 2019), não sendo possível afirmar qual agente foi responsável pela clínica.

As investigações realizadas em outros estados brasileiros indicam variação na detecção de *A. phagocytophilum* entre as regiões nos testes sorológicos, mas os resultados da detecção molecular permanecem consistentes, não sendo identificada a bactéria na maioria dos estudos, com exceção de dois. No Pará, amostras de sangue de 155 equídeos avaliadas por meio de nested-PCR, resultando em quatro amostras (2,58%) positivas para *A. phagocytophilum* (EVERTON, 2014), mas o autor não relata se os animais do estudo apresentavam sinais clínicos. Também por PCR de sangue de equinos, foram encontrados no Maranhão 17/210 (8,1%) e 10/210 (4,7%) amostras positivas para os genes *msp4* e *msp2* de *A. phagocytophilum*, respectivamente (MIRANDA, 2020). Apenas o resumo deste trabalho foi encontrado disponível para a leitura e nele não foi mencionado o estado clínico dos animais do estudo. Em amostras de sangue de 569 equídeos assintomáticos da Bahia avaliadas por nested PCR, não foi detectada a presença de *A. phagocytophilum* (COSTA, 2017; COSTA et al., 2021). Amostras de sangue de 97 cavalos criados no estado do Maranhão, avaliadas por IFAT e PCR, demonstraram 11,34% de soropositividade para *Anaplasma phagocytophilum*, mas o DNA da bactéria não foi amplificado no exame molecular (NOGUERA et al., 2017), mas o autor não descreve a presença de sinais clínicos. Na região centro-oeste do Brasil, em um estudo com 121 e outro com 148 cavalos avaliados por PCR, nenhum deles foi positivo para *Anaplasma* spp. (BARROS et al., 2015; MURARO et al., 2021b). Nestes estudos, os animais estavam assintomáticos (BARROS et al., 2015) ou alguns com sintomatologia inespecífica, mas sem significância estatística com os resultados de sorologia e PCR (MURARO et al., 2021b). Nos dois trabalhos também foi realizado estudo sorológico para detectar anticorpos anti-*Ehrlichia* spp. por IFAT, resultando em 39,6% (BARROS et al., 2015) e 41,2% (MURARO et al., 2021b) equídeos soropositivos. Ainda nesta região, de 262 cavalos avaliados, 31,6% (83/262) foram soropositivos para *A. phagocytophilum* por IFAT, mas nenhum deles apresentou positividade molecular para *A. phagocytophilum* (CAMPOS et al., 2021). No estado de São Paulo, de 250 equinos assintomáticos testados, resultou-se na positividade para *A. phagocytophilum* em sete (3%) amostras pelo ELISA indireto (SNAP 4DX), e nove (3,6%) com positividade fraca para *Ehrlichia canis*, mas todas as amostras foram negativas para *A. phagocytophilum* na pesquisa direta de esfregaço sanguíneo e nested PCR (PARRA, 2009). Outros 30 equinos testados no mesmo estado, sem sinais de doença aguda, foram negativos ao exame de PCR para *A. phagocytophilum* (DÓRIA et al., 2016). Enquanto no Paraná, 103 amostras de sangue de equinos clinicamente saudáveis, foram analisadas quanto à presença de anticorpos anti-*Ehrlichia* spp. por IFAT e para detecção de *Ehrlichia* spp. por PCR, resultando em 5/103 (4,85%) soropositivos e nenhum positivo pela detecção molecular (VALENTE et al., 2019). Em outro estudo, no mesmo estado, análise de amostras de sangue de 22 cavalos por IFAT e PCR revelou anticorpos anti-*Ehrlichia* spp. em 31,81% (7/22) cavalos e todos os cavalos testaram negativo na PCR para *Ehrlichia* spp. (KAKIMORI et al., 2023). Em Minas Gerais, a

avaliação de 224 equinos revelou uma frequência de 53,57% de animais positivos para anticorpos anti-*A. phagocytophilum*, por IFAT, e 2,67% positivos no exame de nPCR, mas no estudo não foi realizada avaliação clínica, não sendo relacionados os dados obtidos com a presença de sintomatologia (PRADO, 2014). Em outros dois municípios do mesmo estado, a soropositividade encontrada por IFAT foi de 76,16% (131/172) e apenas 1,94% (2/103) dos animais, que não apresentavam sinais clínicos, foram positivos ao exame molecular para detecção do agente; essas amostras positivas pela PCR foram sequenciadas e apresentaram 96% de similaridade com *A. phagocytophilum* (PRADO, 2014). Quando avaliados em diferentes épocas do ano, esses animais apresentaram variações na titulação de anticorpos. A evidência de manutenção, diminuição e aumento da titulação encontrada nesse estudo é evidência da circulação ativa de *A. phagocytophilum* na região (PRADO, 2014).

Embora ocorra um rápido aumento nos títulos de anticorpos por IFAT após a fase aguda da AGE, muitas vezes ainda na presença de sinais clínicos (ARTURSSON et al., 1999), animais com sorologia positiva não necessariamente são animais doentes, mas sim que tiveram contato com o agente em alguma fase da vida, podendo ou não estar com o agente em seu organismo no momento da colheita, induzindo a ativação do sistema imunológico (PARRA, 2009). Titulação alta ainda na fase aguda pode refletir um efeito de reforço, devido a uma infecção anterior, ou como uma resposta primária de anticorpos rápida, possivelmente em combinação com um atraso na manifestação clínica (ARTURSSON et al., 1999; JAHN et al., 2010). A presença de anticorpos anti-*A. phagocytophilum* nos testes sorológicos, e as poucas identificações realizadas por PCR, podem indicar que a bactéria circula no Brasil, mas a ausência de detecção em animais com sinais clínicos pode sugerir que os eles são capazes de realizar a soroconversão quando expostos ao agente, conseguindo controlar rapidamente a bacteremia. Também é possível que a dose infectante seja menor quando realizada pelos vetores brasileiros do que por espécies comprovadamente competentes para a transmissão. A bacteremia muito baixa dificulta a detecção por técnicas moleculares, mas não impede que o animal desenvolva resposta imune contra o agente, sendo capaz de combater a infecção antes do surgimento de sinais clínicos e de desenvolver soroconversão. Aumento repentino de anticorpos durante a fase de convalescência sugere uma reinfecção, mesmo que não haja presença de sinais clínicos, o que sugere imunidade protetora (ARTURSSON et al., 1999). A persistência de níveis de anticorpos sugere reforço periódico por um episódio de infecção subclínica (JAHN et al., 2010), e pode ser também o motivo da baixa prevalência de doença sintomática. É apropriado assumir que muitos cavalos sorologicamente positivos estão infectados subclínicamente ou estão no estágio de convalescência de uma infecção anterior (ARTURSSON et al., 1999).

Outro ponto a ser considerado quando são ponderados estudos sorológicos é a possibilidade de reações cruzadas. Todos os isolados de *A. phagocytophilum* parecem ter reatividade sorológica cruzada (RIKIHISA, 2011). Resultados de IFAT realizados em 400 bovinos no Pantanal brasileiro indicaram baixa soropositividade para *A. phagocytophilum* (1/400), e o autor sugeriu que esse resultado pode resultar de uma reação cruzada com outra espécie de *Anaplasma* spp. circulando em bovinos no território brasileiro (RAMOS et al., 2020). Reações cruzadas com várias espécies de *Anaplasma* são observadas após a soroconversão, fazendo com que os testes diretos sejam a melhor abordagem tanto para a definição de caso quanto para estudos epidemiológicos (SILAGHI et al., 2017). Vale ressaltar que ruminantes também podem desenvolver infecção clínica por *A. phagocytophilum* e que a proximidade a cavalos, na presença de um vetor competente, poderia favorecer a transmissão da bactéria entre indivíduos dessas espécies e o surgimento de sinais clínicos. Os testes sorológicos geralmente são específicos de um grupo e não podem ser usados para distinguir cepas individuais (RIKIHISA, 2011). O teste SNAP 4DX (ELISA indireto) indica a presença de possíveis anticorpos contra *A. phagocytophilum*, já que pode ocorrer reatividade cruzada

para *Anaplasma platys* (PARRA, 2009). Reatividade cruzada em testes sorológicos pode ocorrer pela presença de proteínas de superfície imunodominantes com peso molecular similar a outras proteínas imunodominantes, particularmente na mesma família (PARRA, 2009). A presença de anticorpos anti-*Ehrlichia* spp. indica a circulação de espécies antigenicamente relacionadas aos gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma* (BARROS et al., 2015), em que podem ser usados antígenos de *E. canis* para o teste (VALENTE et al., 2019). Ou seja, a presença de anticorpos sugere infecção passada por qualquer um dos gêneros citados (BARROS et al., 2015).

Relatos de casos clínicos de AGE no Brasil são escassos, sendo descritos em apenas dois trabalhos no estado de Minas Gerais. No município de Belo Horizonte, no período entre 2010 e 2013, 6 equinos pertencentes ao Projeto Carroceiros desenvolveram sinais clínicos sugestivos da doença durante período de internação devido a outras causas, mas apenas um deles foi positivo para *A. phagocytophilum* ao exame de PCR (PRADO, 2014). Como os sinais são inespecíficos, não é possível afirmar que foram causados pela bactéria. As alterações observadas podem ser justificadas por outros fatores que não a AGE, já que o agente não foi identificado na maioria dos casos e os animais apresentavam doenças concomitantes que levaram à internação inicialmente (PRADO, 2014). Em Uberlândia, foi relatado um caso de AGE em um equino de aproximadamente 19 anos que foi resgatado da rua, apresentando quadro clínico compatível com a doença, com diagnóstico positivo por PCR para espécies dos gêneros *Anaplasma* e *Ehrlichia* e sequenciamento genético com 95% de identidade a *Anaplasma phagocytophilum*, confirmando o diagnóstico (SILVA, 2018).

A localização geográfica em que o cavalo reside é significativamente associada a um resultado de PCR positivo para *A. phagocytophilum*, com a latitude tendo uma relação linear positiva com o aumento das probabilidades de registro desse resultado (FIELDING et al., 2018), ou seja, quanto mais distante da Linha do Equador, maior é a probabilidade de um caso suspeito ser positivo para *A. phagocytophilum*. Esse fato pode estar relacionado tanto à presença de vetores competentes quanto à presença de hospedeiros reservatórios, já que a latitude está relacionada ao clima e, portanto, condições ambientais que influenciam a presença dessas espécies. Variações na prevalência de *A. phagocytophilum* podem ser atribuídas a vários fatores, como a suscetibilidade de espécies de carrapatos individuais, a suscetibilidade de certas populações de carrapatos, a competência vetorial de espécies de carrapatos, a suscetibilidade de diferentes espécies hospedeiras, a suscetibilidade de hospedeiros individuais ou populações de hospedeiros e a competência do hospedeiro reservatório (STUEN et al., 2013).

Além disso, a localização também pode estar relacionada com a presença de cepas diferentes, com patogenicidade, transmissibilidade e capacidade de infecção distintas nos cavalos. Diferenças fenotípicas e genéticas de *A. phagocytophilum* de diversas regiões e hospedeiros permitem deduzir que podem existir cepas ecologicamente separadas (FOLEY et al., 2009b). Várias genoespécies de *A. phagocytophilum* fenotipicamente e molecularmente diferentes já foram identificadas, e os ciclos de transmissão geralmente envolvem hospedeiros e vetores específicos para as genoespécies (STEPHENSON et al., 2015). A expressão da família de proteínas de superfície principal 2 (MSP2) nos genomas de *A. phagocytophilum* superam 100 membros, o que indica que a recombinação de genes de proteínas superficiais é uma propriedade inerente de *A. phagocytophilum* (RIKIHISA, 2010), o que pode estar relacionado a diferentes interações com hospedeiros e patogenicidade das variantes. Ao longo do curso da infecção, os hospedeiros adquirem resistência temporária à anaplasiose granulocítica à medida que desenvolvem imunidade específica para o antígeno principal (MSP2) (FOLEY et al., 2009a). A expressão dinâmica de diversas proteínas de superfície, tanto em uma população bacteriana quanto durante o ciclo de vida de uma célula individual, é fundamental para a sobrevivência e persistência bacteriana (RIKIHISA, 2010). A bactéria utiliza de mecanismos

de recombinação para contornar a imunidade do hospedeiro, formando pseudogenes que podem representar uma diversidade antigênica quase ilimitada (FOLEY et al., 2009a).

Variações de cepas com potencial tropismo específico do hospedeiro parece ser abundante em *A. phagocytophilum* (STUEN et al., 2013). O gene *ankA* apresenta um alto nível de polimorfismo mesmo entre cepas de *A. phagocytophilum* intimamente relacionadas (REJMANEK et al., 2013). Com base nesse gene, descobertas indicam que existem várias cepas de *A. phagocytophilum* com tropismos para hospedeiros distintos (SCHARF et al., 2011; REJMANEK et al., 2012). Isso inclui várias cepas altamente divergentes detectadas em lagartos, várias cepas de ciurídeos e um grupo mais divergente de cepas exclusivas de ratos silvestres (REJMANEK et al., 2012). É importante salientar que as semelhanças de proteínas do gene *ankA* foram menores do que as alterações de nucleotídeos, indicando que a maioria das trocas de nucleotídeos não eram sinônimos, o que pode significar diferenças biológicas, associadas à adaptação ambiental, diversificação funcional, modificação do tropismo de nicho, variação antigênica e evasão imune (SCHARF et al., 2011).

Existem pelo menos dois grupos *A. phagocytophilum* em mamíferos: um de cepas que infectam ratos silvestres e outro de cepas que infectam ciurídeos (esquilos), cães, cavalos e humanos (FOLEY et al., 2009b; REJMANEK et al., 2012). A detecção de cepas altamente diferentes de *A. phagocytophilum* em várias espécies de lagartos sugere que elas podem ser mais do que apenas cepas diferentes, mas espécies potencialmente novas (REJMANEK et al., 2012). Os dados sugerem um alto nível de tropismo entre hospedeiros reservatórios e a detecção de diferentes cepas em carrapatos no mesmo local indica a presença de pelo menos 2 ciclos enzoóticos coexistentes de *A. phagocytophilum* na Califórnia (REJMANEK et al., 2013).

Cepas de *A. phagocytophilum* que infectam ratos silvestres são fundamentalmente distintas de outras cepas, incluindo aquelas capazes de causar doenças em humanos e animais domésticos (FOLEY et al., 2008; REJMANEK et al., 2012). Parece haver maior diversidade de estirpes (alto nível de polimorfismo) entre as amostras de ratos silvestres do que entre amostras de esquilos, talvez porque as cepas de ratos silvestres induzem infecções duradouras em seus hospedeiros, podendo sofrer pressões de seleção diversas em diferentes locais geográficos ou ciclos hospedeiro-vetor (REJMANEK et al., 2012; REJMANEK et al., 2013). Outra possível explicação para a extensa variabilidade genética dentro do clado de ratos silvestres é que os carrapatos tendem a estar intimamente associados com esses hospedeiros e, portanto, são limitados em sua capacidade de se dispersar por longas distâncias, permitindo que cepas geograficamente distantes acumulassem mutações e divergissem com o tempo (REJMANEK et al., 2013). Cepas de ratos silvestres apresentam tropismo para roedores, mas não são infecciosas para cavalos, não demonstrando sinais clínicos ou positividade nos testes de sorologia, microscopia de esfregaços de sangue e PCR após inoculação (FOLEY et al., 2009b).

Linhagens que infectam esquilos, cães, cavalos e humanos pertencem a um clado menos geneticamente diverso (REJMANEK et al., 2013). Essas cepas são geneticamente idênticas ou quase idênticas, mas diferem de todas as cepas de ratos silvestres (REJMANEK et al., 2012). Quando inoculadas em cavalos essas cepas são capazes infectar e causar doença (FOLEY et al., 2009b). Em alguns casos, os esquilos podem adquirir cepas de *A. phagocytophilum* que são típicas de ratos silvestres (REJMANEK et al., 2012). Devido à diversidade de hospedeiros mamíferos e vetores, é possível que a cepa de *A. phagocytophilum* encontrada em esquilos possa se espalhar mais facilmente por uma área maior e por um tempo curto o suficiente para que apenas variações genéticas limitadas sejam detectadas entre amostras distantes (REJMANEK et al., 2013).

Nos dois estudos em que a bactéria foi encontrada no Brasil e o sequenciamento genético realizado, a identidade com *Anaplasma phagocytophilum* foi de 95% (SILVA, 2018) e 96% (PRADO, 2014). Apesar de utilizarem sequências pequenas, originadas da amplificação de cada teste de PCR usado, 4 – 5% de diferenças na sequência de nucleotídeos permitem alto grau

de diversidade genética em relação à sequência original comparada. A ausência de sinais clínicos em animais positivos pode ser devido à baixa virulência da cepa encontrada (PRADO, 2014). É possível que a cepa circulante no país seja capaz de infectar equinos, que realizam a soroconversão, detectada nos diversos estudos sorológicos, após um curto período de baixa bacteremia, mas que não seja capaz de causar doença clínica, com raras exceções em casos de pacientes imunodeprimidos. Essa hipótese é corroborada pelos achados do presente estudo, em que a doença observada em todos os animais avaliados apresentava outra etiologia que não a infecção por *A. phagocytophilum*.

É importante destacar que, em futuras detecções de *A. phagocytophilum* no Brasil, a realização do sequenciamento genético da bactéria traria grandes avanços para o estudo epidemiológico e clínico da doença, de modo a confirmar a sua presença, determinar a cepa circulante e estudar a sua patogenicidade. As cepas de *A. phagocytophilum* mostram um menor grau de variação na sequência de nucleotídeos nos genes *16SrRNA* e *groESL* (RIKIHISA, 2011; DZIĘGIEL et al., 2013). Mesmo assim, um total de 11 diferentes variantes do gene *16SrRNA* já foi detectado (SCHARF et al., 2011). Utilizar esses genes como alvo em estudos moleculares iniciais, seguido do sequenciamento desses e de outros genes, como *msp2*, *msp4*, e *ankA* pode ser uma estratégia para incrementar as informações sobre a bactéria no país. Seria interessante também identificar possíveis reservatórios e vetores de *A. phagocytophilum* no Brasil, assim como avaliar a capacidade das cepas encontradas em infectar linhagens celulares de mamíferos *in vitro*, assim como de causar doença em animais domésticos hígidos e imunocomprometidos. A disponibilidade de diferentes hospedeiros reservatórios e as estratégias de adaptação de *A. phagocytophilum* parecem ser fatores cruciais para a prevalência da doença (STUEN et al., 2013). Além disso, um ensaio que permita diferenciar genoespécies patogênicas e não patogênicas de *A. phagocytophilum*, como o realizado por Stephenson et al. (2015), também é importante para o entendimento da ecologia e epidemiologia da doença, além de facilitar o diagnóstico de casos suspeitos, orientando de forma mais precisa o tratamento.

O resultado do ensaio de qPCR mostrou que 62,2% dos animais com clínica estavam infectados por pelo menos um agente da PE, dos quais cinco (11,2%) apresentavam DNA apenas de *B. caballi*, 16 (35,5%) apresentavam DNA apenas de *T. equi* e sete (15,5%) demonstraram a presença de DNA dos dois hemoprotozoários. Nesse estudo, *T. equi* foi significativamente mais responsável por casos clínicos de PE do *B. caballi*. Embora não tenha sido avaliada a presença de *B. caballi*, Salvagni et al. (2010) encontraram 45% de infecção por *T. equi*, detectada por nested PCR, em equinos com sinais inespecíficos (febre, anorexia, letargia, mucosas pálidas, edema dos membros e infestação ou histórico de exposição a carrapatos) na região Centro-oeste do Brasil. Esse resultado é semelhante ao do presente estudo, no qual 51,1% das amostras analisadas apresentaram DNA para essa espécie. Resultados semelhantes também foram apontados na Itália, onde *T. equi* foi mais prevalente do que *B. caballi*, acometendo 27/38 (61,4%) e 6/38 (13,6%) cavalos com doença aguda, respectivamente, enquanto 5/38 (11,4%) foram positivos para ambos os protozoários (ZOBBA et al., 2008). Esses resultados podem ser explicados pela maior prevalência de *T. equi* em relação à *B. caballi*, descrita em todo o mundo (TIROSH-LEVY et al., 2020a).

Estudos sorológicos e moleculares realizados no Brasil mostram prevalências variadas nos diferentes estados, mas normalmente indicando uma supremacia de diagnósticos de *T. equi* em relação a *B. caballi*. Mas uma proporção diferente já foi encontrada no estado de São Paulo. Nesse estudo, 100% dos animais assintomáticos avaliados foram positivos para hemoparasitoses por PCR, sendo que 20% foram positivos apenas para *Babesia caballi*, 16% foram positivos apenas para *Theileria equi* e 64% apresentaram coinfeção dos hemopatógenos (DÓRIA et al., 2016). No Brasil, a prevalência sorológica de *T. equi* e *B. caballi*, respectivamente, já foi descrita como sendo de 41,75 - 50% e 27,27% no Paraná (VALENTE et al., 2019; KAKIMORI et al., 2023) e 38,14% e 18,55% no Maranhão (NOGUERA et al.,

2017). A prevalência molecular no Brasil demonstra ser de, para *T. equi* e *B. caballi*, respectivamente, 24,27% - 59,09 e 4,55 - 9,71% no Paraná (VALENTE et al., 2019; KAKIMORI et al., 2023), 13,2% e 0,8% no Mato Grosso (BARROS et al., 2015), 13,4 - 71,4% e 3,09 - 15,7% no Maranhão (NOGUERA et al., 2017; MIRANDA, 2020) e 83,5% e 24,3% na Bahia (COSTA, 2017). A coinfeção de equinos nos estados brasileiros já foi documentada por sorologia e PCR, respectivamente, em 18,18% e 1,94% no Paraná e 22,7% por PCR na Bahia (COSTA, 2017; VALENTE et al., 2019; KAKIMORI et al., 2023). Estudos que avaliaram apenas *T. equi* como agente da PE, indicam detecção sorológica desse protozoário em 81,09 - 89,8% no Rio de Janeiro (SANTOS, 2011; SANTOS et al., 2019), 46% em São Paulo (PARRA, 2009) e 85 - 90% na região Centro-Oeste (SALVAGNI et al., 2010), enquanto o diagnóstico molecular foi confirmado em 91,8% no Rio de Janeiro (SANTOS et al., 2019), 36% em São Paulo (PARRA, 2009) e 60% no Pará (EVERTON, 2014).

Esses dados mostram que variações regionais podem acontecer, mesmo em locais endêmicos, principalmente em países de proporções continentais como o Brasil, já que há diversos fatores ambientais, culturais e econômicos que divergem de uma região para outra. A alta soropositividade e a proximidade dos valores de prevalência sorológica e molecular, observada em alguns estudos podem indicar a manutenção do parasito ao longo da vida do hospedeiro e caracterizar a região em estudo como em estabilidade enzoótica para agentes da PE (SANTOS, 2011; TIROSH-LEVY et al., 2020a). A maior soroprevalência de *B. caballi*, em comparação com sua prevalência molecular, pode indicar eliminação do parasito, natural ou através de tratamento, com persistência de anticorpos (TIROSH-LEVY et al., 2020a). A razão para isso é que os anticorpos podem ser demonstrados mesmo quando os piroplasmas já foram eliminados (JAFFER et al., 2010). A maior prevalência de *T. equi* pode acontecer pela sua maior resistência ao tratamento e à sua maior capacidade de se manter em infecções crônicas, levando os animais ao estado de portador persistente, o que possibilita uma reagudização da doença em casos de imunodepressão. Em áreas endêmicas, os animais geralmente são expostos desde novos, desenvolvendo imunidade e, como a infecção por *T. equi* geralmente dura toda a vida, a prevalência observada tende a aumentar com a idade e os cavalos passam a atuar como principal reservatório dos parasitos (TIROSH-LEVY et al., 2020a).

Em 37,8% dos casos avaliados não houve detecção de DNA de nenhum dos agentes pesquisados. Nem sempre é possível chegar a um diagnóstico definitivo nos casos de síndromes inespecíficas. Na Califórnia, de 162 equídeos com síndrome febril inespecíficas 87 (53,7%) não tiveram um diagnóstico final determinado (FIELDING et al., 2018). De 33 cavalos avaliados em uma pesquisa observacional, caso-controle na Venezuela, para descrever a presença de sinais clínicos e infecções naturais por agentes etiológicos da PE, cinco (15,1%) apresentaram sinais clínicos compatíveis, mas resultado negativo por PCR para PE, tripanossomose, AGE e micoplasmose, (RISSO et al., 2022). Esses dados mostram a importância de determinar uma lista de diagnósticos diferenciais que causem sinais semelhantes, mas que também levem em consideração o histórico do animal e a epidemiologia da área de origem em conjunto. Infecções virais normalmente causam alguns sinais inespecíficos, principalmente porque muitas delas cursam com febre; logo, etiologias virais, como influenza e herpesvírus, devem ser incluídas como possibilidades diagnósticas nesses casos suspeitos. Devido à variabilidade na apresentação clínica e questões regulatórias, a anemia infecciosa equina deve ser considerada como um diagnóstico diferencial para cavalos com febre de origem desconhecida (HINES, 2018).

Além disso, é importante realizar investigações sobre a possibilidade de outras etiologias ainda desconhecidas ou não relatadas na região. Embora, *T. haneyi* ainda não tenha sido descrita no Brasil, essa espécie é capaz de causar doença subclínica, aguda e crônica em cavalos, semelhante à *T. equi*, embora pareça que o parasito possa ser menos virulento e mais refratário ao tratamento com imidocarb (KNOWLES et al., 2018; SEARS et al., 2019; SEARS

et al., 2020; SEARS et al., 2022). Levando em conta essa possibilidade e 17/45 resultados negativos para os agentes testados no presente estudo, as amostras também foram submetidas a PCR para detecção de *T. haneyi*, mas nenhuma delas mostrou resultado positivo (dados não mostrados).

Borreliose é outro diagnóstico a ser considerado (ARTURSSON et al., 1999). Embora pouco estudada no Brasil, a doença já foi descrita apresentando diferenças da doença de Lyme tradicionalmente encontrada no hemisfério norte e alguns estudos sorológicos em animais demonstraram a circulação da bactéria no país, mesmo sendo uma doença pouco diagnosticada em equinos e pouco compreendida por veterinários (BASILE et al., 2017). No estado do Paraná, 7/18 (38,9%) equinos testados sorologicamente foram positivos por IFAT para anticorpos anti-*B. burgdorferi* (NASCIMENTO et al., 2016), além da detecção da bactéria por PCR em carrapatos *Dermacentor nitens* que parasitavam cavalos (GONÇALVES et al., 2013). Usando o teste ELISA, 215/367 (58,6%) cavalos no Mato Grosso apresentavam anticorpos anti-*B. burgdorferi*, embora a bactéria não tenha sido detectada em nenhuma das 89 amostras testadas por PCR (SOCOLOSKI et al., 2018). No Mato Grosso do Sul, 54/262 (20,6%) equinos foram sorologicamente positivos para anticorpos anti-*B. burgdorferi* no teste ELISA e o teste molecular mostrou positividade de 32,4% (85/262) para *Borrelia* spp. (CAMPOS et al., 2021). Um total de 15/55 (27,3%) cavalos em Minas Gerais também demonstraram sorologia positiva para *B. burgdorferi* no teste ELISA (MONTANDON et al., 2014). No Rio de Janeiro, a análise de 769 soros de equinos, por ELISA, 28,1% dos animais foram positivos para borreliose (MADUREIRA, 2004). A pesquisa de borreliose em equinos com sinais inespecíficos seria interessante para a confirmação da doença no Brasil e para o entendimento da função do cavalo na epidemiologia da doença, já que se trata de uma zoonose.

Também é possível que síndromes inespecíficas sejam causadas por outros agentes ainda desconhecidos ou por agentes aberrantes, que normalmente não causariam doença em cavalos, mas que por uma debilidade no sistema imunológico pode levar à clínica. Um exemplo é o relato de Seo et al. (2019), que detectaram infecção por *Anaplasma bovis*, por meio de técnicas moleculares, em um cavalo de 23 anos na Coreia, causando sintomatologia inespecífica (baixo escore de condição corporal, febre, anorexia, letargia e desidratação). Na região centro-oeste do Brasil, através de PCR, em uma abordagem multigênica para detecção de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp., seguida de sequenciamento genético, 3/148 cavalos (2,03%) foram positivos para *E. minasensis*, apesar de não ter sido encontrada significância estatística entre os sinais clínicos encontrados em alguns animais e os resultados de PCR (MURARO et al., 2021b). Embora esses achados indiquem novas espécies infectando cavalos, não é possível afirmar ainda que são patogênicas, mas a pesquisa por novos agentes etiológicos é fundamental para a compreensão de doenças com sintomatologia inespecífica e tornar as possibilidades diagnósticas mais consistentes em relação à epidemiologia da região.

Os dez sinais clínicos mais observados nesse estudo foram mucosas hipocoradas (30 – 66,7%), edema de membros (27 – 60%), mucosas ictéricas (24 – 53,3%), apatia (22 – 48,9%), baixo escore de condição corporal (22 – 48,9%), edema de pálpebras (19 – 42,2%), febre (16 – 35,6%), edema ventral e/ou de prepúcio (11 – 24,4%), hiporexia (10 – 22,2%) e letargia (10 – 22,2%). Mas houve diferença estatística apenas para edema de membros, com maior frequência de observação em outras causas do que para infecção por *T. equi* e para coinfeção Piroplasmida; hiporexia, com maior frequência de observação para as infecções por *B. caballi* do que para coinfeção Piroplasmida; e letargia, com maior frequência de observação nas coinfeções Piroplasmida do que para outras causas. No entanto, a avaliação da presença de sinais clínicos de acordo com os agentes encontrados fica prejudicada devido ao número de amostras reduzido e à diferença na quantidade de indivíduos em cada grupo. Resultados semelhantes também foram encontrados na Venezuela, onde os sinais clínicos mais comuns encontrados em animais com PE, diagnosticados por PCR, foram edema dos membros (4/6),

mucosas pálidas (3/6) e lacrimejamento (5/6) (RISSO et al., 2022). Mas nesse estudo, não foi avaliada a relação entre manifestação com o agente identificado. Nesse mesmo estudo, outros cinco animais também apresentaram sinais clínicos compatíveis, como petéquias (4/5), lacrimejamento (4/5) e edema de membros (2/5) mas resultado negativo por PCR para PE, tripanossomose, AGE e micoplasmose, (RISSO et al., 2022). A presença dos mesmos sinais clínicos em doenças de diferentes etiologias provavelmente está relacionada à resposta dos equinos às infecções. O estímulo à produção de citocinas pró-inflamatórias e o desequilíbrio no estado oxidativo pode ser a característica em comum das causas de síndromes febris inespecíficas, levando ao aparecimento de manifestações tão semelhantes que impossibilitam a distinção clínica entre elas.

Mucosas hipocoradas estão relacionadas à anemia e redução da perfusão. A anemia é uma das anormalidades consistentes com infecção ou inflamação crônica, sendo um achado comum e que normalmente está acompanhada de outros sinais inespecíficos, como febre, letargia, apatia, hiporexia e anorexia (HINES, 2018). Como a patogenia da PE envolve lesão direta e indireta aos eritrócitos, levando à anemia, mucosas hipocoradas tendem a ser um achado consistente dessa condição. Em doenças de outras etiologias, provavelmente o mecanismo que leva à anemia tende a ser a lesão indireta às hemácias devido à resposta inflamatória mediada por citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio.

Por outro lado, a icterícia envolve mecanismos mais diversos, podendo estar relacionada a produção aumentada de bilirrubina, captação ou conjugação hepática prejudicada da bilirrubina e excreção prejudicada de bilirrubina. A icterícia é causada por hiperbilirrubinemia com subsequente deposição do pigmento nos tecidos, causando coloração amarela, especialmente na pele não pigmentada, como as membranas mucosas (DIVERS; BARTON, 2018). A hiperbilirrubinemia hemolítica ou pré-hepática ocorre naquelas doenças em que há dano aos eritrócitos, tanto por hemólise intravascular como extravascular, porque a taxa de produção de bilirrubina pelo sistema reticuloendotelial excede temporariamente a capacidade do fígado de conjugar e excretar bilirrubina não conjugada (indireta) (DIVERS; BARTON, 2018). Pela lesão direta aos eritrócitos durante a PE, seria de se esperar que a icterícia fosse um sinal mais frequentemente encontrado, no entanto, outros mecanismos de acúmulo de bilirrubina podem estar presentes em processos infecciosos e inflamatórios. Síndromes inespecíficas normalmente cursam com febre associada a variados graus de anorexia. A anorexia em cavalos é um importante causador de hiperbilirrubinemia e pode estar relacionada à ligandina, a proteína intra-hepática responsável pela extração da bilirrubina não conjugada da albumina no sangue sinusoidal: a meia-vida da ligandina é relativamente curta e a fome reduz o estoque dessa proteína nos hepatócitos, impedindo a captação de bilirrubina para conjugação e excreção (DIVERS; BARTON, 2018). Outra causa seria a lesão hepática produzida pela ação de citocinas circulantes e pelo estresse oxidativo, além da redução do fluxo sanguíneo para os hepatócitos pela estase venosa ou dano endotelial. A doença hepatocelular aguda leva à hiperbilirrubinemia indireta, chamada de icterícia hepática ou de retenção, devido à captação e conjugação prejudicadas da bilirrubina (DIVERS; BARTON, 2018). É importante lembrar que, na maioria das vezes, esses mecanismos atuam em conjunto nos processos patológicos inespecíficos, contribuindo para a icterícia. Mas outras condições também podem ser responsáveis por esse sinal, como naquelas em que ocorre o bloqueio do fluxo biliar (icterícia de regurgitação) impedindo a excreção de bilirrubina conjugada no trato biliar, como nos casos de colangite, hepatite, colelitíase obstrutiva, infiltração neoplásica, fibrose, obstrução física do trato biliar associada a deslocamentos do cólon ou úlceras duodenais, ou hiperplasia do trato biliar (DIVERS; BARTON, 2018).

Edemas são causados por acúmulo excessivo e anormal de líquido no interstício (tecido conjuntivo intercelular). O tipo de edema mais frequentemente reconhecido em equinos é o edema periférico, frequentemente observado nos membros, ao longo do ventre ou nas pálpebras

(HINES, 2018), compatível com o observado nos animais desse estudo. A regulação do fluxo de líquido nos tecidos depende de diferenças de pressão oncótica e hidrostática transcápilar, da presença de endotélio saudável e funcional, com membrana basal e canais de água seletivos (aquaporinas) preservados e da drenagem normal de líquido e proteínas pelos vasos linfáticos (HINES, 2018). Nas síndromes inespecíficas, a anorexia e as alterações hepáticas resultantes da resposta inflamatória e hipoperfusão podem causar um desequilíbrio nas concentrações plasmáticas de proteínas, principalmente a albumina. A alteração do gradiente oncótico através do endotélio capilar, resulta em um aumento no efluxo de líquido do capilar para o interstício (HINES, 2018). Na PE, alterações na superfície de membrana dos eritrócitos podem provocar uma diminuição do fluxo sanguíneo venoso, principalmente na periferia do corpo (AMBAWAT et al., 1999). A consequente estase sanguínea provoca um discreto aumento da pressão venosa, que é capaz de provocar aumento da pressão hidrostática dentro dos capilares, principalmente em regiões distais ao coração, favorecendo o extravasamento de líquido para o espaço intercelular (HINES, 2018). A redução da movimentação devido à letargia e apatia também podem contribuir para a formação do edema, já que a drenagem linfática depende de fatores extrínsecos para manter o fluxo de linfa, incluindo atividade muscular e postura. O movimento aumenta o fluxo linfático, pelo menos em parte, devido ao aumento da pressão tecidual associada à contração muscular, além de reduzir a estase venosa (HINES, 2018). Apesar desses fatores predisponentes, talvez o principal motivo da formação de edemas nas doenças febris seja o dano endotelial provocado pela resposta inflamatória. O endotélio forma uma barreira dinâmica entre o sangue e o tecido e a microvasculatura é sensível a danos por meio de vários mecanismos, incluindo forças mecânicas, lesão por isquemia-reperfusão, sepse e inflamação (HINES, 2018). Um aumento na permeabilidade da membrana capilar pode aumentar o transporte de líquido e proteínas para o interstício e diminuir a capacidade da membrana de manter uma diferença na pressão oncótica entre o plasma e o interstício (HINES, 2018).

O aumento da temperatura corporal afeta a homeostase, sendo a responsável por outros sinais clínicos, como letargia, apatia, taquicardia, taquipneia, hiporexia/anorexia, desidratação, entre outros. A febre é uma parte da resposta de fase aguda à infecção ou inflamação, envolvendo mecanismos neuronais e humorais, que incluem a estimulação de aferentes vagais e produção de várias citocinas pró-inflamatórias que atuam como pirógenos endógenos (HINES, 2018). Além disso, muitos produtos microbianos atuam como pirógenos exógenos, iniciando a febre pela ativação do sistema imune, principalmente pela cascata do complemento, que estimula a produção de PGE<sub>2</sub>, considerado o principal mediador da febre, atuando em neurônios hipotalâmicos termossensíveis (HINES, 2018). Pelo menos 11 citocinas, geralmente pró-inflamatórias, produzidas predominantemente por monócitos e macrófagos, demonstram ser pirogênicas, além de produzirem uma variedade de efeitos biológicos além da febre. Entre elas estão: IL-1  $\alpha$  e  $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-6 e IFN- $\alpha$  (HINES, 2018). Parece que os pirógenos endógenos têm mecanismos de ação periféricos e centrais que incluem estimulação de vias neuronais aferentes, indução da síntese de PGE<sub>2</sub> em células endoteliais na periferia e no cérebro e ação direta no cérebro por meio de receptores de citocinas neuronais (HINES, 2018). Como faz parte de uma resposta à inflamação/infecção, a febre geralmente é acompanhada por alterações hematológicas, imunológicas e metabólicas adicionais referidas como resposta de fase aguda, incluindo o estímulo do catabolismo muscular, que leva a dores e relutância ao movimento, e de impulsos neurais aferentes que levam a respostas comportamentais, como letargia e anorexia (HINES, 2018).

O baixo escore de condição corporal normalmente reflete um processo crônico. Nos casos de PE encontrados nesse estudo que apresentavam condição corporal ruim, provavelmente resultam de uma infecção crônica/subclínica que sofreu um processo de reagudização, demonstrando outros sinais adicionais. O baixo escore de condição corporal pode estar relacionado a um emagrecimento abrupto ou a longo prazo e até mesmo a queda de

performance, no sentido de capacidade de conversão alimentar, dificultando o ganho de peso. Existem basicamente dois mecanismos gerais de perda de peso: diminuição da ingestão de energia e aumento da demanda de energia: quando a ingestão energética é insuficiente para atender às necessidades metabólicas, os estoques de energia são utilizados e há perda de peso corporal (HINES, 2018). Fatores importante a serem considerados quando ocorre emagrecimento ou dificuldade em ganho de peso em cavalos é a qualidade e quantidade da alimentação oferecida e condições fisiológicas que requerem aumento de energia, como gestação, lactação, exercícios intensos e estresse ambiental (HINES, 2018). Quase qualquer processo de doença, incluindo parasitismo, doenças infecciosas, neoplasias, distúrbios imunológicos, toxicidades, disfunção orgânica crônica e endocrinopatias podem resultar em perda de peso (HINES, 2018). A anorexia/hiporexia, frequentemente presente nas síndromes febris inespecíficas, pode contribuir para a perda de peso, principalmente quando prolongada. Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na anorexia não são totalmente compreendidos, mas parece haver distúrbios nas vias hipotalâmicas que controlam a homeostase energética e que múltiplos mediadores, incluindo hormônios, neuropeptídeos e citocinas, como IL-1 e TNF- $\alpha$ , estão envolvidos (HINES, 2018). Além disso, processos patológicos normalmente estão associados a aumento do gasto de energia para combater os agentes etiológicos, compensar alterações provocadas pela doença e recuperar tecidos lesados. A febre, por exemplo, é uma resposta orgânica que gera grande gasto energético pela maior taxa metabólica necessária para aumentar a temperatura corporal, além de favorecer o catabolismo e promover anorexia (HINES, 2018). O estresse associado à doença também pode alterar o metabolismo devido ao aumento da atividade simpática e hormonal, resultando em concentrações sistêmicas elevadas de catecolaminas e cortisol, o que leva a um estado catabólico (HINES, 2018). O TNF- $\alpha$  apresenta efeitos catabólicos, podendo levar a perda muscular, geralmente associada a perda de peso total, mas que também pode ocorrer como resultado de atrofia muscular (HINES, 2018; PASOLINI et al., 2018).

O hemograma completo fornece informações sobre as concentrações de células sanguíneas e sua morfologia, sendo uma importante ferramenta de avaliação e acompanhamento dos processos de doença (WALTON, 2013). No entanto, as alterações hematológicas nas síndromes inespecíficas tendem a ser semelhantes, provavelmente porque os mecanismos pelos quais ocorrem as alterações são similares.

Ao todo, 38 cavalos somaram 127 alterações hematológicas individuais em relação aos valores de referência. Nos animais com PE por pelo menos um dos agentes e sintomáticos avaliados nesse estudo, foi notada redução na contagem de hemácias, hematócrito e concentração de hemoglobina em 25%, 62,5% e 66,7%, respectivamente. Já no estado de São Paulo, equinos assintomáticos e positivos para PE por PCR, apresentaram redução na contagem de hemácias (76,7%), hematócrito (63,3%) e concentração de hemoglobina (60%) abaixo dos valores de referência (DÓRIA et al., 2016). É interessante observar que a queda no número de eritrócitos foi bem menos frequente nos animais com PE aguda do que naqueles com PE crônica, embora as reduções de hematócrito e concentração de hemoglobina sejam próximas nas duas condições da doença. Mas é improvável que toda alteração encontrada no hemograma de animais infectados com Piroplasmidas sejam resultado da infecção. Em outro estudo, no Paraná, embora 52,43% dos cavalos sem sinais clínicos avaliados para presença de patógenos transmitidos por carrapatos estivessem anêmicos (hematócrito médio  $31 \pm 0,04\%$ ) e 32% deles apresentaram resultado positivo para PE por PCR, não foi encontrada associação entre anemia e positividade para os protozoários (VALENTE et al., 2019). No presente estudo, 50% dos animais sintomáticos não infectados por agentes da PE também apresentaram hematócrito abaixo do limite inferior da referência. Casos de anemia podem ser multifatoriais, envolvendo não só a infecção por hemopatógenos, mas também outros fatores, como qualidade nutricional, parasitoses intestinais e infestação por carrapatos, por exemplo.

A maioria das alterações individuais encontradas nos hemogramas não interferiu na avaliação de médias e medianas para cada grupo de resultado diferente no exame de qPCR em comparação ao intervalo de referência. Foi possível identificar diminuição do hematócrito para a infecção por *B. caballi* e coinfeções de Piroplasmidas, redução do CHCM para infecções por *T. equi* e coinfeções de Piroplasmidas e redução de hemoglobina dos animais com infecção simples ou dupla dos protozoários, quando consideradas apenas as médias dos grupos. No entanto, quando se leva em consideração o desvio padrão, esses parâmetros podem estar tanto reduzidos quanto dentro do intervalo de referência, exceto para hematócrito e concentração de hemoglobina nas coinfeções por Piroplasmidas, que continuaram inferiores aos valores normais da espécie.

Alterações nesses parâmetros são compatíveis com um quadro de anemia. A anemia faz parte de uma resposta do organismo à inflamação/infecção, principalmente quando crônica (HINES, 2018). É de se esperar que alterações indicativas de anemia sejam mais evidentes nas doenças que envolvem lesão direta às hemácias, devido à infecção dessas células, como no caso da PE. A hemólise desencadeada pelos parasitos resulta em diminuição do número de eritrócitos circulantes, com isso, a proporção dessas células ficam reduzidas em relação aos outros componentes do sangue (queda do hematócrito). Além disso, a concentração de hemoglobina diminui, primeiramente porque há menos células com hemoglobina circulando e essa proteína, quando livre na corrente sanguínea pela lise das hemácias, é recaptada e processada pelo fígado, produzindo bilirrubina. De maneira geral, em mamíferos, o hematócrito e concentração de hemoglobina estão intimamente relacionados, mantendo uma proporção aproximada de 3:1 (WALTON, 2013). É possível que nas coinfeções ocorra um efeito aditivo dos protozoários, resultando em maior hemólise e, conseqüentemente, maior redução do hematócrito e da concentração de hemoglobina.

Os índices hematimétricos são obtidos por cálculos que envolvem os valores de hematócrito, contagem de hemácias e hemoglobina. CHCM é obtido pela divisão de HCM por VCM ou pela divisão da concentração de hemoglobina pelo hematócrito, e representa a quantidade de hemoglobina presente por volume de hemácias (WALTON, 2013). Logo, se há redução da concentração de hemoglobina desproporcional à queda do hematócrito, ocorre redução também do CHCM. Em resposta à anemia, a eritropoetina é liberada devido a hipoxemia causada pela diminuição da massa circulante de eritrócitos, o que estimula a medula óssea a produzir e liberar células sanguíneas (WALTON, 2013). Essa é a chamada resposta regenerativa e pode levar a alterações discretas nos índices hematimétricos dos cavalos. Equinos demonstram uma resposta macrocítica e normocrômica, pois essa espécie libera poucos reticulócitos na circulação após anemia leve a moderada; logo, HCM ou CHCM não são indicadores úteis de regeneração, pois seu aumento está mais relacionado a artefatos da análise (WALTON, 2013). Diminuições em HCM ou CHCM também são pouco significativas em cavalos. A hipocromia pode ser observada em anemias por deficiência de ferro (WALTON, 2013; OVERMANN, 2018). Como as médias de CHCM para infecções simples por *T. equi* e para coinfeções com *B. caballi* se mostraram ligeiramente inferior ao intervalo de referência, é possível que a infecção pelos protozoários, principalmente *T. equi*, altere a disponibilidade de ferro, conforme apontado em outros trabalhos (DE WAAL et al., 1987; TAKEET et al., 2009). Assim, a característica de persistência desses agentes poderia induzir uma anemia de doença crônica.

É importante salientar que a avaliação de exames isolados pode não refletir o processo de doença, sendo necessário a repetição dos exames para uma interpretação adequada. Os exames de sangue refletem o momento em que foi realizada a colheita e amostras de animais em diferentes momentos da evolução da doença aguda pode ser um dos fatores responsáveis pela heterogeneidade dos resultados dos hemogramas em cada grupo. As diferenças na origem dos equinos amostrados e nos tipos de manejo sanitário e nutricional de cada um deles também

pode interferir nos exames de sangue. Com isso, um animal com PE aguda, ou seja, passando por um processo de hemólise, não necessariamente vai demonstrar indicativos de anemia no hemograma, por exemplo; a redução dos parâmetros específicos pode estar ocorrendo, mesmo que não tenham ultrapassado o limite inferior da referência.

Além disso, algumas vezes os valores do hemograma podem ser mascarados. O baço equino pode armazenar 50% da massa de hemácias e transferir rapidamente grande número de eritrócitos para a circulação sistêmica após contração (WALTON, 2013). A contração esplênica pode resultar em eritrocitose ou VG normal, enquanto a desidratação produz aumentos concomitantes no VG e na concentração de proteínas plasmáticas (WALTON, 2013). A desidratação e a contração esplênica (associada a um estresse agudo ambiental durante a colheita ou mesmo relacionado à própria doença) podem estar presentes em animais com sintomatologia febril. Essas situações fazem com que os parâmetros hematológicos sejam superestimados e avaliados como acima da referência, quando na verdade estão normais, ou como normais, quando na realidade estão diminuídos.

As médias para contagem de plaquetas não demonstram alterações quando avaliadas isoladamente, mas, considerando o desvio padrão, podem encontrar-se dentro do intervalo de referência ou reduzidas para as infecções por *B.caballi* ou naqueles animais nos quais o resultado da qPCR foi negativo para todos os agentes testados. As causas da trombocitopenia são aumento do uso de plaquetas, diminuição da produção, aumento da destruição e sequestro, mas normalmente está relacionada à ativação e consumo por processos inflamatórios devido a estímulos pró-trombóticos, especialmente por ativadores plaquetários como trombina e fator ativador plaquetário (WALTON, 2013). A trombocitopenia equina imunomediada é causada por condições infecciosas, neoplásicas e idiopáticas e ocorre pela deposição de imunocomplexos e destruição mediada pela ação de anticorpos, como ocorre na anemia infecciosa equina (AIE) e possivelmente na AGE, por exemplo (SISKA et al., 2013; WALTON, 2013).

A avaliação de alterações hematológicas de acordo com os agentes encontrados fica prejudicada devido ao número de amostras reduzido e à diferença na quantidade de indivíduos em cada grupo. Ocorreu diferença estatisticamente significativa apenas para VCM ( $p = 0,0154$ ) e HCM ( $p = 0,0183$ ), sendo que a coinfeção por Piroplasmidas tendeu a um valor menor para os dois parâmetros do que em outras causas que não a PE, mas as medianas de ambos os grupos estavam dentro do intervalo de referência.

VCM (volume corpuscular médio) é calculado através da divisão do hematócrito pela quantidade de hemácias, representando o volume de cada eritrócito (WALTON, 2013). O aumento do VCM, ou macrocitose, ocorre pela liberação de macrócitos com aproximadamente o dobro do tamanho de um eritrócito normal e é um dos primeiros parâmetros a mostrar alteração após a anemia, além de ser um indicador de regeneração mais sensível do que o VG (WALTON, 2013). Apesar disso, nem sempre a macrocitose vai ser refletida como aumento dos valores de VCM acima da referência, especialmente nas anemias hemolíticas, sendo necessário um acompanhamento seriado (WALTON, 2013). Por outro lado, a causa mais comum de microcitose em cavalos é fisiológica e associada à idade, embora a deficiência funcional de ferro nas anemias de doença crônica pode resultar em microcitose (WALTON, 2013).

A avaliação de exames pontuais na comparação entre os grupos não é precisa, seria necessário o acompanhamento seriado dos animais para esclarecer o significado da diferença. É possível que outras etiologias apresentem uma resposta regenerativa com maior liberação de macrócitos. Mas é uma hipótese com pouca fundamentação, já que os macrócitos podem se manter na circulação mesmo após a normalização do VG e contagem de hemácia, apresentando valores de VCM altos, o que indica uma resposta regenerativa passada recente e não necessariamente do processo agudo do momento da colheita (WALTON, 2013). É mais

provável que ocorra uma redução relativa do VCM nas coinfeções de PE, relacionado a uma anemia de doença crônica, pela indisponibilidade do ferro, que pode estar com níveis sanguíneos reduzidos na PE (DE WAAL et al., 1987; TAKEET et al., 2009), já que os parasitos têm a característica de infecção persistente.

HCM (hemoglobina corpuscular média) é calculado pelo valor de hemoglobina dividido pelo número de hemácias, o que significa a quantidade de hemoglobina presente em cada célula (WALTON, 2013). O HCM e o CHCM representam a quantidade e a concentração de hemoglobina, respectivamente (WALTON, 2013). No entanto, o HCM é um parâmetro pouco usado em equinos. O CHCM é normalmente considerado mais útil em comparação com o HCM, pois o tamanho da célula é levado em consideração no cálculo (OVERMANN, 2018). Qualquer aumento no HCM e/ou CHCM de equinos indica artefato porque não é fisiologicamente possível que esses índices aumentem fora do limite superior de referência; essa espécie apresenta respostas regenerativas tipicamente normocrômicas, já que liberam poucos reticulócitos (WALTON, 2013). Aumentos de HCM estão relacionados a medições espúrias de hemoglobina ou hemácias, podendo ocorrer por subcontagem de hemácias devido a aglutinação da amostra, presença de lipemia, icterícia ou de corpúsculos de Heinz que resultam em falso aumento de hemoglobina, ou à hemólise *in vitro*, pois o número de hemácias intactas é desproporcionalmente baixo para a quantidade de hemoglobina medida (WALTON, 2013; OVERMANN, 2018). Diminuições em HCM ou CHCM também são pouco significativas em cavalos. A hipocromia pode ser observada em anemias por deficiência de ferro (WALTON, 2013; OVERMANN, 2018).

Novamente, a avaliação de exames pontuais na comparação entre os grupos não é precisa, necessitando-se de um acompanhamento seriado dos animais para esclarecer o significado da diferença. Pode ser que outras etiologias causem mais alterações como lipemia, icterícia ou corpúsculos de Heinz, em relação às coinfeções de PE, o que aumentaria o HCM. Mas também é possível que ocorra uma redução relativa do HCM nas coinfeções de PE, relacionado a uma anemia de doença crônica, pela indisponibilidade do ferro, que pode estar com níveis sanguíneos reduzidos na PE (DE WAAL et al., 1987; TAKEET et al., 2009), já que os parasitos têm a característica de infecção persistente. Como não houve diferença significativa entre os grupos para CHCM, a comparação através do HCM fica ainda mais questionável, embora as médias de CHCM para infecções simples por *T. equi* e para coinfeções com *B. caballi* tenham se mostrado ligeiramente inferior ao intervalo de referência.

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados no presente estudo indicam que *A. phagocytophilum* é um agente etiológico de menor importância no estado do Rio de Janeiro, já que a bactéria não foi encontrada em nenhum animal com sinal clínico; logo AGE não deve ser considerada como uma suspeita principal nos casos de síndrome febril inespecífica. Por outro lado, protozoários causadores de PE em infecções simples ou múltiplas são frequentemente encontrados em cavalos com manifestações clínicas, representando um importante diagnóstico diferencial nos casos suspeitos.

Dentre os casos de PE, *T. equi* está associado a maior número de animais sintomáticos do que a infecção por *B. caballi*. Outras etiologias também podem causar síndromes com sinais inespecíficos em cavalos.

Os sinais clínicos e os parâmetros hematológicos tendem a ser semelhantes nas doenças febris inespecíficas, sendo mucosas hipocoradas, edema de membros e mucosas ictéricas os

principais achados clínicos e redução do hematócrito, da concentração de hemoglobina e do CHCM como as principais alterações do hemograma. Edema de membros tende a ser mais comum nos casos de outra etiologia do que nas infecções por *T. equi* e coinfeções por Piroplasmidas. Hiporexia é mais frequentemente observada nos casos de *B. caballi* do que nas coinfeções por Piroplasmidas e letargia está mais presente nos animais com PE coinfectados pelos dois protozoários do que em outras causas. VCM e HCM também demonstraram tendência a um valor inferior nas coinfeções por Piroplasmidas quando comparada a outras causas.

Os clínicos veterinários devem se atentar não só aos sinais clínicos e exames hematológicos, mas também ao histórico do animal e à epidemiologia da região para levantar a suspeita diagnóstica. Destaca-se também a importância dos exames moleculares para a determinação do diagnóstico. O uso dessas ferramentas deve ser ampliado sempre que possível, na tentativa de estabelecer um diagnóstico definitivo para os animais com sintomas inespecíficos, guiando a escolha terapêutica adequada para cada caso.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADASZEK, L.; WINIARCZYK, S. Identification of Anaplasma spp. Rickettsia Isolated from Horses from Clinical Disease Cases in Poland. **Zoonoses Public Health**, v. 58, p. 514-518, 2011. doi: 10.1111/j.1863-2378.2011.01394.x

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. doi: [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(75\)90053-3](https://doi.org/10.1016/0014-4894(75)90053-3) (a)

ALLEN, P. C.; FRERICHS, W. M.; HOLBROOK, A. A. Experimental acute *Babesia caballi* infections. II. Response of platelets and fibrinogen. **Experimental parasitology**, v. 37, n. 3, p. 373-379, 1975. doi: [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(75\)90006-5](https://doi.org/10.1016/0014-4894(75)90006-5) (b)

ALLSOPP, M. T. E. P.; LEWIS, B. D.; PENZHORN, B. L. Molecular evidence for transplacental transmission of *Theileria equi* from carrier mares to their apparently healthy foals. **Veterinary Parasitology**, v. 148, p. 130-136, 2007. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.05.017>

AMBAWAT, H. K.; MALHOTRA, D. V.; KUMAR, S.; DHAR, S. Erythrocyte associated haemato-biochemical changes in *Babesia equi* infection experimentally produced in donkeys. **Veterinary parasitology**, v. 85, n. 4, p. 319-324, 1999. doi: [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(99\)00110-7](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(99)00110-7)

ARTURSSON, K.; GUNNARSSON, A.; WIKSTRÖM, U. B.; ENGVALL, E. O. A serological and clinical follow-up in horses with confirmed equine granulocytic ehrlichiosis. **Equine Veterinary Journal**, v. 31, n. 6, p. 473-477, 1999. doi: <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1999.tb03853.x>

BARROS, E. M.; BRAGA, Í. A.; SANTOS, L. G. F.; ZILIANI, T. F.; MELO, A. L. T.; BORGES, A. M. C. M.; SILVA, L. G.; AGUIAR, D. M. Detecção de *Theileria equi* e *Babesia caballi* e anticorpos anti-*Ehrlichia* spp. em equídeos do Pantanal Mato-Grossense, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, p. 716-722, 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-7930>

BASILE, R. C.; YOSHINARI, N. H.; MANTOVANI, E.; BONOLDI, V. N.; MACORIS, D. D. G.; QUEIROZ-NETO, A. D. Brazilian borreliosis with special emphasis on humans and horses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 167-172, 2017. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.09.005>

BASIT, A.; MUHAMMAD, A.; HUSSAIN, G.; IRFAN, S.; SAQIB, M.; IFTIKHAR, A.; MUSTAFA, I.; MUKHTAR, I.; ANWAR, H. Effect of equine piroplasmiasis on hematological and oxidative stress biomarkers in relation to different seasons in District Sargodha, Pakistan. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 40, n. 1, p. 43-48, 2020. doi: <http://dx.doi.org/10.29261/pakvetj/2020.009>

BELLOLI, C., CRESCENZO, G., LAI, O., CAROFIGLIO, V., MARANG, O., & ORMAS, P. Pharmacokinetics of imidocarb dipropionate in horses after intramuscular administration. **Equine Veterinary Journal**, v. 34, n. 6, p. 625-629, 2002. doi: <https://doi.org/10.2746/042516402776180124>

BERMANN, F.; DAVOUST, B.; FOURNIER, P. E.; BRISOU-LAPOINTE, A. V.; BROUQUI, P. *Ehrlichia equi* (*Anaplasma phagocytophila*) infection in an adult horse in France. **Veterinary Record**, v. 150, n. 25, p. 787-788, 2002. doi: 10.1136/vr.150.25.787

BHOORA, R.; QUAN, M.; FRANSSSEN, L.; BUTLER, C. M.; VAN DER KOLK, J. H.; GUTHRIE, A. J.; ZWEYGARTH, E.; JONGEJAN, F.; COLLINS, N. E. Development and evaluation of real-time PCR assays for the quantitative detection of *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses from South Africa. **Veterinary parasitology**, v. 168, n. 3-4, p. 201-211, 2010. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.11.011>

BONI, M.; ROLAIN, J. M.; PORTELLI, C.; MARIÉ, J. M.; DAVOUST, B.; BROUQUI, P. Isolated fever in horses: a new case of equine anaplasmosis in France. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, p. 64-65, 2009. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02181.x

BOTTEON, P. T. L., MASSARD, C. L.; BOTTEON, R. C. C. M.; LOSS, Z. G.; LINHARES, G. F. C. Seroprevalence of *Babesia equi* in three breeding systems of equines: Rio de Janeiro - Brazil. **Parasitología Latinoamericana**, Santiago, v. 57, n. 3-4, p. 141-145, 2002. doi: 10.4067/S0717-77122002000300010.

CALIC, S. B.; GALVÃO, M. A.; BACELLAR, F.; ROCHA, C. M.; MAFRA, C. L.; LEITE, R. C.; WALKER, D. H. Human ehrlichioses in Brazil: first suspect cases. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 3, p. 259-262, 2004. doi: 10.1590/s1413-86702004000300011

CAMPOS, J. B. V.; MARTINS, F. S.; OLIVEIRA, C. E.; TAVEIRA, A. A.; OLIVEIRA, J. R.; GONÇALVES, L. R.; CORDEIRO, M. D.; CALCHI, A. C.; BINDER, L. C.; SERPA, M. C. A.; BARBIERI, A. R. M.; LABRUNA, M. B.; MACHADO, R. Z.; ANDRADE, G. B.; ANDRÉ, M. R.; HERRERA, H. M. Tick-borne zoonotic agents infecting horses from an urban area in Midwestern Brazil: epidemiological and hematological features. **Tropical Animal**

**Health and Production**, v. 53, p. 1-11, 2021. doi: <https://doi.org/10.1007/s11250-021-02887-w>

COSTA, S. C. L. **Pesquisa de Patógenos em Equídeos da Microrregião de Ilhéus-Itabuna, Bahia, Brasil**. 2017. 140f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2017.

COSTA, S. C. L.; FREITAS, J. S.; CARVALHO, F. S.; PEREIRA, M. J. S.; CORDEIRO, M. D.; FONSECA, A. H.; JUSI, M. M. G.; MACHADO, R. Z.; MUNHOZ, A. D. Frequency and factors associated of potential zoonotic pathogens (*Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Leishmania* spp., and *Anaplasma phagocytophilum*) in equids in the state of Bahia, Brazil. **Parasites & vectors**, v. 14, n. 1, p. 275, 2021. doi: <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04777-4>

DEANE, E. L.; FIELDING, C. L.; RHODES, D. M.; HOWARD, E. J. Upper respiratory signs associated with *Anaplasma phagocytophilum* infection in two horses. **Equine Veterinary Education**, v. 33, n. 3, p. e58-e61, 2021. doi: 10.1111/eve.13128

DEDE, S.; DEGER, Y.; DEGER, S.; TANRITANIR, P. Plasma levels of zinc, copper, copper/zinc ratio, and activity of carbonic anhydrase in equine piroplasmiasis. **Biological Trace Element Research**, v. 125, p. 41-45, 2008. <https://doi.org/10.1007/s12011-008-8136-5>

DE WAAL, D.T. Equine piroplasmiasis: A review. **British Veterinary Journal**, v. 148, n. 1, p. 6-14, 1992. doi:10.1016/0007-1935(92)90061-5

DE WAAL, D. T.; VAN HEERDEN, J.; POTGIETER, F. T. An investigation into the clinical pathological changes and serological response in horses experimentally infected with *Babesia equi* and *Babesia caballi*. **The Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 4, p. 561-568, 1987.

DIVERS, T. J.; BARTON, M. H. Disorders of the Liver. In: REED, S. M.; BAYLY, W. M.; SELLON, D. C. **Equine Internal Medicine**. 4th ed. St. Louis: Elsevier, 2018. cap. 13. p. 843-887.

DIXON, C. E.; BEDENICE, D. Transplacental infection of a foal with *Anaplasma phagocytophilum*. **Equine Veterinary Education**, v. 33, n. 3, p. 62-66, 2021. doi: 10.1111/eve.13233

DÓRIA, R. G. S.; PASSARELLI, D.; CHEQUER, T. N.; REGINATO, G. M.; HAYASAKA, Y. B.; FANTINATO NETO, P.; GRIGOLETTO, R.; FREITAS, S. H. Investigação clínica e comparação do esfregaço sanguíneo e PCR para diagnóstico de hemoparasitas em equinos de esporte e tração (carroceiros). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p. 724-730, 2016. doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000800008>

DRAZENOVICH, N.; FOLEY, J.; BROWN, R. N. Use of real-time quantitative PCR targeting the msp2 protein gene to identify cryptic *Anaplasma phagocytophilum* infections in wildlife and domestic animals. **Vector-Borne & Zoonotic Diseases**, v. 6, n. 1, p. 83-90, 2006. doi: <https://doi.org/10.1089/vbz.2006.6.83>

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families

Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 2145-2165, 2001. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2145>

DZIEGIEL, B.; ADASZEK, L.; WINIARCZYK, M.; GARCÍA-BOCANEGRA, I.; CARBONERO, A.; DEBIAK, P.; WINIARCZYK, S. Comparative analysis of 16S RNA nucleotide sequences of *Anaplasma phagocytophilum* detected in the blood of horses from various parts of Europe. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 12, p. 1891-1896, 2013. DOI 10.1099/jmm.0.058636-0

EVERTON, E. B. **Diagnóstico e Epidemiologia Molecular da Anaplasmose e Theileriose Equina no Estado do Pará**. 2014. 58f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2014.

FERREIRA, E. P.; VIDOTTO, O.; ALMEIDA, J. C.; RIBEIRO, L. P. S.; BORGES, M. V.; PEQUENO, W. H. C.; STIPP, D. T.; OLIVEIRA, C. J. B.; BIONDO, A. W.; VIEIRA, T. S. W. J.; VIEIRA, R. F. C. Serological and molecular detection of *Theileria equi* in sport horses of northeastern Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 47, p. 72-76, 2016. doi:10.1016/j.cimid.2016.06.004

FIELDING, C. L.; RHODES, D. M.; HOWARD, E. J.; MAYER, J. R. Evaluation of potential predictor variables for PCR assay diagnosis of *Anaplasma phagocytophilum* infection in equids in Northern California. **American Journal of Veterinary Research**, v. 79, n. 6, p. 637-642, 2018. doi: <https://doi.org/10.2460/ajvr.79.6.637>

FOLEY, J. E.; NIETO, N. C.; BARBET, A.; FOLEY, P. Antigen diversity in the parasitic bacterium *Anaplasma phagocytophilum* arises from selectively-represented, spatially clustered functional pseudogenes. **PloS one**, v. 4, n. 12, p. e8265, 2009. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008265> (a)

FOLEY, J.; NIETO, N. C.; MADIGAN, J.; SYKES, J. Possible differential host tropism in *Anaplasma phagocytophilum* strains in the Western United States. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1149, n. 1, p. 94-97, 2008. doi: <https://doi.org/10.1196/annals.1428.066>

FOLEY, J. E.; NIETO, N. C.; MASSUNG, R.; BARBET, A.; MADIGAN, J.; BROWN, R. N. Distinct ecologically relevant strains of *Anaplasma phagocytophilum*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 5, p. 842, 2009. doi: 10.3201/eid1505.081502 (b)

FRANZÉN, P.; ASPAN, A.; EGENVALL, A.; GUNNARSSON, A.; ABERG, L.; PRINGLE, J. Acute clinical, hematologic, serologic, and polymerase chain reaction findings in horses experimentally infected with a European strain of *Anaplasma phagocytophilum*. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 19, n. 2, p. 232-239, 2005. doi:10.1111/j.1939-1676.2005.tb02687.x

GONÇALVES, D. D.; CARREIRA, T.; NUNES, M.; BENITEZ, A.; LOPES-MORI, F. M. R.; VIDOTTO, O.; FREITAS, J. C.; VIEIRA, M. L. First record of *Borrelia burgdorferi* B31 strain

in *Dermacentor nitens* ticks in the northern region of Parana (Brazil). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 883-887, 2013. doi: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000300035>

GUSSMANN, K.; CZECH, C.; HERMANN, M.; SCHAARSCHMIDT-KIENER, D.; VON LOEWENICH, F. D. *Anaplasma phagocytophilum* infection in a horse from Switzerland with severe neurological symptoms. **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**, v. 156, p. 345-348, 2014. doi: 10.1024/0036-7281/a000605

HANAFUSA, Y.; CHO, K. O.; KANEMARU, T.; WADA R.; SUGIMOTO, C.; ONUMA, M. Pathogenesis of *Babesia caballi* infection in experimental horses. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 60 n. 10, p. 1127-1132, 1998. <https://doi.org/10.1292/jvms.60.1127>

HAPPI, A. N.; OLUNIYI, P. E. A rare case of equine haemotropic *Mycoplasma* infection in Nigeria. **Nigerian Veterinary Journal**, v. 41, n. 3, p. 274-286, 2020. doi: 10.4314/nvj.v41i3.8

HEIM, A.; PASSOS, L. M. F.; RIBEIRO, M. F. B.; COSTA-JÚNIOR, L. M.; BASTOS, C. V.; CABRAL, D. D.; HIRZMANN, J.; PFISTER, K. Detection and molecular characterization of *Babesia caballi* and *Theileria equi* isolates from endemic areas of Brazil. **Parasitology research**, v. 102, n. 1, p. 63-68, 2007. doi: 10.1007/s00436-007-0726-1

HINES, M. T. Clinical Approach to Commonly Encountered Problems. In: REED, S. M.; BAYLY, W. M.; SELTON, D. C. **Equine Internal Medicine**. 4th ed. St. Louis: Elsevier, 2018. cap. 7. p. 232-310.

HINES, S. A.; RAMSAY, J. D.; KAPPMAYER, L. S.; LAU, A. O.; OJO, K. K.; VAN VOORHIS, W. C.; KNOWLES, D. P.; MEALEY, R. H. *Theileria equi* isolates vary in susceptibility to imidocarb dipropionate but demonstrate uniform in vitro susceptibility to a bumped kinase inhibitor. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2015. doi: <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0611-6>

HURTADO, C.; TORRES, R.; PÉREZ-MACCHI, S.; SAGREDO, K.; UBERTI, B.; ZANATTO, D. C. S.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R.; BITTENCOURT, P.; MÜLLER, A. Serological and molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Thoroughbred horses from Chilean racecourses. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, n. 4, p. 101441, 2020. doi: 10.1016/j.ttbdis.2020.101441

JAFFER, O.; ABDISHAKUR, F.; HAKIMUDDIN, F.; RIYA, A.; WERNERY, U.; SCHUSTER, R. K. A comparative study of serological tests and PCR for the diagnosis of equine piroplasmiasis. **Parasitology Research**, v. 106, p. 709-713, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1669-5>

JAHN, P.; ZEMAN, P.; BEZDEKOVA, B.; PRASKOVA, I. Equine granulocytic anaplasmosis in the Czech Republic. **Veterinary Record**, v. 166, n. 21, p. 646-649, 2010. doi: 10.1136/vr.4852

JOACHIM, A.; CAVALLERI, J. V.; BERGER, S. Equine anaplasmosis and equine piroplasmiasis in Germany, Austria and Switzerland-previously anecdotal, now relevant?. **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**, v. 164, n. 1, p. 35-50, 2022. doi: 10.17236/sat00335

KAKIMORI, M. T. A.; BARROS, L. D.; COLLERE, F. C. M.; FERRARI, L. D. R.; MATOS, A.; LUCAS, J. I.; CORADI, V. S.; MONGRUEL, A. C. B.; AGUIAR, D. M.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R.; VIEIRA, T. S. W. J.; VIEIRA, R. F. C. First molecular detection of *Mycoplasma ovis* in horses from Brazil. **Acta Tropica**, v. 237, p. 106697, 2023. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106697>

KIM, C.; BLANCO, L. B. C.; ALHASSAN, A.; ISEKI, H.; YOKOYAMA, N.; XUAN, X.; IGARASHI, I. Diagnostic real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria equi* from equine blood samples. **Veterinary parasitology**, v. 151, n. 2-4, p. 158-163, 2008. doi:10.1016/j.vetpar.2007.10.023

KNOWLES, D. P.; KAPPMAYER, L. S.; HANEY, D.; HERNDON, D. R.; FRY, L. M.; MUNRO, J. B.; SEARS, K.; UETI, M. W.; WISE, L. N.; SILVA, M.; SCHNEIDER, D. A.; GRAUSE, J.; WHITE, S. N.; TRETINA, K.; BISHOP, R. P.; ODONGO, D. O.; PELZEL-MCCLUSKEY, A. M.; SCOLES, G. A.; MEALEY, R. H.; SILVA, J. C. Discovery of a novel species, *Theileria haneyi* n. sp., infective to equids, highlights exceptional genomic diversity within the genus *Theileria*: implications for apicomplexan parasite surveillance. **International journal for parasitology**, v. 48, n. 9-10, p. 679-690, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.03.010>

KNOWLES, D. P.; KAPPMAYER, L. S.; PERRYMAN, L. E. Specific immune responses are required to control parasitemia in *Babesia equi* infection. **Infect Immun**, v. 62, n. 5, p. 1909-1913, 1994. doi: 10.1128/iai.62.5.1909-1913.1994

LAUS, F.; VERONESI, F.; passamonti, F.; PAGGI, E.; CERQUETELLA, M.; HYATT, D.; TESEI, B.; FIORETTI, D. P. prevalence of tick borne pathogens in horses from Italy. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 75, n. 6, p. 715–720, 2013. doi: 10.1292/jvms.12-0449

LEPIDI, H.; BUNNELL, J. E.; MARTIN, M. E.; MADIGAN, J. E.; STUEN, S.; DUMLER, J. S. Comparative pathology and immunohistology associated with clinical disease after *Ehrlichia phagocytophila* groups. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 62, n. 1, p. 29-37, 2000.

LEWIS, B. D.; PENZHORN, B. L.; VOLKMANN, D. H. Could treatment of pregnant mares prevent abortions from equine piroplasmosis?. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 70, n. 2, p. 90-91 1999.

LEWIS J. R.; GEORGE E. Equine ehrlichiosis: a comparison between *E. equi* and other pathogenic species of *Ehrlichia*. **Veterinary Parasitology**, v. 2, n. 1, p. 61-74, 1976.

LEWIS, S. R.; ZIMMERMAN, K.; DASCANIO, J. J.; PLEASANT, R. S.; WITONSKY, S. G. Equine granulocytic anaplasmosis: A case report and review. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 29, n. 3, p. 160-166, 2009. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2009.01.002>

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.

MADUREIRA, R. C. **Frequência de anticorpos homólogos anti-*Borrelia burgdorferi* em equinos dos municípios de Três Rios, Vassouras e Valença, Estado do Rio de Janeiro**. 2004. 40f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, 2004.

MARTINS, T. F. **Estudo do complexo *Amblyomma cajennense* no Brasil**. 2014. 113 f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

MIRANDA, L. M. **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**. 2020. 58f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2020.

MIS, L.; OĞUZ, B. *Anaplasma phagocytophilum* in Horses-Evaluation of Proinflammatory Biomarkers. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 50, 2022. doi: <https://doi.org/10.22456/1679-9216.119981>

MONTANDON, C. E.; YOSHINARI, N. H.; MILAGRES, B. S.; MAZIOLI, R.; GOMES, G. G.; MOREIRA, H. N.; PADILHA, A. F.; WANDERLAY, G. G.; MANTOVANI, E.; GALVÃO, M. A. M.; LANGONI, H.; MAFRA, C. Evidence of *Borrelia* in wild and domestic mammals from the state of Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 287-290, 2014. doi: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014040>

MURARO, L. S.; NOGUEIRA, M. F.; BORGES, A. M. C. M.; SOUZA, A. O.; VIEIRA, T. S. W. J.; AGUIAR, D. M. Detection of *Ehrlichia* sp. in *Amblyomma sculptum* parasitizing horses from Brazilian Pantanal wetland. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 12, n. 3, p. 101658, 2021. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101658> (a)

MURARO, L. S.; SOUZA, A. O.; LEITE, T. N. S.; CÂNDIDO, S. L.; MELO, A. L. T.; TOMA, H. S.; CARVALHO, M. B.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; CABEZAS-CRUZ, A.; AGUIAR, D. M. First evidence of *Ehrlichia minasensis* infection in horses from Brazil. **Pathogens**, v. 10, n. 3, p. 265, 2021. doi: <https://doi.org/10.3390/pathogens10030265> (b)

NASCIMENTO, D. A. G.; VIEIRA, R. F. C.; VIEIRA, T. S. W. J.; TOLEDO, R. S.; TAMEKUNI, K.; SANTOS, N. J. R.; GONÇALVES, D. D.; VIEIRA, M. L.; BIONDO, A. W.; VIDOTTO, O. Serosurvey of *Borrelia* in dogs, horses, and humans exposed to ticks in a rural settlement of southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 4, p.418-422, 2016. doi: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612016085>

NOGUEIRA, R. M. S.; SILVA, A. B.; SATO, T. P.; SÁ, J. C.; SANTOS, A. C. G.; AMORIM FILHO, E. F.; VALE, T. L.; GAZÊTA, G. 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. doi: 10.1590/s0100-736x2017001200010

OLADOSU, L. A.; OLUFEMI, B. E. Haematology of experimental babesiosis and ehrlichiosis in steroid immunosuppressed horses. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 39, p. 345-352, 1992. doi: 10.1111/j.1439-0450.1992.tb01179.x.

OLIVEIRA, F. C. R.; ROLIM, M. F.; GALLO, S. S. M.; QUIRINO, C. R.; EDERLI, N. B. Equine granulocytic anaplasmosis, a neglected disease: risk factors associated with prevalence of antibodies in equines. **The Open Microbiology Journal**, v. 14, n. 1, 2020. doi: 10.2174/1874285802014010218

OLIVEIRA, R. R. G. C. **Determinação molecular de *Anaplasma phagocytophilum* e *Neorickettsia risticii* e alterações hematológicas e bioquímicas em equinos de áreas rurais e urbanas no Município de Angra dos Reis, Rio de Janeiro**. 2012. 63f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária - Clínica e Reprodução Animal) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2012.

ORSINI, J. A.; DIVERS, T. J. Reference values. In: ORSINI, J. A.; DIVERS, T. J. **Equine Emergencies: Treatment and Procedures**. 4th ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2014. Appendix 1. p. 798- 803.

OVERMANN, J. Red Blood Cells. In: PUSTERLA, N.; HIGGINS, J. **Interpretation of equine laboratory diagnostics**. 1st ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2018. cap. 16. p. 113-118.

ÖZDEK, U.; OĞUZ, B.; KÖMÜROĞLU, A. U.; DEĞER, Y. Determination of the levels of serum oxidative indicator, cytokine and some biochemical parameters in horses naturally infected with *Theileria equi*. **Veterinary Journal of Ankara University**, v. 67, n. 3, p. 257-263, 2020. doi: 10.33988/ auvfd.603305

PARRA, A. C. **Investigação diagnóstica de doença concomitante babesiose e anaplasrose em rebanho equino, por técnicas de Nested PCR ec-ELISA ou ELISA indireto**. 2009. 78f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

PASOLINI, M. P.; PAGANO, T. B.; COSTAGLIOLA, A.; BIASE, D.; LAMAGNA, B.; AULETTA, L.; FATONE, G.; GRECO, M.; COLUCCIA, P.; VENEZIANO, V.; PIROZZI, C.; RASO, G. M.; SANTORO, P.; MANNA, G.; PAPPARELLA, S.; PACIELLO, O. Inflammatory myopathy in horses with chronic piroplasmosis. **Veterinary pathology**, v. 55, n. 1, p. 133-143, 2018. doi: 10.1177/0300985817716262

PECKLE, M.; PIRES, M. S.; SANTOS, T. M.; ROIER, E. C. R.; SILVA, C. B.; VILELA, J. A. R.; SANTOS, H. A.; MASSARD, C. L. Molecular epidemiology of *Theileria equi* in horses and their association with possible tick vectors in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitology research**, v. 112, n. 5, p. 2017-2025, 2013. doi: 10.1007/s00436-013-3360-0

PRADO, L. G. **Avaliação clínica e laboratorial de equídeos sororreagentes para *Anaplasma phagocytophilum* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) em Minas Gerais, Brasil**. 2014. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

PRADO, L. G.; PALHARES, M. S.; BASTOS, C. V.; SILVEIRA, J. A. G.; RIBEIRO, A. A. R.; MIRANDA, A. L. S.; BEZERRA, V. M.; RIBEIRO, M. F. B. *Anaplasma phagocytophilum* direct detection and exposure evidence in equines from two breeding farms from Minas Gerais state, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, p. 1-6, 2018. doi: 10.1590/1808-1657000902017

PRADO, L. G.; PALHARES, M. S.; MIRANDA, A. L. S. Acompanhamento clínico e laboratorial de equinos naturalmente infectados por *Anaplasma phagocytophilum*. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 11, n. 3, p. 318-321, 2017. doi: <http://dx.doi.org/10.5935/1981-2965.20170031>

PUSTERLA, N.; CHAE, J. S.; KIMSEY, R. B.; BERGER PUSTERLA, J.; DEROCK, E.; DUMBLER, J. S.; MADIGAN, J. E. Transmission of *Anaplasma phagocytophila* (human granulocytic ehrlichiosis agent) in horses using experimentally infected ticks (*Ixodes scapularis*). **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 49, n. 10, p. 484-488, 2002. doi: [10.1046/j.1439-0450.2002.00598.x](https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2002.00598.x)

PUSTERLA, N.; LEUTENEGGER, C. M.; CHAE, J. S.; LUTZ, H.; KIMSEY, R. B.; DUMBLER, S.; MADIGAN, J. E. Quantitative evaluation of ehrlichial burden in horses after experimental transmission of human granulocytic *Ehrlichia* agent by intravenous inoculation with infected leukocytes and by infected ticks. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 12, p. 4042-4044, 1999. doi: <https://doi.org/10.1128/JCM.37.12.4042-4044.1999>

RAMOS, I. A. S.; MELLO, V. V. C.; MENDES, N. S.; ZANATTO, D. C. S.; CAMPOS, J. B. V.; ALVES, J. V. A.; MACEDO, G. C.; HERRERA, H. M.; LABRUNA, M. B.; PEREIRA, G. T.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Serological occurrence for tick-borne agents in beef cattle in the Brazilian Pantanal. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, 2020. doi: <http://doi.org/10.1590/S1984-29612020007>

REJMANEK, D.; BRADBURD, G.; FOLEY, J. Molecular characterization reveals distinct genospecies of *Anaplasma phagocytophilum* from diverse North American hosts. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. pt 2, p. 204, 2012. doi: [10.1099/jmm.0.034702-0](https://doi.org/10.1099/jmm.0.034702-0)

REJMANEK, D.; FREYCON, P.; BRADBURD, G.; DINSTELL, J.; FOLEY, J. Unique strains of *Anaplasma phagocytophilum* segregate among diverse questing and non-questing *Ixodes* tick species in the western United States. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 4, n. 6, p. 482-487, 2013. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.06.003>

RESTIFO, M. M.; BEDENICE, D.; THANE, K. E.; MAZAN, M. R. Cavitory effusion associated with *Anaplasma phagocytophilum* infection in 2 equids. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 2, p. 732, 2015. doi: [10.1111/jvim.12552](https://doi.org/10.1111/jvim.12552)

REUBEL, G. H.; KIMSEY, R. B.; BARLOUGH, J. E.; MADIGAN, J. E. Experimental transmission of *Ehrlichia equi* to horses through naturally infected ticks (*Ixodes pacificus*) from northern California. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 7, p. 2131-2134, 1998. doi: [10.1128/JCM.36.7.2131-2134.1998](https://doi.org/10.1128/JCM.36.7.2131-2134.1998)

RHALEM, A.; SAHIBI, H.; LASRI, S.; JOHNSON, W. C.; KAPPEMEYER, L. S.; HAMIDOUCHE, A.; KNOWLES, D. P.; GOFF, W. L. Validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosing *Babesia equi* infections of Moroccan origin and its use in determining the seroprevalence of *B. equi* in Morocco. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, p. 249-251, 2001. doi: [10.1177/104063870101300311](https://doi.org/10.1177/104063870101300311)

RIKIHISA, Y. *Anaplasma phagocytophilum* another *Ehrlichia chaffeensis*: subversive host cell manipulators. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 328-339, 2010. doi: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2318>

RIKIHISA, Y. Mechanisms of obligatory intracellular infection with *Anaplasma phagocytophilum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 3, p. 469-489, 2011. doi: <https://doi.org/10.1128/CMR.00064-10>

RISSO, A.; CAMPOS, G.; GARCIA, H.; ZERPA, H. Insights into equine piroplasmosis in Venezuelan sport horses: Molecular diagnosis, clinical, and cardiovascular findings. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 27, p. 100666, 2022. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2021.100666>

ROLIM, M. F.; OLIVEIRA, F. C. R.; GRAÇA, F. A. S.; BRASIL, F. C. 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. doi:10.1590/1089-6891v16i319865

SALEEM, S.; IJAZ, M.; FAROOQI, S. H.; GHAFAR, A.; ALI, A.; IQBAL, K.; MEHMOOD, K.; ZHANG, H. Equine granulocytic anaplasmosis 28 years later. **Microbial pathogenesis**, v. 119, p. 1–8, 2018. (a)

SALEEM, S.; IJAZ, M.; FAROOQI, S. H.; RASHID, M. I.; KHAN, A.; MASUD, A.; AQIB, HUSSAIN, A. I.; K.; MEHMOOD, K.; ZHANG, H. First molecular evidence of equine granulocytic anaplasmosis in Pakistan. **Acta Tropica**, v. 180, p. 18–25, 2018. doi: [10.1016/j.actatropica.2017.12.032](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.12.032) (b)

SALVAGNI, C. A.; DAGNONE, A. S.; GOMES, T. S.; MOTA, J. S.; ANDRADE, G. M.; BALDANI, C. D.; MACHADO, R. Z. Serologic evidence of equine granulocytic anaplasmosis in horses from central West Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 3, p. 135-140, 2010. doi: [10.1590/S1984-29612010000300002](https://doi.org/10.1590/S1984-29612010000300002)

SANT, C.; D'ABADIE, R.; PARGASS, I.; BASU, A. K.; ASGARALI, Z.; CHARLES, R. A.; GEORGES, K. C. Prospective study investigating transplacental transmission of equine piroplasmosis in thoroughbred foals in Trinidad. **Veterinary Parasitology**, v. 226, p. 132-137, 2016. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.07.008>

SANTOS, H. A.; THOMÉ, S. M. G.; SILVA, C. B.; PEIXOTO, M. P.; PIRES, M. S.; VITARI, G. L. V.; COSTA, R. L.; SANTOS, T. M.; ANGELO, I. C.; SANTOS, L. A.; FACCINI, J. L. H.; MASSARD, C. L. 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. 1-10, 2013. doi:10.1186/1756-3305-6-348

SANTOS, T. M. **Agentes da theileriose e da anaplasnose granulocítica em equídeos de microrregiões do estado do Rio de Janeiro**. 2011. 103f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2011.

SANTOS, T. M.; ROIER, E. C. R.; PIRES, M. S.; SANTOS, H. A.; VILELA, J. A. R.; PECKLE, M.; PAULINO, P. G.; BALDANI, C. D.; MASSARD, C. L. Molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Theileria equi* coinfection in horses from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary and Animal Science**, v. 7, p. 100055, 2019. doi: [10.1016/j.vas.2019.100055](https://doi.org/10.1016/j.vas.2019.100055)

SCHARF, W.; SCHAUER, S.; FREYBURGER, F.; PETROVEC, M.; SCHAARSCHMIDT-KIENER, D.; LIEBISCH, G.; RUNGE, M.; GANTER, M.; KEHL, A.; DUMLER, J. S.; GARCIA-PEREZ, A. L.; JENSEN, J.; FINGERLE, V.; MELI, M. L.; ENSSER, A.; STUEN, S.; VON LOEWENICH D. F. Distinct host species correlate with *Anaplasma phagocytophilum ankA* gene clusters. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 790-796, 2011. doi: <https://doi.org/10.1128/JCM.02051-10>

SCOLES, G. A.; HUTCHESON, H. J.; SCHLATER, J.L.; HENNAGER, S.G.; PELZEL, A.M.; KNOWLES, D.P. Equine piroplasmosis associated with *Amblyomma cajennense* Ticks, Texas, USA. **Emerg Infect Dis**, v. 17, n. 10, p. 1903-1905, 2011. doi: 10.3201/eid1710.101182

SCOLES, G. A.; UETI, M. W. Vector Ecology of Equine Piroplasmosis. **Annual Review of Entomology**, v. 60, p. 561-580, 2015. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-021110>

SEARS, K. P.; KAPPMAYER, L. S.; WISE, L. N.; SILVA, M.; UETI, M. W.; WHITE, S.; REIF, K. E.; KNOWLES, D. P. Infection dynamics of *Theileria equi* and *Theileria haneyi*, a newly discovered apicomplexan of the horse. **Veterinary parasitology**, v. 271, p. 68-75, 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.06.009>

SEARS, K. P.; KNOWLES, D. P.; DINKEL, K.; MSHELIA, P. W.; ONZERE, C.; SILVA, M.; FRY, L. M. Imidocarb dipropionate lacks efficacy against *Theileria haneyi* and fails to consistently clear *Theileria equi* in horses co-infected with *T. haneyi*. **Pathogens**, v. 9, n. 12, p. 1035, 2020. doi: <https://doi.org/10.3390/pathogens9121035>

SEARS, K. P.; KNOWLES, D. P.; FRY, L. M. Clinical progression of *Theileria haneyi* in splenectomized horses reveals decreased virulence compared to *Theileria equi*. **Pathogens**, v. 11, n. 2, p. 254, 2022. doi: <https://doi.org/10.3390/pathogens11020254>

SEO, M. G.; KWON, O. D.; KWAK, D. *Anaplasma bovis* infection in a horse: First clinical report and molecular analysis. **Veterinary microbiology**, v. 233, p. 47-51, 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.04.024>

SILAGHI, C.; SANTOS, A. S.; GOMES, J.; CHRISTOVA, I.; MATEI, J. A.; WALDER, G.; DOMINGOS, A.; BELL-SAKYI, L.; SPRONG, H.; VON LOEWENICH, F. D.; OTEO, J. A.; DE LA FUENTE, J.; DUMLER, J. S. Guidelines for direct detection of *Anaplasma* sp. in diagnostic and epidemiological studies. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 17, n. 1, p. 12-22, 2017. doi: <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.1960>

SILVA, N. V. **Anaplasmosse granulocítica equina - relato de caso**. 2018. 28 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

SISKA, W. D.; TUTTLE, R. E.; MESSICK, J. B.; BISBY, T. M.; TOTH, B.; KRITCHEVSKY, J. E. 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. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.10.003>

SLIVINSKA, K.; VÍCHOVÁ, B.; WERSZKO, J.; SZEWCZYK, T.; WRÓBLEWSKI, Z.; PEŤKO, B.; RAGAČ, O.; DEMESHKANTE, V.; KARBOWIAK, G. Molecular surveillance

of *Theileria equi* and *Anaplasma phagocytophilum* infections in horses from Ukraine, Poland and Slovakia. **Veterinary parasitology**, v. 215, p. 35-37, 2015. doi: 10.1016/j.vetpar.2015.10.025

SOCOLOSKI, S. N. G.; CASTRO, B. G.; CORDEIRO, M. D.; FONSECA, A. H.; CEPEDA, M. B.; NICOLINO, R. R.; LOPES, L. B. Epidemiological investigation of *Borrelia burgdorferi* in horses in the municipality of Sinop—MT, Brazil. **Trop Anim Health Prod**, v. 50, p. 831-836, 2018. doi: <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1504-4>

SOUSA, S. H.; PALUDO, G. R.; FRESCHI, C. R.; MACHADO, R. Z.; CASTRO, M. B. *Theileria equi* infection causing abortion in a mare in Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 8, p. 113-116, 2017. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.03.008>

STEPHENSON, N.; HODZIC, E.; MAPES, S.; REJMANEK, D.; FOLEY, J. A real-time PCR assay for differentiating pathogenic *Anaplasma phagocytophilum* from an apathogenic, woodrat-adapted genospecies from North America. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 6, p. 774-778, 2015. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.07.003>

STUEN, S.; GRANQUIST, E. G.; SILAGHI, C. *Anaplasma phagocytophilum* – a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, n. 31, p. 1-33, 2013. doi: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00031>

TAKEET, M.; ADELEYE, A.; ADEBAYO, O. Haematology and serum biochemical alteration in stress induced equine theileriosis. **Science World Journal**. v. 4, n. 2, p. 19-21, 2009. doi: 10.4314/swj.v4i2.51840

TIROSH-LEVY, S.; GOTTLIEB, Y.; FRY, L. M.; KNOWLES, D. P.; STEINMAN, R. Twenty years of research in equine piroplasmiasis: global distribution, molecular diagnostics and phylogeny. **Pathogens**, v. 9, n. 11, p. 926, 2020. doi: <https://doi.org/10.3390/pathogens9110926> (a)

TIROSH-LEVY, S.; GOTTLIEB, Y.; MIMOUN, L.; MAZUZ, M. L.; STEINHOMEM, A. Transplacental transmission of *Theileria equi* is not a common cause of miscarriages and infection of foals in Israel. **Animals**, v. 10, n. 2, p. 341, 2020. doi: <https://doi.org/10.3390/ani10020341> (b)

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 - La Revue Veterinaire Canadienne**, v. 52, n. 5, p. 537-540, 2011.

UETI, M. W.; PALMER, G. H.; KAPPEMEYER, L. S.; STATDFIELD, M.; SCOLES, G. A.; KNOWLES, D. P. Ability of the vector tick *Boophilus microplus* to acquire and transmit *Babesia equi* following feeding on chronically infected horses with low-level parasitemia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 3755-3759, 2005.

VALENTE, J. D.; MONGRUEL, A. C. B.; MACHADO, C. A. L.; CHIYO, L.; LEANDRO, A. S.; BRITTO, A. S.; MARTINS, T. F.; BARROS-FILHO, I. R.; BIONDO, A. W.; PEROTTA, J. H.; CAMPOS, A. N. S.; VIDOTTO, O.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M.; VIEIRA, T. S.W.J.; VIEIRA, R. F. C. Tick-borne pathogens in carthorses from Foz do Iguaçu

City, Paraná State, southern Brazil: A tri-border area of Brazil, Paraguay and Argentina. **Veterinary parasitology**, v. 273, p. 71-79, 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.08.008>

VIEIRA, M. I. B.; COSTA, M. M.; OLIVEIRA, M. T.; GONÇALVES, L. R.; ANDRÉ, M. R.; MACHADO, R. Z. Serological detection and molecular characterization of piroplasmids in equids in Brazil. **Acta tropica**, v. 179, p. 81-87, 2018. doi:10.1016/j.actatropica.2017.12.028

VON LOEWENICH, F. D.; STUMPF, G.; BAUMGARTEN, B. U.; RÖLLINGHOFF, M.; DUMLER, J. S.; BOGDAN, C. A case of equine granulocytic ehrlichiosis provides molecular evidence for the presence of pathogenic *Anaplasma phagocytophilum* (HGE agent) in Germany. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 22, n. 5, p. 303-305, 2003. doi:10.1007/s10096-003-0935-1

WALTON, R. M. Equine Hematology. In: WALTON, R. M. **Equine clinical pathology**. 1st ed. Ames: John Wiley & Sons, 2013. cap 2. p. 15-35.

WISE, L. N.; KAPPEMEYER, L. S.; MEALEY, R. H.; KNOWLES, D. P. Review of equine piroplasmosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, n. 6, p. 1334-1346, 2013. doi: <https://doi.org/10.1111/jvim.12168>

WISE, L. N.; KNOWLES, D. P.; ROTHSCHILD C. M. Piroplasmosis. In: SELTON, D. C.; LONG, M. T. **Equine Infectious Diseases**. 2nd ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2014. cap. 56. p. 467-475.

ZAEEMI, M.; RAZMI, G. R.; MOHAMMADI, G. R. Evaluation of serum biochemical profile in Turkoman horses and donkeys infected with *Theileria equi*. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 167, n. 11-12, p. 301-309, 2016.

ZOBBA, R.; ARDU, M.; NICCOLINI, S.; CHESSA, B.; MANNA, L.; COCCO, R.; PAPPAGLIA, M. L. P. Clinical and laboratory findings in equine piroplasmosis. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, n. 5, p. 301-308, 2008. doi:10.1016/j.jevs.2008.03.005

## **ANEXOS**

Anexo A: Certificado CEUA/IV – UFRRJ

Anexo B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – CEUA/IV – UFRRJ

Anexo C: Certificado CEUA/IZ – UFRRJ

Anexo D: Resultado dos hemogramas e qPCR dos animais incluídos no estudo

## Anexo A - Certificado CEUA/IV – UFRRJ



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Importância do Anaplasma phagocytophilum com agente etiológico em equinos com suspeita clínica de piroplasmose no estado do Rio de Janeiro - Brasil.", protocolada sob o CEUA nº 9418171121 (ID 002161), sob a responsabilidade de **Paulo de Tarso Landgraf Botteon e equipe; CELINA VIEIRA DE ALBUQUERQUE; Mylena da Silva Andrade; Huarrisson Azevedo Santos; Cristiane Baldani** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) na reunião de 31/01/2022.

We certify that the proposal "Importance of Anaplasma phagocytophilum with an etiological agent in horses with clinical suspicion of piroplasmosis in the state of Rio de Janeiro - Brazil.", utilizing 45 Equines (males and females), protocol number CEUA 9418171121 (ID 002161), under the responsibility of **Paulo de Tarso Landgraf Botteon and team; CELINA VIEIRA DE ALBUQUERQUE; Mylena da Silva Andrade; Huarrisson Azevedo Santos; Cristiane Baldani** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Veterinary Institute of Rural Federal University of Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) in the meeting of 01/31/2022.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **02/2022** a **07/2023**

Área: **Medicina E Cirurgia Veterinária**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Equídeos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

Idade: **1 a 30 anos**

N: **45**

Linhagem: **SRD**

Peso: **100 a 500 kg**

Local do experimento: As coletas de amostras serão realizadas nas propriedades onde se encontram os animais. Não haverá deslocamento ou transporte destes animais. As amostras serão processadas e armazenadas no Lab de Pesquisas Clínicas de Grandes Animais, DMCV - IV - UFRRJ. As análises moleculares serão realizadas no Lab. de Laboratório de Sanidade Avícola e Multiuso do DESP, com a colaboração do professor Dr. Huarrisson Azevedo Santos. Análises hematológicas e Bioquímicas serão realizadas no Lab de Patologia Clínica (DMCV-IV), com a colaboração do professora Dra. Cristiane Divan Baldani.

Seropédica, 14 de abril de 2022

Prof. Dr. Fabio Barbour Scott  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Viviane de Souza Magalhães  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

## Anexo B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – CEUA/IV – UFRRJ



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**(Importância do *Anaplasma phagocytophilum* com agente etiológico em equinos com suspeita clínica de piroplasmose no estado do Rio de Janeiro - Brasil.)**

Razão Social / CEUA: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – CEUA IV CIAEP: 02.0081.2019

Equipe Executora

Nome	Telefone	E-mail	Função
CELINA VIEIRA DE ALBUQUERQUE	31 9867-1917	<a href="mailto:celina1408@hotmail.com">celina1408@hotmail.com</a>	Executora
PAULO DE TARSO LANDGRAF BOTTEON	24 988234252	<a href="mailto:paulobotteon@gmail.com">paulobotteon@gmail.com</a> <a href="mailto:pbotteon@ufrj.br">pbotteon@ufrj.br</a>	Coordenador
MYLENA DA SILVA ANDRADE	33 8414-4957	<a href="mailto:mvyenaandrade1997@hotmail.com">mvyenaandrade1997@hotmail.com</a>	Colaboradora

Prezado Sr. (Sra.), O senhor está sendo convidado(a) a autorizar a participação de seu animal em um projeto de pesquisa, que tem como finalidade avaliar a importância dos hemoparasitos *Anaplasma phagocytophilum*, *Theileria equi* e *Babesia caballi*, como agentes etiológicos em equinos com manifestações clínicas suspeitas de piroplasmose. Este convite se dá pois seu animal apresenta manifestações clínicas que o qualificam nos critérios de inclusão do projeto de pesquisa. Nestes critérios serão incluídos animais que apresentem ao menos três dos sinais clínicos: piroxia ( $T^{\circ}C > 38,5$ ), icterícia, mucosas pálidas, letargia, anorexia, edema de membros, queda de desempenho, emagrecimento.

Com sua autorização serão colhidas amostras de sangue da veia jugular, através das quais serão realizados exames hematológicos e bioquímicos e testes PCR para diagnóstico dos agentes etiológicos descritos acima. O procedimento não trará qualquer risco para o animal. Esta autorização restringe-se a uma única coleta.

A piroplasmose equina é amplamente difundida no estado do Rio de Janeiro, sendo reconhecida como a principal doença parasitária de equinos. Recentemente, AGE passou a ser considerada como diagnóstico diferencial de enfermidade febris em cavalos, em virtude dos estudos epidemiológicos que apontam para a presença do agente etiológico em nosso meio. Isto traz insegurança no tratamento das enfermidades febris, uma vez que o diagnóstico na maioria dos casos é presuntivo. Esperamos com este trabalho definir a importância destes agentes como causadores de doenças clínicas e prejuízos econômicos no Estado do Rio de Janeiro, fornecendo evidências mais consistentes para a tomada de decisão clínica pela terapêutica mais apropriada ao tratamento.



Todos os procedimentos seguem os princípios éticos no uso de animais elaborados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Veterinária da UFRRJ sob o CEUA Nº \_\_\_\_\_.

Sua autorização para a inclusão do(s) seu(s) animal(is) nesse estudo é voluntária. Seu(s) animal(is) poderá(ão) ser retirado(s) do estudo, a qualquer momento, sem que isso cause qualquer prejuízo a ele(s).

A confidencialidade dos seus dados pessoais será preservada. Os membros da CEUA ou as autoridades regulatórias poderão solicitar suas informações, e nesse caso, elas serão dirigidas especificamente para fins de inspeções regulares.

O Médico Veterinário responsável pelo(s) seu(s) animal(is) será a Médica Veterinária Celina Vieira de Albuquerque, inscrita no CRMV-RJ sob o nº 15362. Além dela, a equipe do Pesquisador Principal Paulo de Tarso Landgraf Botteon também se responsabilizará pelo bem-estar do(s) seu(s) animal(is) durante todo o estudo e ao final dele.

Quando for necessário, durante ou após o período do estudo, você poderá entrar em contato com o Pesquisador Principal ou com a sua equipe pelos contatos descritos no início deste documento.

#### Declaração de consentimento

Fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao(s) animal(is) pelo(s) qual(is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu(s) animal(is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do(s) meu(s) animal(is) identificado(s), a seguir, neste projeto.

Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará comigo e outra com o pesquisador.

(local), \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Assinatura do Responsável

Assinatura do Pesquisador

Responsável: Nome: \_\_\_\_\_ Doc. de Ident: \_\_\_\_\_

#### Identificação dos animais

Nome ou número \_\_\_\_\_ Espécie Equina; Raça \_\_\_\_\_ Idade \_\_\_\_\_

Nome ou número \_\_\_\_\_ Espécie Equina; Raça \_\_\_\_\_ Idade \_\_\_\_\_

Nome ou número \_\_\_\_\_ Espécie Equina; Raça \_\_\_\_\_ Idade \_\_\_\_\_

## Anexo C - Certificado CEUA/IZ – UFRRJ



INSTITUTO DE ZOOTECNIA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA-IZ/UFRRJ

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta de pesquisa intitulada “Importância de *Anaplasma phagocytophilum* Como Agente Etiológico Envolvido em Equinos com Suspeita Clínicas de Piroplasmose no Estado do Rio de Janeiro – Brasil.” – processo nº 0157-05-2022 – coordenada pelo Prof. Dr. Paulo de Tarso Landgraf Botteon e equipe; que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/IZ/UFRRJ) na LV Reunião em plenária virtual de 28/07/2022.

Finalidade da Proposta: ensino

Vigência da Proposta: julho de 2024

Área: Ciências Agrárias; Medicina Veterinária; Clínica e Cirurgia Animal

Origem: Setor de Equideocultura da UFRRJ.

Espécies (quantidade): Equídeos (45 animais)

**Resumo:** A Piroplasmose Equina (PE) e Anaplasmoses Granulocítica Equina (AGE) são importantes enfermidades transmitidas por carrapatos, acometendo equinos em várias regiões do mundo, principalmente naquelas de clima subtropical e tropical, onde os vetores são endêmicos. São causadas pelos protozoários Intraeritrocitários obrigatórios *Babesia caballi* e *Theileria equi* e pela bactéria Gram negativa intracelular obrigatória *Anaplasma phagocytophilum*, respectivamente. Ambas podem se manifestar como condições subclínicas ou agudas com sintomatologia inespecífica, provocando doença febril, o que dificulta a sua diferenciação clínica e o estabelecimento de um diagnóstico preciso. As abordagens terapêuticas das duas condições são distintas, tomando de extrema importância o correto diagnóstico. Para isso, técnicas moleculares são utilizadas para a identificação dos agentes, de maneira precisa e precoce. No entanto, estudos no Brasil que identifiquem *A. phagocytophilum* em equinos com sinais clínicos ainda são poucos, o que coloca em dúvida a real importância do agente como causador de doença clínica em cavalos no país. O objetivo do presente trabalho será avaliar a importância dos hemoparasitos *Anaplasma phagocytophilum* e *Theileria equi*, como agentes etiológicos em equinos com manifestações clínicas suspeitas de piroplasmose. Os exames serão executados em cavalos que venham a apresentar naturalmente sinais clínicos relacionados ao quadro de Piroplasmose equina. Uma vez identificado o caso com potencial para inclusão no estudo, um membro da equipe se deslocará até o local onde o animal está mantido para obtenção da autorização do proprietário e assinatura do TCLE e procederá o exame clínico. Serão incluídos animais que apresentem ao menos três dos sinais clínicos: piroxia ( $T^{\circ}C = 38,5$ ), icterícia, mucosas pálidas, letargia, anorexia, emagrecimento, edema de membros, queda de desempenho. Como critério de exclusão, animais indômitos, bravos ou que não permitam a manipulação serão excluídos do estudo. Após exame clínico, serão colhidas amostras de sangue jugular em dois tubos estéreis (com e sem EDTA) para hematologia e bioquímica e uma amostra em tubo c/EDTA para PCR e enviadas em gelo para o Laboratório. Piroplasmose equina (PE) é uma das doenças transmitidas por carrapatos com impacto econômico mundial. Causada pelos hemoprotozoários *Theileria equi* e *Babesia caballi*, com ampla circulação no Brasil (FERREIRA et al., 2016; PECKLE et al., 2013; VIEIRA et al., 2013) e particularmente no Rio de Janeiro Peckle et al. (2013). Anaplasmoses Granulocítica Equina (AGE) causada por *Anaplasma phagocytophilum*, também é transmitida por carrapatos, apresentando importância veterinária e de saúde pública devido à sua natureza zoonótica (SALEEM, et al. 2018). Ambas podem se manifestar com sintomatologia inespecífica, provocando doença febril, o que dificulta um diagnóstico clínico (BASHIRUDDIN, CAMMA & REBÊLO, 1999). Estudos sorológicos realizados no Brasil verificaram *A. phagocytophilum* nos estados de São Paulo (SALVAGNI et al., 2010) e Rio de Janeiro (ROLIM, OLIVEIRA, & BRASIL, 2015). Afetando cães Santos et al. (2013), cavalos Prado et al. (2018) e Santos et al. (2019) nos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro, respectivamente. Contudo, nestes estudos, não foram observados animais com manifestações clínicas da AGE. Com os relatos sobre a presença do *A. phagocytophilum* infectando cavalos em várias regiões do Brasil (ROLIM et al. 2015; NOGUEIRA et al. 2017; PRADO et al. 2017; PRADO et al. 2018; SANTOS et al. 2019), a doença passou a ser considerada nos diagnósticos de enfermidades febris inespecíficas suspeitas de piroplasmose. A conduta para a AGE difere da PE, sendo a Oxitetraciclina o antibiótico indicado no para a AGE e para a PE o principal produto mais utilizado é o Imidocarb. O emprego de um ou outro produto não é trivial, visto os efeitos colaterais induzidos por cada fármaco.\*

Seropédica, 28 de julho de 2022

*Rodrigo Vasconcelos de Oliveira*

Prof. Dr. Rodrigo Vasconcelos de Oliveira  
Coordenador da CEUA/IZ/UFRRJ

### Anexo D - Resultado dos hemogramas e qPCR dos animais incluídos no estudo

Nº	VG	Hb	Hm	VCM	HCM	CHCM	Ptn	Fbg	Hmpt	qPCR
1	31	9,91	6,25	49,6	-	31,9	8,8	0,4	-	CP
2	26,9	9,1	5,46	49,3	16,7	33,8	8	0,2	-	TE
3	29,8	10	6,5	45	-	33,6	8,4	-	-	BC
4	27,7	8,2	5,7	48	-	29,4	8	-	-	TE
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	TE
6	25	8,3	5	50	16,6	33,2	8,2	0,4	-	TE
7	29,1	9,3	6,66	43,7	14	32	7,6	0,6	-	CP
8	28,5	9,6	6,25	45,6	15,4	33,7	7,8	0,4	-	O
9	23	7,6	6,79	33,9	11,2	33	7	0,8	P	BC
10	48,8	16,7	10,32	47,3	16,2	34,2	8	0,2	-	O
11	37,3	12,8	8,05	46,3	15,9	34,3	8	0,2	-	O
12	30,6	10,1	6,36	48,1	15,9	33	6	0,2	-	O
13	27,9	9,6	5,75	48,5	16,7	34,4	7,2	0,2	-	O
14	35,2	11,9	8,04	43,8	14,8	33,8	6,8	0,4	P	TE
15	34,4	10,9	7,22	47,6	15,1	31,7	7,8	0,2	-	O
16	33,3	11,1	7,02	47,4	15,8	33,3	8	0,2	-	TE
17	28	9,6	6,36	44,2	15,1	34,3	7,8	0,2	-	CP
18	32,3	11,2	7,58	42,6	14,8	34,7	6	0,2	-	BC
19	26,7	8,8	5,6	47,7	15,7	33	6,6	0,2	-	O
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	TE
21	36	11,9	7,35	48,98	-	33	7,2	0,2	-	TE
22	33	11,5	7	47,14	-	34,8	7,2	0,2	-	TE
23	25	8	5,1	49,02	-	32	7	0,2	-	TE
24	20,7	7	4,73	43,8	14,8	33,8	6,4	0,2	-	CP
25	23,6	7,5	6,21	38	12,1	31,8	6,2	0,4	-	TE
26	38	11,9	10,33	36,8	13	31,3	6,6	0,4	-	BC
27	26,6	9	7,28	36,5	12,4	33,8	7	0,4	-	CP
28	27,5	9	7,07	38,9	12,7	32,7	6,2	0,4	-	CP
29	24,3	7,8	6,12	39,7	12,7	32,1	5,2	0,4	-	CP
30	28	9,3	5,6	50	16,7	33,3	7,4	-	-	BC
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	O
32	30	10	6	50	16,7	33,3	6	-	-	O
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	TE
34	34	11,3	6,8	50	16,7	33,3	7	-	-	O
35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	O
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	O
37	29,4	9,5	6,78	43,4	14	32,3	6,2	0,2	-	TE
38	39,2	13,1	7,91	49,6	16,6	33,4	8,8	0,4	-	TE
39	40,3	13,1	8,03	50,2	16,3	32,5	8,2	0,2	-	TE
40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	TE
41	27,6	9,8	5,9	46,1	-	35,5	3,07	0,2	-	O
42	28,5	8,8	5,6	50,9	15,7	30,9	8,2	0,4	-	O
43	35	11,6	7,12	49,2	16,3	33,1	7	0,6	-	O
44	35,3	11,6	7,41	47,6	15,7	32,9	6,4	0,4	-	O
45	39	14,9	7,8	50	15	38	6,6	0,2	-	O

VG: hematócrito; Hb: hemoglobina; Hm: hemácias; Ptn: proteínas; Fbg: fibrinogênio; Hmpt: hemopatógenos; P: Piropasmida; BC: *B. caballii*; TE: *T. equi*; CP: coinfeção piropasmida; O: outras causas; -: informação não fornecida.

Nº	Lct	Bast	Seg	Linf	Mon	Eos	Bas	Plq	qPCR
1	7000	0	5670	1190	70	70	0	158000	CP
2	8700	0	1479	3525	696	0	0	111000	TE
3	11100	111	7437	3441	111	0	0	151000	BC
4	5600	0	3920	1624	56	0	0	144000	TE
5	-	-	-	-	-	-	-	-	TE
6	6900	0	3105	3036	207	552	0	120000	TE
7	5300	0	1113	4028	53	106	0	390000	CP
8	9400	0	4700	3854	188	564	94	207000	O
9	5200	0	1820	3068	208	104	0	57000	BC
10	8600	0	6364	1204	946	86	0	95000	O
11	8200	0	5084	2460	574	82	0	144000	O
12	7400	0	5032	1850	444	74	0	135000	O
13	3900	0	1482	2067	39	273	39	270000	O
14	7400	0	3034	3626	148	592	0	185000	TE
15	8600	0	5074	2752	172	430	172	205000	O
16	11900	0	8806	2142	119	476	357	407000	TE
17	7600	0	3724	3344	228	304	0	303000	CP
18	6600	0	4818	1452	132	198	0	156000	BC
19	7000	0	4410	2030	140	350	70	204000	O
20	-	-	-	-	-	-	-	-	TE
21	9300	0	4743	3627	186	744	0	289000	TE
22	5300	0	3074	2014	53	159	0	259000	TE
23	8200	0	3444	3772	82	902	0	201000	TE
24	7700	0	3850	3388	385	77	0	272000	CP
25	5800	0	2030	3480	232	58	0	237000	TE
26	15000	0	10800	3000	1050	150	0	202000	BC
27	13100	0	4323	8122	393	262	0	213000	CP
28	9500	0	5415	3705	285	95	0	244000	CP
29	10000	0	5800	3500	600	100	0	210000	CP
30	7440	0	3422	3794	223	0	0	46000	BC
31	-	-	-	-	-	-	-	-	O
32	8370	0	5273	2762	167	167	0	51000	O
33	-	-	-	-	-	-	-	-	TE
34	5450	0	2889	1853	109	600	0	60000	O
35	-	-	-	-	-	-	-	-	O
36	-	-	-	-	-	-	-	-	O
37	6100	0	2745	2928	183	183	61	340000	TE
38	4400	0	1584	2464	308	44	0	152000	TE
39	7300	0	5256	1314	219	511	0	222000	TE
40	-	-	-	-	-	-	-	-	TE
41	16900	0	14365	2028	338	169	0	-	O
42	7000	0	4340	1050	280	1190	140	483000	O
43	13000	0	9100	3640	130	130	0	378000	O
44	8100	0	5994	1701	324	81	0	212000	O
45	8150	0	5134	1304	82	1630	0	131000	O

Lct: leucócitos; Bast: bastões; Seg: segmentados; Linf: linfócitos; Mon: monócitos; Eos: eosinófilos; Bas: basófilos; Plq: plaquetas; BC: *B. caballi*; TE: *T. equi*; CP: coinfeção piroplasmida; O: outras causas; -: informação não fornecida.