

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

TESE

Aspectos epidemiológicos de *Theileria equi* , *Babesia caballi* e *Borrelia spp.* em equinos de uso militar das regiões Sudeste e Sul do Brasil

Carlos Henrique Coelho de Campos

2015



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

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE *Theileria equi*, *Babesia caballi* E
Borrelia spp. EM EQUINOS DE USO MILITAR DAS REGIÕES SUDESTE E
SUL DO BRASIL**

CARLOS HENRIQUE COELHO DE CAMPOS

Sob a orientação do Professor
Carlos Luiz Massard

e Co-orientação do Professor
Cláudio Lísias Mafra de Siqueira

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

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2015

636.10896075

C198a

T

Campos, Carlos Henrique Coelho de, 1968-
Aspectos epidemiológicos de *Theileria equi*, *Babesia caballi* e *Borrelia spp.* em eqüinos de uso militar das regiões sudeste e sul do Brasil / Carlos Henrique Coelho de Campos - 2015.
108 f.: il.

Orientador: Carlos Luiz Massard.

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

Inclui bibliografias.

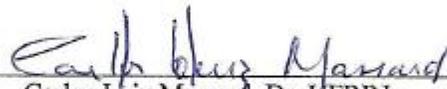
1. Eqüino - Doenças - Diagnóstico - Teses. 2. Febre recorrente - Teses. 3. Babésia - Teses. 4. Carrapato como transmissor de doenças - Teses. I. Massard, Carlos Luiz, 1947-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

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

CARLOS HENRIQUE COELHO DE CAMPOS

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

TESE APROVADA EM 25 / 02 / 2015



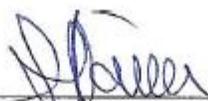
Carlos Luiz Massard, Dr. UFRRJ
(Orientador)



Jairo Dias Barreira, Dr. UNIRIO



José Dantas Ribeiro Filho, Dr. UFV



Adivaldo Henrique da Fonseca, Dr. UFRRJ



João Luiz Horácio Faccini, Dr. UFRRJ

DEDICATÓRIA

Aos meus pais José Maria e Solange.
Ao meu filho Henrique.

" A persistência é o caminho do êxito. "
Charles Darwin

AGRADECIMENTOS

Ao prezado Professor Carlos Luiz Massard por toda a orientação, ensinamentos, compreensão e compartilhamento de experiências, ao longo destes anos, possibilitando um enriquecimento cultural, ensinando pelo exemplo e demonstrando a necessidade do equilíbrio para a prática da docência e da pesquisa.

Ao prezado amigo Professor Cláudio Mafra pela co-orientação, amizade e disponibilidade incondicional, transformando a convivência em uma profícua parceria profissional baseada no respeito, na camaradagem, na ética e nas demonstrações de competência profissional. Meu eterno reconhecimento pelo auxílio inestimável nessa caminhada que durou alguns longos anos.

Ao amigo Professor José Dantas Ribeiro Filho pelo determinante auxílio no início dessa caminhada, fazendo valer a máxima que "uma longa caminhada inicia-se com o primeiro passo".

Ao Professor Aivaldo Henrique da Fonseca por disponibilizar toda a estrutura do Laboratório de Doenças Parasitárias, viabilizando a execução dos testes de ELISA e PCR.

Ao Professor João Luiz Horácio Faccini pelos ensinamentos e sugestões durante a sua participação na banca de defesa.

Ao Professor Jairo Dias Barreira pela disponibilidade e pelas sugestões apresentadas durante a sua participação na banca de defesa.

À Professora Cristiane Divan Baldani pela fundamental contribuição no processamento das amostras, disponibilizando a sua equipe e viabilizando os ensaios para o diagnóstico sorológico de *Theileria equi* e *Babesia caballi*.

À Professora Rosângela Zacarias Machado, do Departamento de Patologia Animal FCAV UNESP Jaboticabal, por ter gentilmente cedido o antígeno de *T. equi* e *B. caballi* contribuindo sobremaneira para a realização do ELISA, além de ter disponibilizado a sua equipe para a realização de alguns testes.

Ao Professor Carlos Wilson pelo auxílio no momento da publicação do artigo relativo a este trabalho de pesquisa e por sempre estar disposto a ajudar e a transmitir conhecimentos.

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (CPGCV) pelos conhecimentos, ensinamentos e experiências transmitidas.

Ao prezado amigo, companheiro, "fiel escudeiro", Capitão Veterinário Rubens Fabiano Soares Prado pela disposição constante, pela lealdade, pelas grandes demonstrações de amizade, confiança e disposição no cumprimento da missão de buscar constantemente o aperfeiçoamento profissional.

Ao Cabo Vanderson José da Silva por auxiliar na formatação dos textos e nos trabalhos de impressão.

À toda a equipe do Hospital Veterinário da Academia Militar das Agulhas Negras (AMAN) por servirem de suporte e motivação para todas as atividades realizadas nesta pesquisa.

Aos oficiais médicos veterinários do Comando Militar do Sul Capitão Rodrigues, Tenente Janaina e Tenente Lessana pelo apoio técnico quando foram solicitados e ao Tenente Coronel Vargas Diretor da Coudelaria do Rincão por autorizar a coleta de dados.

Ao Médico Veterinário Matheus Dias Cordeiro pela prontidão nos diversos favores solicitados, desde a demonstração e treinamento na técnica do ELISA até o processamento final das amostras no Laboratório de Doenças Parasitárias.

Às médicas veterinárias Andresa Guimarães e Aline Tonussi da Silva pelo empenho e salutar convívio durante a realização dos exames laboratoriais de ELISA.

Ao Dr. Marcus Sandes Pires pela disponibilidade constante e pelo apoio na realização de testes moleculares e das análises estatísticas.

A toda equipe do Laboratório de Hemoparasitoses da estação experimental W.O. Neitz, Maristela Peckle, Cláudia Bezerra da Silva, Gabriele Vivas Vitari, enfim, a todos os que sempre

estavam dispostos a ajudar.

Aos Médicos Veterinários Priscila, Gustavo e toda a equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias pelo apoio no processamento das amostras.

Agradeço à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e ao Instituto de Veterinária pela oportunidade que me foi concedida, através do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, viabilizando a realização dessa aproximação com a Academia que é fundamental para a busca da excelência no exercício da atividade profissional.

À Natália Monnerat de Souza que desde o meu retorno ao curso de Doutorado procurou incentivar, apoiar e auxiliar, estando presente até mesmo nas ausências.

A todos os meus familiares, que, independente da distância, sempre foram a base sólida e alicerce da minha formação moral e ética. Muito obrigado a todos!

RESUMO GERAL

CAMPOS, Carlos Henrique Coelho de. **Aspectos epidemiológicos de *Theileria equi*, *Babesia caballi* e *Borrelia spp.* em equinos de uso militar das regiões Sudeste e Sul do Brasil**, 2015. 108p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

Com o objetivo de avaliar os aspectos epidemiológicos da ocorrência de *Theileria equi*, *Babesia caballi* e *Borrelia spp.* em equinos mantidos em unidades militares no Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, foram coletadas amostras de sangue e carrapatos. Nas amostras do DNA extraídas do sangue dos equinos investigou-se, por PCR, a ocorrência de infecções por *T. equi* e *B. caballi*. Nas amostras de soro, verificou-se, por ELISA, a ocorrência de anticorpos anti *T. equi*, *B. caballi* e *Borrelia spp.* Foi verificada a ocorrência de *Amblyomma sculptum*, *Dermacentor nitens* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em diferentes níveis de infestação. Do total de amostras de soro analisadas, 82,07% (n=389/474) foram consideradas sororeativas para *T. equi*, sendo a maior prevalência observada nos equinos da Coudelaria do Rincão, Rio Grande do Sul (87,33%; n=262/300). Nos equinos mantidos na Academia Militar das Agulhas Negras, Rio de Janeiro, verificou-se uma soroprevalência de 72,99% (n=127/174). Por análise multivariada, observou-se que o fator origem dos equinos na Coudelaria do Rincão foi o fator associado mais influente para a soropositividade dos animais (p<0,05; OR=2,89; IC: 1,34 - 6,19), sendo o pastejo misto com bovinos associado com a presença da espécie *R. microplus* mais relacionado com a soropositividade dos equinos. Pela PCR, evidenciou-se a presença de DNA de *T. equi* em 49,37% (n= 234/474) das amostras de sangue testadas, confirmando estes animais como portadores assintomáticos. Em relação à sorologia de *B. caballi*, observou-se uma soroprevalência de 59,92% (n=284/474), sendo a frequência mais elevada nos animais da região Sudeste (72,99%; n=127/174) do que nos criados na região Sul (52,33%; n=157/300). Verificou-se que o fator permanência na região Sudeste foi o fator mais influente para a soropositividade (p<0,05; OR= 3,12; IC: 1,80 - 5,40). Detectou-se a presença de DNA de *B. caballi* em 0,21% (n= 1/474) das amostras de sangue testadas, demonstrando uma baixa circulação destes agentes nos rebanhos avaliados. Em relação à sorologia para *Borrelia spp.*, observou-se soroprevalência de 39,24% (n=186/474), sendo a frequência maior no rebanho da região Sul, com 44,66% (n=134/300), em comparação com o da região Sudeste (29,88%; n= 52/174). As fêmeas (p<0,05; OR=1,96; IC: 1,25 - 3,08) com menos de 5 anos na propriedade (p<0,05; OR=2,67; IC: 1,14 - 6,26) tendo como origem a Coudelaria do Rincão (p<0,05; OR=2,33; IC: 1,17 - 4,62), associados ao pastejo misto com bovinos e a presença do carrapato *R. microplus* parasitando equinos, foram os fatores mais relacionados com a soropositividade. Com relação à *T. equi* verificou-se que os rebanhos militares avaliados são endêmicos para a infecção, com alta prevalência de animais portadores assintomáticos. Com relação à *B. caballi*, verificou-se que este agente apresenta baixa circulação nos rebanhos investigados. A evidência de circulação de borrelíias com soroprevalência nos equinos reforça seu papel como sentinelas, sendo fator de alerta para potencial ocorrência de casos humanos. Os resultados obtidos reforçam a importância da vigilância epidemiológica dos carrapatos vetores e sua associação tanto com agentes infecciosos de risco para a saúde do efetivo militar humano, como nos equinos de uso militar nas regiões avaliadas.

Palavras-chave: Piroplamoses, Borrelioses, equinos de uso militar.

GENERAL ABSTRACT

CAMPOS, Carlos Henrique Coelho de. **Epidemiological aspects of *Theileria equi*, *Babesia caballi* and *Borrelia* spp. in horses for military use in the Southeast and Southern Brazil** 2015. 108p. Tesis (Doctor Science in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

In order to assess the epidemiological aspects of the occurrence of *Theileria equi*, *Babesia caballi* and *Borrelia* spp. in horses kept in military units in Rio de Janeiro and Rio Grande do Sul states, blood samples and ticks were collected. In all samples of DNA extracted from blood of horses the occurrence of infection by *T. equi* and *B. caballi* were investigated by PCR. In the serum samples, was assessed by ELISA, the occurrence of anti *T. equi*, *B. caballi* and *Borrelia* spp. The occurrence of *Amblyomma sculptum*, *Dermacentor nitens* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* was assessed at different levels of infestation. From the analyzed serum, 82.07% (n = 389/474) were considered positive for *T. equi*, and a higher prevalence was observed in horses from the “Coudelaria do Rincão”, in Rio Grande do Sul state (87.33%, n = 262/300). In horses kept at the Agulhas Negras Military Academy, in Rio de Janeiro state, a prevalence of 72.99% (n = 127/174) was observed. Multivariate analysis showed that the factor “origin” of the horses stabled at Coudelaria do Rincão was the most influential factor associated to seropositivity of animals (p <0.05; OR = 2.89, CI: 1.34 to 6.19), and that grazing with cattle was associated with the presence of the species *R. microplus*. PCR assay showed the presence of *T. equi* DNA in 49.37% (n = 234/474) of the tested blood samples, confirming these animals as asymptomatic carriers. Regarding serology for *B. caballi*, there was a prevalence of 59.92% (n = 284/474), with the highest frequency in the animals of the Southeast (72.99%, n = 127/174) in comparison to those created in the South region (52.33%, n = 157/300). It was found that remaining in the Southeast region was the most influential factor for seropositivity (p <0.05; OR = 3.12, CI: 1.80 to 5.40). We detected the presence of *B. caballi* DNA at 0.21% (n = 1/474) of the tested blood samples, demonstrating a low circulation rate of these agents in the livestock. Regarding the serology for *Borrelia* spp., a prevalence of 39.24% (n = 186/474) was found, with the highest frequency in the South herd, with 44.66% (n = 134/300), in comparison to the Southeast herd (29.88%, n = 52/174). Females (p <0.05; OR = 1.96, CI: 1.25 to 3.08) with less than 5 years on the property (p <0.05; OR = 2.67; CI: 1, 14 to 6.26) originated from “Coudelaria do Rincão” (p <0.05; OR = 2.33, CI: 1.17 to 4.62) associated with grazing with cattle and the presence of the tick *R. microplus* were the most related factor to seropositivity. With regards to *T. equi*, it was found that the evaluated military herds have an endemic infection, with high prevalence of asymptomatic animals. With respect to *B. caballi*, it was found that this agent exhibits low circulation at the investigated herds. Evidence of *Borrelia* circulation with seroprevalence in horses reinforces its role as sentinels, as alert factor for potential occurrence of human cases. These results support the importance of epidemiological surveillance of vector ticks and their association with agents of risk to the health of the military personnel and herds, in the evaluated areas.

Keywords: Piroplamosis, borreliosis, horses for military use

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- Tabela 1.** Presença ou ausência de equinos infestados por carrapatos observadas nos diferentes rebanhos para *Amblyomma sculptum*, *Dermacentor nitens* e *Rhipicephalus microplus* nos equinos de uso militar do município de Resende, Rio de Janeiro e São Borja, Rio Grande do Sul.36
- Tabela 2.** Resultados de *nested* PCR para *Theileria equi*, respectivas prevalências nos rebanhos equinos, e resultado do teste de comparação de proporções.....36
- Tabela 3.** Resultados de *nested* PCR para *Babesia caballi*, respectivas prevalências nos rebanhos equinos, e resultado do teste de comparação de proporções.....37
- Tabela 4.** Resultados de sororeatividade ao iELISA para *Theileria equi*, respectivas prevalências nos rebanhos equinos, e resultado do teste de comparação de proporções.....38
- Tabela 5.** Resultados de sororeatividade ao iELISA para *Babesia caballi*, respectivas prevalências nos rebanhos equinos, e resultado do teste de comparação de proporções.....38
- Tabela 6.** Análise bivariada e multivariada da frequência de equinos soropositivos através do ensaio de imunoadsorção enzimático (ELISA) indireto para *Theileria equi*, em função dos fatores associados, como gênero, idade, definição racial, manejo dos animais, origem, sistema de criação e presença de carrapatos nos equinos de uso militar dos estados do Rio de Janeiro e do Rio Grande do Sul.....39
- Tabela 7.** Análise bivariada e multivariada da frequência de equinos soropositivos através do ensaio de imunoadsorção enzimático (ELISA) indireto para *Babesia caballi*, em função dos fatores associados como gênero, idade, definição racial, tempo do animal na propriedade, origem dos animais e grau de infestação de carrapatos nos equinos de uso militar dos estados do Rio de Janeiro e do Rio Grande do Sul.....39
- Tabela 8.** Determinação das Piroplasmoses equinas, através do iELISA e *nested* PCR, nos rebanhos de equinos de uso militar40

CAPÍTULO II

- Tabela 1.** Grupos das doenças ocasionadas pelas borrelioses, espécies, vetores, hospedeiros e distribuição (FONSECA et al., 2005)..... 66
- Tabela 2.** Presença ou ausência de equinos infestados por carrapatos observadas nos diferentes rebanhos para *Amblyomma sculptum*, *Dermacentor nitens* e *Rhipicephalus microplus* nos equinos de uso militar do município de Resende, Rio de Janeiro e São Borja, Rio Grande do Sul..... 89
- Tabela 3.** Resultados de sororeatividade ao iELISA para *Borrelia spp.*, respectivas prevalências nos rebanhos equinos, e resultado do teste de comparação de proporções..... 89
- Tabela 4.** Análise bivariada e multivariada da frequência de equinos soropositivos através do ensaio de imunoadsorção enzimático (ELISA) indireto para *Borrelia sp.*, em função dos fatores associados como gênero, idade, definição racial, tempo do animal na propriedade, origem dos animais e grau de infestação de carrapatos nos equinos de uso militar dos estados do Rio de Janeiro e do Rio Grande do Sul.....90

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Localização geográfica, em vermelho, do município de Resende no estado do Rio de Janeiro.....26
- Figura 2.** Imagem aérea da Academia Militar das Agulhas Negras, localizada no município de Resende, Rio de Janeiro27
- Figura 3.** Localização geográfica, em vermelho, do município de São Borja no estado do Rio Grande do Sul28
- Figura 4.** Imagem aérea da Coudelaria do Rincão, localizada no município de São Borja, Rio Grande do Sul29
- Figura 5.** Imagens de equinos da AMAN: a) equinos semi-estabulados em baias do pavilhão Geral; b) animais semi-estabulados em pastagem da Sec Equi; c) equinos semi-estabulados nas baias do pavilhão Box; d) imagem do pavilhão Odim e equinos soltos em piquete deste pavilhão.....30
- Figura 6.** Resultado do controle de carrapatos sobre a incidência de casos clínicos agudos de Piroplasmoses no rebanho equino da Academia Militar das Agulhas Negras, de acordo com Campos et al. (2013)31
- Figura 7.** Imagem do mapa dos diversos piquetes existentes, destacando a área de pastejo misto, na Coudelaria do Rincão, município de São Borja, Rio Grande do Sul32
- Figura 8.** Gel de agarose (1%) com produtos da amplificação do fragmento de 430pb do gene EMA1, específico para *T. equi*. PM: Peso molecular de 1kb; A1 (Controle negativo); A2 (Controle positivo); A3, A7, A8 e A13 (Amostras negativas); A4, A5, A6, A9, A10, A11, A12: Amostras de DNA positiva através da PCR (seta branca)37
- Figura 9.** Gel de agarose (1%) com produtos da amplificação do fragmento de 430pb do gene BC48, específico para *B. caballi*. PM: Peso molecular de 1kb; A1 (Controle Positivo); A2 (Controle negativo); A3, A4, A5, A6, A7, A9, A10, A11, A12, A13 (Amostras negativas); A8: Amostras de DNA positiva através da PCR (seta branca)..... 37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	01
CAPITULO I - Aspectos epidemiológicos de <i>Theileria equi</i> e <i>Babesia caballi</i> em equinos de uso militar do município de Resende, estado do Rio de Janeiro e São Borja, estado do Rio Grande do Sul.	03
RESUMO	04
ABSTRACT	05
1 INTRODUÇÃO	06
2 REVISÃO DA LITERATURA	08
2.1 O Equino Militar	08
2.2 As Piroplasmoses Equinas.....	09
2.3 Sistemática.....	10
2.4 Histórico.....	11
2.5 Ciclo Biológico.....	11
2.6 Vetores e Transmissão.....	13
2.7 Epidemiologia.....	15
2.7.1 Estudos de prevalência no exterior.....	16
2.7.2 Estudos de prevalência no Brasil.....	18
2.8 Manifestações Clínicas, Laboratoriais e Anatomopatológicas.....	20
2.9 Diagnóstico.....	22
2.9.1 Parasitológico.....	22
2.9.2 Sorológico.....	22
2.9.3 Molecular.....	23
2.10 Tratamento.....	24
2.11 Prevenção e Métodos de Controle.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Descrição das Áreas de Estudo.....	26
3.1.1 Academia Militar das Agulhas Negras	26
3.1.2 Coudelaria do Rincão	27
3.2 Inquérito Epidemiológico.....	29
3.2.1 Delineamento do estudo e amostragem.....	29
3.2.2 Caracterização dos rebanhos	30
3.2.3 Ficha de informação.....	32
3.2.4 Coleta de carrapatos e amostras de sangue.....	33
3.3 Teste Sorológico.....	33
3.3.1 Obtenção do antígeno.....	33
3.3.2 Obtenção do controle positivo.....	33
3.3.3 Obtenção dos controles negativos.....	33
3.3.4 Ensaio de imunoadsorção enzimático (ELISA) indireto.....	34
3.4 Teste Molecular.....	34
3.4.1 Extração de DNA das amostras	34
3.4.2 Sensibilidade analítica da PCR	35
3.4.3 Ensaio da PCR.....	35

3.5 Avaliação dos Resultados e Análise Estatística	35
4 RESULTADOS	36
4.1 Infestação por Carrapatos.....	36
4.2 Sensibilidade Analítica da Técnica de nPCR	36
4.3 Inquérito Sorológico	38
4.4 Análise Bivariada, Multivariada e Fatores Associados aos Equinos Sororeagentes	38
4.5 Avaliação de Infecção e Co-infecção Considerando iELISA e nPCR	40
5 DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÕES	45
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
CAPITULO II - Aspectos epidemiológicos de <i>Borrelia</i> spp. em equinos de uso militar do município de Resende, estado do Rio de Janeiro e São Borja, estado do Rio Grande do Sul	60
RESUMO	61
ABSTRACT	62
1 INTRODUÇÃO	63
2 REVISÃO DA LITERATURA	65
2.1 Sistemática e Características do Gênero <i>Borrelia</i>	65
2.2 Vetores e Transmissão das Borrelioses	67
2.3 Doença de Lyme	69
2.4 Síndrome de Baggio-Yoshinari (SBY)	69
2.5 Epidemiologia e Saúde Única	71
2.6 Animais Reservatórios, Sentinelas e Carreadores	72
2.7 Borreliose em Equinos	74
2.7.1 Estudos de soroprevalência de <i>Borrelia</i> spp. em equinos	74
2.7.2 Manifestações clínicas das borrelioses em equinos	76
2.7.3 Diagnóstico em equinos	77
2.7.4 Tratamento.....	79
2.7.5 Prevenção	80
2.8 A Importância das Borrelioses e Outras Doenças Transmitidas por Carrapatos para as Forças Armadas.....	80
3 MATERIAL E MÉTODOS	83
3.1 Descrição das Áreas de Estudo.....	83
3.1.1 Academia Militar das Agulhas Negras	83
3.1.2 Coudelaria do Rincão	83
3.2 Inquérito Epidemiológico.....	84
3.2.1 Delineamento do estudo e amostragem.....	84
3.2.2 Caracterização dos rebanhos	84
3.2.3 Ficha de informação.....	85
3.2.4 Coleta de carrapatos e amostras de sangue.....	85
3.3 Teste Sorológico	86
3.3.1 Obtenção do antígeno.....	86
3.3.2 Obtenção do controle positivo	86

3.3.3 Obtenção dos controles negativos.....	86
3.3.4 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) indireto.....	87
3.4 Avaliação dos Resultados e Análise Estatística	87
4 RESULTADOS	89
4.1 Infestação por Carrapatos.....	89
4.2 Inquérito Sorológico	89
4.3 Análise Bivariada, Multivariada e Fatores Associados aos Equinos Sororeagentes	89
5 DISCUSSÃO	91
6 CONCLUSÕES.....	93
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
8 CONCLUSÕES GERAIS	105
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	106
ANEXOS	107
A- Ficha Individual de Informação de Equino	108

1 INTRODUÇÃO GERAL

As doenças transmitidas por carrapatos, tanto aos animais quanto ao homem, são influenciadas por uma série de fatores que se relacionam aos carrapatos vetores - os quais podem atuar como hospedeiros reservatórios amplificadores -, ao clima e a região fisiográfica, além de outros fatores, numa teia de relações que torna sua epidemiologia bastante diversa quando se comparam diferentes populações e ambientes. Assim, o controle e prevenção destas doenças tornam-se muito difíceis visto exigirem a interrupção de uma cadeia de transmissão complexa, envolvendo hospedeiros vertebrados e carrapatos, que interagem em um ambiente em constante mudança.

Corroborando com essas afirmativas, pesquisas epidemiológicas revelam soroprevalências distintas em diferentes regiões, rebanhos e tipos de manejo. Desta forma, com múltiplos fatores influenciando tais doenças, para que se tenha um melhor entendimento e elucidação da epidemiologia destas, há que se ter uma abordagem de análise multivariável das mesmas, visando à identificação dos reais fatores de risco envolvidos.

Os carrapatos são artrópodos parasitas pertencentes à classe Arachnida de ampla distribuição mundial, sendo encontrados em regiões tropicais, subtropicais e temperadas. Exercem hematofagia (alimentam-se de sangue e tecidos digeridos do hospedeiro) e parasitam uma série de animais vertebrados terrestres como anfíbios, répteis, aves e mamíferos, inclusive o homem. Destacam-se dentre os artrópodes vetores de doenças zoonóticas, sendo o segundo grupo de vetores que mais transmitem doenças ao homem, ficando atrás somente dos mosquitos Culicídeos. Além disso, são os artrópodes que mais transmitem doenças aos animais e os que maior variedade de doenças é capaz de transmitir aos homens e aos animais.

Sendo o Brasil o terceiro maior rebanho equídeo do mundo, com o crescente aumento dos negócios, com importação e exportação de equídeos e a proximidade de grandes eventos, a exemplo das Olimpíadas de 2016, abarca consigo esportes equestres e a intensificação trânsito internacional de equinos para nosso país.

O Exército Brasileiro possui um único centro de produção de equinos, a Coudelaria do Rincão, localizada no município de São Borja, no estado do Rio Grande do Sul. Os animais nascidos lá são distribuídos, com a idade de três anos, para todas as unidades militares que possuem efetivo de cavalos, possibilitando a dispersão de possíveis agentes etiológicos.

Desta maneira, dentro do contexto das doenças transmitidas por carrapatos relacionadas aos equinos, duas em especial chamam nossa atenção. Primeiramente, as Piroplasmoses equinas causadas pela *Theileira equi* e *Babesia caballi* que podem levar a grande impacto e prejuízos econômicos no mercado equestre, ocasionando desde infecções subclínicas, com queda de desempenho em equinos atletas, até baixa taxa de fertilidade por comprometimento embrionário em éguas reprodutoras, com as doenças clínicas agudas ou crônicas podendo levar a óbitos. Outra preocupação diz respeito ao comércio e trânsito internacional de equídeos, visto que países livres ou com programa de controle destas doenças exigirem sorologia negativa para o ingresso no país.

Em segundo plano, as Borrelioses, causadas por organismos do gênero *Borrelia* spp., bactérias com potencial zoonótico causadoras de doenças de grande impacto na saúde humana e animal, destacando-se, no hemisfério norte, a Doença de Lyme. Os equinos têm sido considerados animais sentinelas e carreadores de carrapatos infectados por estes agentes que, apesar de não possuírem, até o momento, etiologia bem esclarecida, também são relatados como prováveis reservatórios de tal zoonose. Assim, o trânsito internacional de equinos atletas, principalmente oriundos da Europa e Estados Unidos, pode contribuir para a dispersão

e introdução de animais e carrapatos infectados de borrelíias indenes em nosso país. Ademais, a proximidade de tais animais com o ser humano pode contribuir para a ocorrência da doença nestes.

Isto posto, o estudo epidemiológico sobre *T. equi*, *B. caballi* e *Borrelia* spp. em áreas ocupadas por rebanhos de equinos de uso militar, nas regiões Sudeste e Sul do Brasil, verificando os reais fatores associados à soropositividade nos animais, iluminará lacunas a respeito de seus agentes etiológicos, vetores e enfermidades, conduzindo à formas racionais e efetivas de prevenção e controle das doenças, considerando que trata-se de um rebanho da região Sul que produz equinos e distribui para o rebanho da região Sudeste.

Assim, um estudo epidemiológico transversal foi realizado em uma coorte de equinos de uso militar do município de Resende, estado do Rio de Janeiro e do município de São Borja, estado do Rio Grande do Sul, visando verificar a prevalência de animais positivos para, *T. equi*, *B. caballi* e *Borrelia* spp. através de varredura sorológica pela técnica de ELISA indireto e técnica molecular da PCR, bem como identificar potenciais fatores de risco associados à soropositividade dos animais aos respectivos agentes através de análise multivariada.

CAPÍTULO I

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE *Theileria equi* e *Babesia caballi* EM EQUINOS DE USO MILITAR DO MUNICÍPIO DE RESENDE, ESTADO DO RIO DE JANEIRO E SÃO BORJA, ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

RESUMO

Com o objetivo de avaliar os aspectos epidemiológicos da ocorrência de *Theileria equi* e *Babesia caballi* em equinos mantidos em unidades militares no Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, foram coletadas amostras de sangue e carrapatos. Nas amostras do DNA extraídas do sangue dos equinos investigou-se, por PCR, a ocorrência de infecções por *T. equi* e *B. caballi*. Nas amostras de soro, verificou-se, por ELISA, a ocorrência de anticorpos anti *T. equi* e *B. caballi*. Foi verificada a ocorrência de *Amblyomma sculptum*, *Dermacentor nitens* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em diferentes níveis de infestação. Do total de amostras de soro analisadas, 82,07% (n=389/474) foram consideradas sororeativas para *T. equi*, sendo a maior prevalência observada nos equinos da Coudelaria do Rincão, Rio Grande do Sul (87,33%; n=262/300). Nos equinos mantidos na Academia Militar das Agulhas Negras, Rio de Janeiro, verificou-se uma soroprevalência de 72,99% (n=127/174). Por análise multivariada, observou-se que o fator origem dos equinos na Coudelaria do Rincão foi o fator associado mais influente para a soropositividade dos animais ($p < 0,05$; OR=2,89; IC: 1,34 - 6,19), sendo o pastejo misto com bovinos associado com a presença da espécie *R. microplus* mais relacionado com a soropositividade dos equinos. Pela PCR, evidenciou-se a presença de DNA de *T. equi* em 49,37% (n= 234/474) das amostras de sangue testadas, confirmando estes animais como portadores assintomáticos. Em relação à sorologia de *B. caballi*, observou-se uma soroprevalência de 59,92% (n=284/474), sendo a frequência mais elevada nos animais da região Sudeste (72,99%; n=127/174) do que nos criados na região Sul (52,33%; n=157/300). Verificou-se que o fator permanência na região Sudeste foi o fator mais influente para a soropositividade ($p < 0,05$; OR= 3,12; IC: 1,80 - 5,40). Detectou-se a presença de DNA de *B. caballi* em 0,21% (n= 1/474) das amostras de sangue testadas, demonstrando uma baixa circulação destes agentes nos rebanhos avaliados. Com relação à *T. equi* verificou-se que os rebanhos militares avaliados são endêmicos para a infecção, com alta prevalência de animais portadores assintomáticos. Com relação à *B. caballi*, verificou-se que este agente apresenta baixa circulação nos rebanhos investigados, apesar de apresentarem ainda resposta sorológica indicativa de exposição. Os resultados obtidos reforçam a importância da vigilância epidemiológica dos carrapatos vetores e sua associação com agentes infecciosos de risco para a saúde dos equinos de uso militar nas regiões avaliadas, sendo necessária a adoção de medidas que alterem o manejo de criação dos equinos na Coudelaria do Rincão evitando qualquer contato dos equinos com a criação de bovinos, inclusive não devendo frequentar as mesmas pastagens.

Palavras-chave: Babesiose, Theileriose, equinos de uso militar

ABSTRACT

In order to assess the epidemiological aspects of the occurrence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses kept in military units in Rio de Janeiro and Rio Grande do Sul states, blood samples and ticks were collected. In all samples of DNA extracted from blood of horses the occurrence of infection by *T. equi* and *B. caballi* were investigated by PCR. In the serum samples, was assessed by ELISA, the occurrence of anti *T. equi* and *B. caballi*. The occurrence of *Amblyomma sculptum*, *Dermacentor nitens* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* was assessed at different levels of infestation. From the analyzed serum, 82.07% (n = 389/474) were considered positive for *T. equi*, and a higher prevalence was observed in horses from the “Coudelaria do Rincão”, in Rio Grande do Sul state (87.33%, n = 262/300). In horses kept at the Agulhas Negras Military Academy, in Rio de Janeiro state, a prevalence of 72.99% (n = 127/174) was observed. Multivariate analysis showed that the factor “origin” of the horses stabled at Coudelaria do Rincão was the most influential factor associated to seropositivity of animals (p <0.05; OR = 2.89, CI: 1.34 to 6.19), and that grazing with cattle was associated with the presence of the species *R. microplus*. PCR assay showed the presence of *T. equi* DNA in 49.37% (n = 234/474) of the tested blood samples, confirming these animals as asymptomatic carriers. Regarding serology for *B. caballi*, there was a prevalence of 59.92% (n = 284/474), with the highest frequency in the animals of the Southeast (72.99%, n = 127/174) in comparison to those created in the South region (52.33%, n = 157/300). It was found that remaining in the Southeast region was the most influential factor for seropositivity (p <0.05; OR = 3.12, CI: 1.80 to 5.40). We detected the presence of *B. caballi* DNA at 0.21% (n = 1/474) of the tested blood samples, demonstrating a low circulation rate of these agents in the livestock. With regards to *T. equi*, it was found that the evaluated military herds have an endemic infection, with high prevalence of asymptomatic animals. Regarding *B. caballi*, it was found that this agent has low circulation rates in the investigated herds, despite the persistence of antibody response, which indicates past exposure. These results support the importance of epidemiological surveillance of vector ticks and its association with agents of risk to the health of horses for military use, in the evaluated areas, requiring the adoption of measures concerning breeding of horses in the “Coudelaria do Rincão”, such as avoiding the contact of horses with cattle when grazing.

Keywords: Babesiosis, Theileriosis, horses for military use

1 INTRODUÇÃO

O chamado Complexo do Agronegócio Cavalo em nosso país é responsável pela geração de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos, movimentando cerca de R\$ 7,3 bilhões somente com a produção de cavalos. Entre os anos de 1997 e 2009 verificou-se uma marcante expansão da exportação de equinos vivos pelo Brasil, com um crescimento da ordem de 524%, indo de um volume de movimentação financeira de US\$ 702,8 mil para US\$ 4,4 milhões. Ademais, o país é o oitavo maior exportador mundial de carne equina (MAPA, 2014). O Brasil tem cerca de 5.514.000 equinos, 1.002.000 asininos e 1.277.000 muares, totalizando mais de 7.793.000 equídeos distribuídos pelo território nacional (IBGE, 2010), possuindo atualmente o terceiro maior rebanho equídeo do mundo.

O Exército Brasileiro possui, atualmente, um rebanho aproximado de 2000 equinos distribuídos por todo o território nacional, sendo que, o único haras responsável pela reprodução é a Coudelaria do Rincão, localizada no município de São Borja, estado do Rio Grande do Sul, que distribui os seus produtos para todas as demais unidades militares que possuem efetivo equino no Brasil, inclusive para a Academia Militar das Agulhas Negras, localizada no município de Resende, estado do Rio de Janeiro.

Além de um crescente aumento dos negócios relacionados à importação e exportação de equídeos, a proximidade de grandes eventos em nosso país, a exemplo das Olimpíadas de 2016, abarca consigo esportes equestres e a intensificação do trânsito internacional de equinos para o Brasil. Dentro do contexto das doenças transmitidas por carrapatos com alta relevância à sanidade equestre destacam-se as Piroplasmoses equinas.

As Piroplasmoses equinas, atualmente reconhecidas como *Theileriose* e *Babesiose*, são consideradas importantes doenças parasitárias dos cavalos, com grande impacto econômico na indústria equina. A sanidade dos animais interfere diretamente no negócio equestre, ao comprometer o comércio e o trânsito internacional de equídeos, visto que países livres ou com programa de controle das doenças exigem sorologia negativa para a entrada de equídeos em seus territórios.

As perdas associadas a infecções por *Theileria equi* e *Babesia caballi*, protozoários que são transmitidos naturalmente por carrapatos, estão relacionadas tanto aos fatores clínicos como a restrição ao trânsito internacional de animais soropositivos. Os dois agentes são bastante distintos e determinam manifestações diferentes da doença, sendo que a *B. caballi* induz, geralmente, sinais clínicos muito mais brandos em relação à *T. equi*. Os equídeos podem ser parasitados por uma ou ambas as espécies. Os parasitas causam, em grandes parasitemias, crises hemolíticas e anemia. Equinos cronicamente infectados são passíveis de reagudizações com queda no desempenho, experimentando um prejuízo silencioso para a sua saúde.

Recentemente, países considerados livres pela Organização Internacional de Epizootias (OIE), inclusive alguns que investiram milhões de dólares na erradicação destas hemoparasitoses, têm relatado casos de sorologia positiva em seus rebanhos. Os Estados Unidos, maior rebanho equino do mundo, têm experimentado surtos destas doenças, sendo consideradas doenças reemergentes naquele país.

A epidemiologia das Piroplasmoses equinas em nosso país ainda tem lacunas a serem esclarecidas. Talvez a maior delas diga respeito ao real vetor envolvido na transmissão de seus agentes etiológicos. Apesar do *Amblyomma sculptum* (Complexo *Amblyomma cajennense*) e do *Dermacentor nitens* serem os principais carrapatos a afetarem equídeos em nosso país, somente o *D. nitens* se mostrou vetor competente para a *B. caballi*, sem que

nenhum destes tenha se mostrado vetor competente para *T. equi* em pesquisas realizadas até o momento.

Algumas pesquisas sugerem que o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* possa ser um vetor da hemoparasitose. Entretanto, seu real papel na epidemiologia da doença à campo permanece incerto, visto que rebanhos equinos que, aparentemente, nunca tiveram contato com tal carrapato ou com bovinocultura tem apresentado sorologia positiva.

Estudos de soroprevalência para *T. equi* e *B. caballi* demonstram resultados diversos de acordo com o rebanho, tipo de manejo, região fisiográfica e microclima. Uma série de fatores pode estar influenciando na presença, dispersão e nível de infestação dos possíveis vetores e, conseqüentemente, na soroprevalência da doença, ocasionando tal diversidade de resultados nos estudos.

Desta forma, mais estudos são necessários para o esclarecimento dos reais vetores envolvidos na transmissão e manutenção das doenças em nosso território. Uma abordagem de análise multivariável pode auxiliar na identificação de fatores de risco envolvidos para as doenças, fornecendo evidências epidemiológicas para o melhor entendimento de seus ciclos, compreensão de seu comportamento, distribuição geográfica e mecanismos de disseminação nos rebanhos equídeos de nosso país, direcionando para medidas racionais e efetivas de controle. Além disso, é importante identificar regiões que possuem estabilidade enzoótica para um agente, mas não para outro, devido às condições ambientais envolvidas na maior ou menor prevalência dos carrapatos vetores.

Considerando que os equinos de uso militar utilizados pelo Exército Brasileiro em todo o território nacional são produzidos, exclusivamente, na Coudelaria do Rincão, localizada no município de São Borja, estado do Rio Grande do Sul, um estudo epidemiológico transversal foi realizado em uma coorte de equinos de uso militar do município de Resende, na microrregião do Vale do Paraíba Fluminense, e no município de São Borja, na região oeste do Rio Grande do Sul, visando verificar a prevalência de animais positivos para *T. equi* e *B. caballi* através de “screening” sorológico pela técnica de ELISA e identificação molecular pela PCR, bem como procedeu-se uma análise multivariada objetivando a identificação de fatores de risco associados à soropositividade dos animais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Equino Militar

Os equinos foram utilizados com finalidades militares em toda evolução dos povos, desde as tribos nômades da Ásia Central, nas Invasões Bárbaras e na Conquista do Novo Mundo. Na era moderna, o equino teve papel de destaque nas campanhas militares, como na Primeira Guerra Mundial (1914-1918), onde havia um equino para cada quatro soldados, com muitos cavalos enviados para frente de batalha. A França e a Inglaterra utilizaram 2.770.000 equinos, os Estados Unidos enviaram 923.580 equinos para Europa, enquanto a Alemanha contou com 1.236.000 animais. Na Segunda Guerra Mundial (1939-1945) a utilização do equino militar também foi intensa. A Alemanha possuía 40% de sua tropa motorizada atrelada a equinos e a Itália utilizou 60.000 equinos ao invadir a Etiópia. Em muitos momentos os equinos tornaram-se insubstituíveis, como na campanha russa durante a Segunda Guerra, quando o Exército alemão motorizado ficava retido por falta de combustível e/ou atolado na neve (LIMA et al., 2006).

Para seu emprego militar, o equino deve possuir características morfofisiológicas adequadas, sendo possuidor de condições de saúde, resistência, força e velocidade que o tornem apto a suportar trabalhos contínuos e variados nas três andaduras, passo, trote e galope. Logo, para ser incorporado ao quadro de animais do Exército, o equino deve atender aos requisitos básicos do cavalo militar, quais sejam, ter idade de três a oito anos, inclusive; obedecer à altura mínima estabelecida, que varia de 1,45 a 1,60m, dependendo de sua categoria; ser sadio, sem taras e sem vícios; possuir boa capacidade cárdio-respiratória; possuir boa cobertura muscular; ter boa compleição e bons aprumos; andar ao passo, trote e galope, não sendo permitido animal marchador; estar castrado, se equino macho, exceto o destinado à reprodução; ser manso, isto é, deixar-se tocar, flexionar os membros, cabrestear com facilidade, encilhar e montar por uma só pessoa e atender a outras especificações estabelecidas pela Diretoria de Abastecimento do Exército Brasileiro (EB – DLog, 2013).

Atualmente, o Exército Brasileiro possui cerca de 1.820 equinos distribuídos em quase todo território nacional em diversas unidades militares, exceto na Região Norte, sendo utilizados em diferentes atividades (CAMPOS et al., 2007), tais como: ações de Garantia da Lei e da Ordem nos Regimentos de Cavalaria (1º, 3º e REsC); participação em Cerimonial Militar como desfiles, guarda de honra e escoltas de autoridades; patrulhamento em Organizações Militares e nos Campos de Instrução; instrução militar nas escolas de formação de oficiais e praças, Academia Militar das Agulhas Negras (AMAN), Escola de Sargentos das Armas (EsSA) e Escola de Equitação do Exército (EsEqEx); produção de imunobiológicos (soro antiofídico) em convênio do Ministério da Saúde com o Instituto de Biologia do Exército (IBEx); prática desportiva, integrando comissões de desportos nacionais; atividades de equoterapia e programas de estudo e melhoramento da equideocultura nacional na Coudelaria de Rincão.

A Coudelaria de Rincão é mantida em São Borja, estado do Rio Grande do Sul, como centro de produção de equinos do Exército Brasileiro, para o suprimento de animais dentro dos padrões necessários para desempenhar o papel atribuído ao cavalo militar no Brasil, produzindo em média 100 potros por ano que são distribuídos para todas as unidades militares que possuem efetivo equino (CAMPOS et al., 2007).

2.2 As Piroplasmoses Equinas

As Piroplasmoses equinas são doenças transmitidas por carrapatos, sendo causadas por parasitas intraeritrocitários *Theileria equi* (LAVERAN, 1901; MEHLHORN; SCHEIN, 1998) e/ou *Babesia caballi* (NUTTAL; STRICKLAND, 1912), sendo que os agentes são bastante distintos, com comportamentos diferentes no hospedeiro vertebrado e invertebrado, e determinam manifestações particulares na evolução clínica (AMBAWAT, et al., 1990). Os parasitas causam, em grandes parasitemias, crises hemolíticas e anemia (FRIEDHOFF et al., 1990).

Estas doenças podem ser hiperagudas, agudas, subagudas ou crônicas (DE WAAL et al., 1992), sendo seus sinais clínicos caracterizados por perda de apetite; decréscimo na capacidade de trabalho (MACHADO et al, 2012); febre, que pode ser intermitente; hemólise intravascular; icterícia; anemia; hemoglobínúria; bilirubinúria; esplenomegalia encontrados em estágios tardios da enfermidade; depressão e até morte (DE WAAL et al., 1992).

No caso da *T. equi*, a grande maioria dos animais torna-se portadora, permanecendo neste estado por longos períodos, funcionando como uma fonte de infecção para os carrapatos vetores e para outros equinos (DE WALL, 1992). Estes animais, aparentemente assintomáticos, porém portadores, podem manifestar queda de desempenho atlético (BOTTEON et al., 2005). Mundialmente distribuída, é endêmica em muitas regiões tropicais e subtropicais, estando sua distribuição diretamente ligada à presença dos carrapatos vetores (PFEIFER BARBOSA et al., 1995). Alguns países como o Canadá, Japão, Grã Bretanha e Austrália são classificados como livres de *T. equi* pela OIE, restringindo o trânsito de animais, entrada e movimento interno, baseado na sorologia de tal hemoparasita. Sendo assim, a doença, além de importância econômica, tem relevância quanto ao trânsito de animais (SCOLES et al., 2011).

Antes dos jogos Olímpicos de 2000 em Sydney, Austrália, o Serviço de Inspeção e Quarentena alertou para o importante risco para o país na importação temporária de equinos soropositivos para as Piroplasmoses. Neste relatório existiam propostas para as medidas de risco e necessidade de quarentena e ainda ênfase para que animais positivos não entrassem no Austrália (MARTIN, 1999).

Há registros da introdução de Piroplasmoses equinas em países não endêmicos, como os ocorridos no estado da Flórida, Estados Unidos, em 1961 e 1965, com a introdução de *B. caballi* e *T. equi* através de equinos importados de Cuba. Além deste registro, na Austrália também houve a introdução de *T. equi*, em 1976, com a importação de cavalos da Espanha (BRÜNING, 1996).

Apesar de os Estados Unidos serem considerados livres desde 1988, resultado de 12 milhões de dólares e 25 anos de campanha de erradicação, iniciada em 1962, este país tem sofrido surtos da doença desde 2008 nos estados da Califórnia, Colorado, Flórida, Geórgia, Oklahoma e Texas (UETI et al., 2012).

Do surto recente, ocorrido no estado do Texas, decorreu um alarme, pois os cavalos positivos de 16 Estados Americanos foram rastreados à partir de uma contaminação única em um rancho. Tais casos parecem estar ligados à importação de animais portadores assintomáticos, com resultados negativos nos exames sorológicos (SCOLES et al., 2011). Desta forma, a Theileriose equina tem sido considerada uma enfermidade reemergente nos EUA (UETI et al., 2012), que com mais de 9,2 milhões de cavalos estimou-se que uma epidemia por este agente poderia ocasionar um dano financeiro na ordem de 39 bilhões de dólares na indústria equina (AMERICAN HORSE COUNCIL, 2005).

Assim, as movimentações de equinos durante leilões, exposições e operações militares podem contribuir para a disseminação da doença às áreas livres, as quais podem não estar

completamente livres dos carrapatos vetores (FRIEDHOFF et al., 1990), como também deve ser monitorada a introdução de animais negativos em áreas endêmicas, predispondo tais indivíduos ao contágio e manifestação de doença clínica aguda.

Além dos impactos econômicos decorrentes da restrição à movimentação e comércio de equinos portadores, há outros aspectos envolvidos como: custos de tratamento, prevenção e controle, queda de desempenho atlético, tempo de afastamento do animal do trabalho e perdas por mortes (BOTTEON et al., 2005).

Oliveira (2012) buscou identificar assimetrias e semelhanças na criação de equinos na região sul do Brasil e na Argentina e concluiu que há necessidade de intensificar o controle de diversas doenças como o Mormo, a Anemia Infecciosa Equina e aquelas causadas por hemoparasitas, tanto pelo aspecto de saúde pública, como pelo potencial do agronegócio brasileiro. Ressaltou, ainda, que tais medidas sanitárias devem ser adotadas de forma urgente a fim de não comprometer os compromissos internacionais assumidos pelo Brasil para a realização das Olimpíadas de 2016.

Portanto, as Piroplasmoses equinas têm representando uma séria preocupação mundial, principalmente em relação a equinos que participam de competições internacionais (SEVINC et al., 2008). No Brasil, tal fato torna-se extremamente relevante, não só em vista das competições internacionais que equinos brasileiros participarão em países livres, mas principalmente com relação a eventos equestres de projeção mundial que ocorrerão no país nos próximos anos, a exemplo das Olimpíadas de 2016.

2.3 Sistemática

Theileria equi

Reino: Protista;
Sub-reino: Protozoa;
Filo: Apicomplexa;
Classe: Sporozoea;
Sub-classe: Piroplasmaea;
Ordem: Piroplasmida;
Família: Theileriidae;
Gênero: *Theileria*;
Espécie: *Theileria equi* (LAVERAN, 1901) Mehlhorn e Schein, 1998.

Babesia caballi

Reino: Protista;
Sub-reino: Protozoa;
Filo: Apicomplexa;
Classe: Sporozoea;
Sub-classe: Piroplasmaea;
Ordem: Piroplasmida;
Família: Babesiidae
Gênero: *Babesia*
Espécie: *Babesia caballi* (NUTTAL;STRICKLAND, 1910)

2.4 Histórico

O gênero *Babesia* teve o início de sua descrição na Romênia, em 1888, por Babés, que visualizou microorganismos em hemácias bovinas e associou tal achado com a hemoglobínúria bovina. Cinco anos mais tarde, em 1893, Smith e Kilborne demonstraram que o agente da febre do Texas, que acometia bovinos nos Estados Unidos, era transmitido por carrapatos, nomeando tal agente de *Pyrosoma bigeminum*. Ainda em 1893, Starcovici, visando homenagear Babés, o primeiro a identificar tais hemoparasitas em sangue bovino, propôs o nome *Babesia* para o gênero. O gênero *Babesia* possui formas piriforme, oval e amebóide, tendo como principal característica seu desenvolvimento no interior de eritrócitos de mamíferos (RIEK, 1966).

A babesiose em equinos foi descrita em 1901 por Theiler e por Laveran, na África do Sul, ao examinarem esfregaços de sangue de equinos neste país. Tais autores nomearam tal agente etiológico como sendo *Piroplasma equi*. O nome piroplasma advém do formato similar à pêra que tais protozoários adquirem no interior do eritrócito, após seu processo de multiplicação.

Em 1910, Nuttall e Strickland, a partir do desenvolvimento de um estudo sobre a febre biliar dos equinos, observaram estruturas similares ao já descrito *Piroplasma equi*, agente causal da Piroplasmose equina. No entanto, considerando que estes parasitas, embora localizados no interior de eritrócitos dos equinos, fossem maiores e distintos de *P. equi*, aqueles autores a denominaram como uma nova espécie, *Piroplasma caballi* (Nuttall; Strickland, 1912).

Posteriormente, Nuttall e Strickland (1910) verificaram que as características morfológicas do *Piroplasma equi* diferiam de outras espécies deste gênero, e propõe a nomenclatura de *Nuttalia equi* para tal agente. Futuramente, estudos de sistemática classificam este hemoparasita dentro do gênero *Babesia*.

Desde o início de sua descrição em 1901, como *Piroplasma equi*, sua reclassificação como *Nuttalia equi* em 1910 e, posteriormente, como *Babesia equi*, tem sido evidenciadas diferenças em sua morfologia e ciclo. Mais recentemente, estudos verificaram e apontaram divergências sobre a classificação da *Babesia equi* no gênero *Babesia* questionando tal classificação (MEHLHORN; SCHEIN, 1984).

O principal achado em *B. equi*, que justificou tal questionamento sobre sua diferença das demais espécies do gênero *Babesia*, foi o fato deste hemoparasita realizar esquizogonia em linfócitos (SCHEIN et al., 1981). Além disso, foi comprovado que tal parasita realizava transmissão transtadial nos vetores, sendo sua transmissão transovariana incerta (SIGRIST, 1983). Outra divergência foi a sugestão de que tal protozoário teria um metabolismo diferenciado de outras *Babesia*, dado a resistência de *B. equi* aos produtos babesicidas normalmente eficazes contra outras espécies do gênero (MEHLHORN; SCHEIN, 1984). Desta forma, Mehlhorn e Schein, em 1998, terminaram por reclassificá-la como *Theileria equi*. Apesar de tal reclassificação à época ser baseada em morfologia e características relativas ao ciclo deste hemoparasita, estudos mais recentes de biologia molecular e análise filogenética tem corroborado que tal hemoparasita realmente difere do gênero *Babesia* (KAPPMYER et al. 2012).

2.5 Ciclo Biológico

A *B. caballi* se caracteriza por apresentar uma forma infectante de 2,5 a 3,0µm de comprimento denominada esporozoíta e que se encontra na saliva do carrapato transmissor. Quando atingem o lúmen da circulação sanguínea, os esporozoítas penetram ativamente nos eritrócitos, e se diferenciam em formas arredondadas e ovaladas, sendo designadas trofozoítas. Estes trofozoítas, após a divisão binária a qual ocorre no interior das hemácias,

dão origem a duas formas características deste gênero, em formato piriforme, os merozoítas, que promovem o rompimento da célula infectada. Após esta etapa, novas células são infectadas, repetindo o processo de multiplicação em outros eritrócitos (SIMPSON et al., 1967; HOLBROOK et al., 1968; MEHLHORN; SCHEIN, 1985; SCHEIN, 1988).

O ciclo do parasita no interior dos carrapatos ocorre subsequentemente após a ingestão dos gametócitos, quando se inicia o processo de gametogonia, o que resulta na formação de gametas do parasita no interior do artrópode vetor. Este processo culmina com a formação do oocineto, o qual após penetrar na parede intestinal do carrapato, se multiplica, formando os vermículos, que posteriormente atingem a hemolinfa, e em sequência, outros órgãos do carrapato, como os ovários e glândula salivar (MEHLHORN; SCHEIN, 1985).

Quando a infecção atinge a glândula salivar do carrapato, ocorre a esporogonia deste agente, culminando com a liberação das formas infectantes à partir do quinto dia após iniciada a alimentação do vetor após a fixação do carrapato no hospedeiro (HOLBROOK et al., 1968; (MEHLHORN; SCHEIN, 1985).

Ao contrário do gênero *Babesia* que ao serem injetadas pelo carrapato no hospedeiro invadem diretamente eritrócitos, os esporozoítos de *T. equi* inicialmente penetram em linfócitos, desenvolvendo-se em esquizontes (UILENBERG, 2006). Assim, originam macro e micro-esquizontes (esquizogonia), originando cerca de 200 merozoítos por linfócito infectado.

O linfócito rompe-se e libera tais merozoítos que, então, infectam hemácias iniciando um processo de divisão binária, originando estágios eritrocíticos piriformes, os quais podem formar tétrades semelhantes à “cruz de malta” (merogonia). As hemácias infectadas, após o processo de divisão binária, se rompem e liberam os merozoítos que infectarão outros eritrócitos, alguns dando continuidade ao processo de reprodução assexuada. Entretanto, alguns destes merozoítos, ao infectarem as hemácias, se diferenciam e podem gerar formas esféricas chamadas gamontes (MEHLHORN; SCHEIN, 1984).

Os carrapatos vetores são infectados após a ingestão de células sanguíneas infectadas por gamontes. Tais gamontes crescem rapidamente no intestino do carrapato originando estágios multinucleares, os chamados “corpos raiados”. Posteriormente, tais gamontes multinucleares se dividirão em estágios mononucleares: os macro e microgamontes, que se diferenciarão em macro e microgametas que darão início à fase de reprodução sexuada (gametogonia) (MEHLHORN; SCHEIN, 1984).

Os micro e macrogametas se fundem formando os zigotos móveis (oocinetos) que invadem as células intestinais dos carrapatos e se multiplicam por divisão binária ou múltipla originando esporocinetos (vermículos). Por fim, as células intestinais infectadas se rompem liberando os vermículos móveis que, no caso da *Babesia*, invadem diversos órgãos do carrapato, entre glândulas salivares e os ovários nas fêmeas. Desta maneira, ocorre a transmissão transovariana que garante que a infecção passe à próxima geração de carrapatos nas *Babesia*. Esporogonia ocorre nas glândulas salivares, aumentando a infecção e possibilitando a transmissão de esporozoítos ao hospedeiro vertebrado via saliva (UILENBERG, 2006; O'DWYER, 2010).

Já no caso da *T. equi*, os zigotos móveis (oocinetos) não se multiplicam nas células intestinais formando esporocinetos (vermículos) e, ao invadirem a hemolinfa, vão para as glândulas salivares, não se distribuindo a outros órgãos nem aos ovários como a *Babesia*, não possuindo portanto transmissão transovariana. Nas células da glândula salivar há reprodução assexuada (esporogonia) gerando esporozoítos que se mantêm nos estágios do carrapato vetor, garantido a transmissão transestadial. Assim, quando o carrapato se fixa ao hospedeiro vertebrado, este injeta esporozoítos de *Theileria* através da saliva (UILENBERG, 2006).

2.6 Vetores e Transmissão

Em regiões temperadas, assim como em regiões tropicais, a *T. equi* tem sido transmitida principalmente por carrapatos dos gêneros *Dermacentor*, *Hyalomma* e *Rhipicephalus* (UILENBERG, 2006). No Brasil, a transmissão de *T. equi* tem sido relacionada ao carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, através de evidências epidemiológicas relacionando a presença deste vetor com a infecção dos equinos (HEUCHERT et al., 1999; SOUZA et al., 2000; NIZOLI et al., 2008; TORRES et al., 2012). Além disso, tal transmissão tem sido experimentalmente comprovada, indicando ser este um possível vetor (GUIMARÃES et al., 1997; GUIMARÃES et al., 1998; UETI et al., 2005).

Estudos sobre o comportamento de *R. (B.) microplus* em diferentes animais demonstram que o equino pode ser hospedeiro deste carrapato, porém, não com a mesma eficiência que em bovinos (FRANQUE et al., 2009). Após infestações artificiais de larvas deste carrapato em equinos, não se obtiveram fêmeas ingurgitadas. Através de infestação natural do vetor em equinos, foi possível observar que o equino é um hospedeiro alternativo para *R. (B.) microplus*, desenvolvendo até uma geração neste, podendo, posteriormente, terminar seu ciclo nos bovinos (BITTENCOURT et al., 1990). Reforçando essa possibilidade de infestação, Labruna et al. (2001) relataram que somente em propriedade que existia o pastejo misto entre bovinos e equinos, o *R. microplus* foi encontrado promovendo o parasitismo nos cavalos e sugeriu que o método mais eficiente para controlar o parasitismo por esta espécie de carrapato é separar completamente os equinos de contato com os bovinos, inclusive impedindo de utilizar as mesmas pastagens.

Mason e Norval (1981) demonstraram que a larva e o macho adulto de *R.(B.) microplus* são capazes de trocar de um hospedeiro a outro em condições adversas. A alta motilidade dos machos e a sua considerável longevidade sugerem a possibilidade destes se transferirem de animais infectados a não infectados, um aspecto significante na epidemiologia da doença.

Apesar do *R. (B.) microplus* ser evidenciado como um possível vetor, têm sido detectadas infecções em rebanhos equinos, aparentemente, sem contato com tal ectoparasito (KERBER et al., 2009). O *A. sculptum* e *D. nitens* são os carrapatos que mais comumente parasitam os equinos, sendo que estudos experimentais tentando comprovar a transmissão de *T. equi* por estes carrapatos não apresentaram sucesso em evidenciar tal fato, permanecendo ainda incertos seus papéis como vetores (DENNING F., 1988, apud PFEIFER BARBOSA et al., 1995). Recente estudo também mostrou que ninfas de *A. cajennense* não se infectaram por *T. equi* após alimentarem-se em equinos cronicamente infectados (RIBEIRO et al., 2011).

Recentemente, foi relatado um surto de Theileriose em equinos, iniciado no estado do Texas, que envolveu mais de 290 equinos e ocasionou incidência de 100% do rebanho em algumas propriedades. Neste surto, a única espécie de carrapato encontrado acometendo os equinos foi *A. cajennense*, sendo a transmissão da *T. equi* relacionada a este carrapato (SCOLES et al., 2011; UETI et al., 2012). Estudo de epidemiologia de *T. equi* baseado em técnicas moleculares para detecção do hemoparasita também associou a presença de infestação de *A. cajennense* com positividade nos equinos (PECKLE et al., 2013). Assim, ainda não estão bem elucidados os reais mecanismos e os vetores envolvidos na transmissão da *T. equi* e sua manutenção em rebanhos do continente americano.

Com o recente reconhecimento de que o anteriormente conhecido como *A. cajennense* na verdade se trata de um complexo com diferentes espécies, possuindo mesmas características morfológicas externas, no entanto com diferentes condições biológicas, envolvendo inclusive sucesso ou insucesso na fecundação de indivíduos provenientes de diferentes regiões, tem-se um vácuo que demandará investigações quanto a qual espécie dentre as deste complexo ocorrem em cada região, bem como qual a potencialidade destas

como reservatórios e ou vetores dos diferentes patógenos comumente veiculados por carrapatos (NAVA et al., 2014).

De acordo com Friedhoff et al. (1990) a transmissão e distribuição de *B. caballi* na Europa e Ásia estão relacionadas a cinco espécies do gênero *Dermacentor* (*D. marginatus*, *D. silvarum*, *D. nitens*, *D. nutalli* e *D. reticulatus*) e uma de *Hyalomma* (*H. marginatum*). Na África, De Waal (1990) registrou a transmissão de *B. caballi* por *Rhipicephalus evertsi* e *Hyalomma truncatum*. O envolvimento de *D. nitens* na transmissão e distribuição de *B. caballi* nos países americanos foi registrado pela primeira vez à partir de estudos experimentais em equídeos no estado da Flórida, nos Estados Unidos (ROBY; ANTHONY, 1963). Em seguida, Holbrook e Frerichs (1968) observaram pela primeira vez as formas de multiplicação do protozoário em amostras de hemolinfa e tecidos de *D. nitens* e sua transmissão transovariana em carrapatos coletados de equinos mantidos em áreas de surto.

No Brasil, Pfeifer-Barbosa et al. (1992), Linhares (1994), Pfeifer-Barbosa et al. (1995), Battsetseg et al. (2001) e Mujica (2002) observaram formas em multiplicação de *B. caballi* em ovários e ovos de *D. nitens*, demonstrando a transmissão transovariana deste agente nesta espécie de carrapato (MUJICA, 2002).

Estudos mostram a distribuição deste carrapato pela região sudeste do país, demonstrando que o mesmo realiza mais de uma geração por ano (SOUZA; SERRA-FREIRE, 1992; SOUZA; SERRA-FREIRE, 1994; BORGES et al., 1999; BORGES et al., 2000; LABRUNA et al., 2002). A espécie *D. nitens* é caracterizada como um carrapato monoxeno, sendo estimado, em média, 63 dias para a realização do seu ciclo biológico sob condições de laboratório (SANAVRIA; PRATA, 1996). Vale destacar que seu comportamento, na fase parasitária, tem predileção por infestar a face interna da orelha dos equídeos (FALCE, 1986; BORGES et al., 2000) e também o divertículo nasal (BORGES; LEITE, 1993). Este comportamento é importante sob a questão relacionada ao tratamento dos animais.

Battsetseg et al. (2002) detectaram, através da PCR, *T. equi* e *B. caballi* em ovos e larvas de *R. microplus* sugerindo a possibilidade de transmissão dos dois agentes por esta espécie de carrapato.

Segundo Heim et al. (2007), a transmissão de hemoparasitos geralmente está influenciada pela dinâmica de populações de vetores, devido as condições climáticas. Segundo Bastos et al. (1996), a temperatura de 18°C possui efeito deletério sobre a biologia de *D. nitens* e o potencial biótico deste ixodídeo é severamente afetado dificultando a sua dispersão ou manutenção em equinos.

A infecção por *B. caballi* pode persistir no equino, por um período de 1 a 4 anos (HOURRIGAN; KNOWLES, 1979 apud RUEGG et al. 2008; DE WAAL; VAN HEERDEN, 1994 apud RUEGG et al. 2008). Esta relação entre a idade dos animais e a infecção por estes hemoparasitos foram bem demonstrados pelos estudos de Ruegg et al. (2007) e Ruegg et al. (2008). Estes autores observaram, através de estudos epidemiológicos, a interação entre a infecção dos equinos por *Theileria equi* e *B. caballi* de acordo com a faixa etária destes animais. Ruegg et al. (2007) a partir de modelos matemáticos propuseram que a dinâmica da infecção por *B. caballi* diminuía de acordo com o aumento da idade. Esta observação, comum entre todos estes estudos, pode estar atrelada à premissa de que a prevalência observada dos hemoparasitas é consequência também da relação entre a carga parasitária inoculada nos animais por parte dos vetores e a taxa de sua eliminação do animal vertebrado, associada a um sistema imune competente presente nestes animais.

Além da transmissão através da picada de carrapatos, outras formas de transmissão das Piroplasmoses equina também têm sido demonstradas, tendo sido relatada a transmissão transplacentária de éguas positiva a seus potros, possivelmente através da passagem de eritrócitos infectados da mãe ao feto através da barreira placentária (RONCATI, 2006;

ALLSOPP et al., 2007; SANTOS et al., 2008; GEORGES et al., 2011). Vale registro que nem todo potro de égua positiva nasce contaminado, mas quando isto ocorre pode haver manifestação de grave doença clínica no recém-nascido que pode conduzir ao óbito (ALLSOPP et al., 2007; GEORGES et al., 2011).

Outra forma de transmissão destes agentes é por via iatrogênica através da reutilização de agulhas e seringas contaminadas com sangue de animais positivos, levando à dispersão da doença pelo rebanho. Tal fato foi observado em um surto de Piroplamose equina, ocorrido em 2008, no estado da Flórida, Estados Unidos (GEORGES et al., 2012). Não existe comprovação científica que dípteros hematófagos possuam a capacidade de transmissão mecânica do sangue contaminado (PHIPPS; OTTER, 2004), mas tal fato não deverá ser desconsiderado (GERSTENBERG et al., 1998).

2.7 Epidemiologia

A *T. equi* tem distribuição mundial (DE WALL, 1992), sendo endêmica em muitas regiões tropicais e subtropicais, com distribuição se prolongando até as regiões central e norte da Rússia e ao norte da França na Europa (TENTER; FRIEDHOFF, 1986). As áreas endêmicas incluem muitas partes da Europa, América Central e do Sul, África e Ásia (exceto o Japão), com a relação de países considerados não endêmicos incluindo os Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, países do Norte da Europa, Irlanda, Singapura, Japão, Nova Zelândia e Austrália (ROTHSCHILD, 2013). Os países com alto risco de exposição aos hemoparasitas devido ao alto movimento internacional de equídeos incluem Canadá, Estados Unidos, Austrália, Nova Zelândia e Japão (BRÜNING, 1996).

Em áreas endêmicas, a maioria dos equinos após passarem pela doença clínica recupera-se, tornando-se subclínica, passando a ser portadores assintomáticos de *T. equi* e carreadores do hemoparasita por toda sua vida (DE WALL, 1992; ZOBBA et al., 2008). Tais equinos têm um delicado equilíbrio entre a sua imunidade e o parasita. Uma quebra nesta relação, advinda de imunossupressões geradas por estresses, exercícios e fadiga extremas, pode gerar doença clínica nestes animais (HAILAT et al., 1997). Assim, equinos portadores assintomáticos devem ser monitorados sorologicamente, pois desempenham papel crucial na dispersão da doença, sendo considerados um risco para a introdução da doença em áreas não endêmicas ou consideradas livres (ZOBBA et al., 2008). No caso da *B. caballi*, os cavalos infectados podem, de maneira espontânea, ficar livres da infecção após 12 a 48 meses do contato inicial.

Por ser transmitida principalmente por carrapatos, a ocorrência e prevalência das Piroplasmoses equinas estão diretamente ligadas à presença e à distribuição geográfica de seus carrapatos vetores (PFEIFER BARBOSA et al., 1995), assim como ao clima e manejo dos animais (KERBER et al., 2009). Desta forma, estudos epidemiológicos em diferentes regiões do mundo apresentam grandes diferenças de resultados, visto que as doenças transmitidas por carrapatos tem uma rede epidemiológica complexa, envolvendo hospedeiros vertebrados e invertebrados num meio ambiente diverso e em constante mudança. Tal fato, além de tornar difícil seu controle, aparentemente ainda tem facilitado a expansão destas doenças nos últimos anos (DANTAS-TORRES, 2012).

No caso da *T. equi*, isto foi comprovado pelo recente surto da doença ocorrido nos EUA, país até então considerado livre da doença pela Organização Internacional de Epizootias (OIE), que acometeu mais de 290 equinos ocasionando prevalência de 100% em algumas fazendas durante o ano de 2009 (SCOLES et al., 2011).

Na Europa, a infecção por *B. caballi* foi descrita na França, Espanha, Portugal, Bélgica e Itália, sendo considerada endêmica no sudeste Europeu, apresentando soroprevalência com

elevada variação entre os países e as regiões estudadas (CORDERO del CAMPILLO et al., 1974; SCHEIN, 1988; DE WAAL, 1992).

Na África, a infecção se apresenta de elevada endemicidade, com destaque da presença destes agentes em países como África do Sul, Moçambique, Angola, Namíbia e Marrocos, dentre outros países (NEITZ, 1956).

Da mesma forma, no continente Asiático as infecções causadas por estes hemoparasitos foram reportadas na China e na Mongólia (FRIEDHOFF; SOULÉ, 1996; XU et al, 2003; BOLDBAATAR et al, 2005). Embora o Japão seja considerado livre da doença (FRIEDHOFF; SOULÉ, 1996), estudos indicaram a possibilidade da circulação de *B. caballi* no plantel do país (IKADAI et al, 2002).

Em relação ao continente americano, especificamente nos países da América Latina, exceto as regiões Sul do Chile e Argentina, a babesiose se manifesta de forma enzoótica (FRIEDHOFF et al., 1990). Os Estados Unidos e o Canadá são considerados livres de *B. caballi*, com exceção do estado da Flórida.

2.7.1 Estudos de prevalência no exterior

Na região sudeste da Mongólia tem sido relatado soroprevalências de 78,8% para *T. equi* em soros de equinos testados através de RIFI (RÜEGG et al., 2007). Ainda na Mongólia, estudo avaliando o envolvimento de *T. equi* e *B. caballi* na mortalidade de cavalos Przewalski reintroduzidos na natureza, oriundos de regiões indenes de babesiose equina, verificou-se uma soroprevalência de 88,6% para *T. equi* em equinos domésticos que viviam na vizinhança do local onde os Przewalski foram reintroduzidos (RÜEGG et al., 2006).

Na Turquia, pesquisa realizada com ELISA competitivo revelou soroprevalência de 16,2% ao se analisarem amostras de populações de equinos de corrida e de fazendas de criação. Além disso, verificou-se soroprevalência significativamente maior em equinos que participam de circuitos de corridas, alertando para a relevância da doença no trânsito de equinos em competições internacionais (SEVINC et al., 2008).

Em Omã verificou-se alta prevalência de *T. equi*, através de RIFI em duas séries de exames com intervalos de dois anos, com 94,6% e 97,7% de positividade, respectivamente (DONNELLY et al., 1980).

No Sudão, um primeiro estudo sorológico baseado em ELISA avaliando a prevalência de *T. equi* em diferentes regiões e climas do país, concluiu que a hemoparasitose é endêmica. O estudo encontrou prevalência variando de 39% a 100% para *T. equi* nas diferentes regiões estudadas, com prevalência média de 63,5%, (SALIM et al, 2008).

Na África do Sul, foi detectado prevalência de 73% em amostras de equinos de fazendas do norte da Província do Cabo, através de exames de PCR (BHOORA et al., 2010).

Na França, amplo estudo avaliando 18.845 amostras de soro de equinos de todas as regiões do país, através da reação de fixação de complemento (RFC), verificou uma prevalência de 5,35% para *T. equi* (SOULE et al., 1990).

Na Suíça o primeiro relato de estudo em larga escala sobre soroprevalência de Piroplasmose equina no rebanho do país, analisando um total de 689 animais, apontou prevalência de 7,3% para Piroplasmoses equinas, sendo 50 animais (4,4%) positivos para *T. equi* somente, e trinta (1,5%) para *B. caballi*, com trinta equinos (1,5%) positivos para ambas as espécies (SIGG et al., 2010).

Na Itália, sorologia baseada em RIFI realizada em 412 amostras de soros equinos do centro e norte do país revelou prevalência de Piroplasmoses equinas de 68,4%; sendo que 50,5% dos equinos foram positivos para *T. equi*, com 12,4% positivos somente para *T. equi* e 38,1% positivos para ambos parasitas (*T. equi* e *B. caballi*). Tal soroprevalência encontrada foi num grau maior que em estudos anteriores, indicando uma tendência de incremento na

soropositividade por maior exposição aos hemoparasitas. Tal fato pode estar relacionado ao aumento na distribuição espacial dos carrapatos vetores, bem como extensão dos seus períodos de atividade, provavelmente influenciado pelas recentes mudanças climáticas nas últimas décadas, que tem aumentado as chances de transmissão de tais hemoparasitas no país (MORETTI et al, 2010). Tal estudo também detectou uma variação nas espécies de hemoparasitas detectadas nos equinos de acordo com a região geográfica, relacionando tal fato à presença maior ou menor do respectivo carrapato vetor na área.

Ainda na Itália, Grandi et al. (2011), em estudo de soroprevalência na região norte da Itália, baseado em RIFI, observaram prevalência de 8,2% positivos para *T. equi*. Tal prevalência foi menor que a encontrada por Moretti et al. (2010), pois os animais estudados por este eram provenientes de regiões de planície, enquanto os estudados por Grandi et al. (2011) habitavam terrenos montanhosos mais elevados do norte da Itália. Assim há sugestão da influência da altitude e clima na diferença de prevalência observada entre os estudos.

Na República da Coreia, estudo analisando 184 amostras de soro, através de ELISA competitivo, encontrou prevalência de 1,1% para *T. equi*. A acurácia do teste de ELISA foi confirmada por PCR positivo para *T. equi* nas amostras detectadas na sorologia. Esta foi a primeira detecção de piroplasmose equina em animais oriundos da Coreia (SEO et al., 2011).

No Japão, estudo sorológico em 2.019 amostras coletadas provenientes de todas as áreas do país, detectou através de ELISA 2,2% dos animais positivos para *T. equi*. Tal estudo sugeriu a existência de Piroplasmoses equinas no Japão, visto o país possuir carrapatos que são vetores competentes dos dois hemoparasitas (IKADAI et al., 2002).

Na China, estudo com 70 amostras de soro equino oriundos da Província de Xinjiang, testados pela ELISA verificou sororeatividade em 40% das amostras para *T. equi*, demonstrando que tal hemoparasita está distribuído amplamente em tal região chinesa (XUAN et al., 2002).

No Estado de Lara, região centro-ocidental da Venezuela, em estudo de amostras de soro de 360 equinos de nove municípios do Estado, foi encontrada soroprevalência de 70,6% (254 cavalos positivos) para *B. caballi*, 50,3% (181 cavalos positivos) para *T. equi*, e 35,56% (128 equinos positivos) para ambos parasitas, concluindo que a região é enzoótica para as Piroplasmoses equinas (MUJICA et al., 2011). Ainda na Venezuela, Rosales et al. (2013) pesquisaram a presença de *T. equi* e *B. caballi* em amostras de soro de 694 equinos de seis estados, através de ELISA, identificando uma soroprevalência de 50,2% para a piroplasmose, e em amostras de 136 animais, através da PCR, identificando 66,2% positivos para os agentes.

Na Colômbia, na Província de Córdoba, foi observada prevalência de *T. equi* em 94% entre os 83 equídeos, de 13 diferentes fazendas da região, testados por RFC (TENTER et al., 1988).

No Chile, estudo avaliando 912 amostras de soros de cavalos de corrida da Província de Santiago, através de RFC, obteve positividade em 48 equinos, resultando numa prevalência de 5,3% (URCELAY et al., 1973).

Na Argentina (AGUIRRE et al., 2004), relatou dois casos de óbitos diagnosticados por PCR para *T. equi* em um caso e *B. caballi* no outro, com envolvimento do carrapato *Dermacentor nitens* encontrado fixado ao corpo da égua do segundo óbito, sendo o primeiro relato da presença dessa espécie vetora em uma área subtropical da Argentina, podendo ser interpretado como um resultado de dispersão relativamente recente, sendo que o último relato de presença do *D. nitens* ocorreu dezoito anos antes em localidade distante 115 km ao norte (MANGOLD et al., 1986).

2.7.2 Estudos de prevalência no Brasil

Estudos epidemiológicos em diferentes regiões e microclimas do Brasil têm mostrado resultados interessantes sobre o status da doença nos diversos rebanhos. A soroprevalência tem variado com a localização geográfica, clima e manejo dos equídeos, visto que tais fatores influem no ciclo e distribuição dos vetores. Em relação à presença destes agentes no Brasil, o primeiro relato foi obtido a partir de dados clínicos e laboratoriais, realizado por Costa e Melo (1963) em equinos no Rio de Janeiro. Posteriormente, relatos clínicos de *B. caballi* foram realizados por Lima et al. (1976) em Minas Gerais, e Rocha et al. (1988) em Pernambuco.

Ainda no Brasil, diversos estudos foram conduzidos para avaliar a soroprevalência na região centro-oeste do país (LINHARES et al., 1997), e também em outros estados da federação, como São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Pará e Bahia (KERBER et al., 1999; RIBEIRO et al., 1995; PFEIFER-BARBOSA et al., 1995; PFEIFER-BARBOSA et al., 2000; LEAL et al., 2011).

De um modo geral, em nosso país tem sido observado um declínio da soroprevalência de *B. caballi* de norte a sul do país, haja vista que o vetor desta, o carrapato *D. nitens*, é adaptado a ambientes tropicais e sua ocorrência diminui do norte para o sul do país. Para *T. equi*, que tem tido sua transmissão associada ao carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, tem se observado soroprevalência indicando uma distribuição mais errática (HEUCHERT et al., 1999). Tal fato provavelmente é devido à influência climática, tipo de manejo, existência ou não de contato com gado e atividade pecuária, adoção ou não de controle estratégico de Ixodídeos e, conseqüentemente, à prevalência do vetor na área ocupada pelo rebanho equino estudado.

Pesquisa de soroprevalência baseada em RFC conduzida com equinos da raça Puro Sangue Inglês (PSI) de 12 pequenos estabelecimentos equestres dos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná e Rio Grande do Sul, encontrou uma prevalência média de 18,1% para antígenos de *T. equi*, 1,5% para *B. caballi* e 6,0% para infecção mista (DA COSTA PEREIRA et al., 2004).

Na região Serrana do Rio de Janeiro, em grandes estabelecimentos equestres de cavalos PSI, com idade entre quatro a seis anos, foi encontrada média de soroprevalência de 21% para *T. equi*, baseado na RFC (DA COSTA PEREIRA et al., 2005). Na microrregião do município de Nova Friburgo, baseado em RFC, verificou-se uma prevalência média de 5,5%, variando de zero a 20% nos diferentes estabelecimentos equestres (DA COSTA PEREIRA et al., 2007).

Uma comparação de soroprevalência entre a região Serrana do Rio de Janeiro e a região de Itaguaí demonstrou soroprevalência para *T. equi* significativamente maior na região de Itaguaí (85,43%) do que na região Serrana do Estado (76,92%). Além da área geográfica, fatores como idade, sistema de criação, atividade do equino na fazenda e grau de infestação por carrapatos mostraram associação com a infecção por *T. equi* (SANTOS et al., 2011).

Henriques (2006) estudou o rebanho equino da Academia Militar das Agulhas Negras, em Resende, estado do Rio de Janeiro, examinando 178 amostras através da RIFI e encontrou uma soroprevalência de 85,95%, concluindo ser a área endêmica para *T. equi* e que os 16 animais da raça Bretão, integrantes do plantel, apresentaram soropositividade significativamente menor, de 25%, sendo que os mesmos não tinham sua origem na Coudelaria do Rincão no estado do Rio Grande do Sul.

Salvagni et al. (2010) examinaram 20 equinos de uso militar no Regimento de Cavalaria dos Dragões da Independência, em Brasília, Distrito Federal, com sinais clínicos indicativos de Anaplomose, e encontraram soroprevalência, através do ELISA, de 95,00% para *T. equi*, e 45% de positividade através da PCR, sendo que a maioria do rebanho de equinos tinha sua origem na Coudelaria do Rincão.

Heim et al. (2007) coletaram 487 amostras de soro de equinos de diferentes origens em abatedouro localizado em Araguari, estado de Minas Gerais, com sororeatividade em 91% das amostras para *T. equi* através de RIFI. Os equinos amostrados eram oriundos de diferentes municípios dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Bahia, desta forma evidenciando a grande dispersão e endemicidade da *T. equi* em vários estados do Brasil.

Estudo de soroprevalência no estado de São Paulo encontrou prevalência de 49,2% para *T. equi*, em éguas, e prevalência de 36% em potros aos 10 meses de idade (HEUCHERT et al., 1999). Na microrregião de Jaboticabal, estado de São Paulo, estudo de 170 amostras verificou 100% de sororeatividade através de RIFI para *T. equi*, indicando que esta hemoparasitose encontra-se amplamente distribuída na região (BALDANI et al., 2010).

Kerber et al. (2009) analisaram 582 amostras de soros de equinos provenientes de 40 diferentes fazendas de criação do estado de São Paulo que foram testados por ELISA competitivo, resultando em soropositividade de 26,6% para *T. equi*.

Estudo conduzido em 180 animais PSI do Jóquei Clube de São Paulo relatou soroprevalência de 6,66% para *T. equi* (12 animais positivos), 22,3% para *B. caballi* (40 positivos) e 6,66% para ambos hemoparasitos (12 positivos), totalizando 35,5% (64 positivos) para as Piroplosomoses equinas. Esse estudo observou que a maioria dos animais positivos tinha entre dois e três anos de idade, havendo chegado recentemente ao Jóquei Clube (PIOTTO, 2009).

Em Santa Catarina, na região do Planalto Catarinense, foi observada soroprevalência de 50,38% (200 animais positivos de 397 analisados) para *T. equi*, sendo o único ixodídeo detectado parasitando os equinos naquela região o *R. (B.) microplus*, sugerindo que tal carrapato pode estar envolvido na epidemiologia e transmissão da Theileriose equina na região (SOUZA et al., 2000).

Na região norte do estado do Rio Grande do Sul, Golynski et al. (2008) realizaram estudo soropidemiológico para *T. equi* e encontraram prevalência de 31,6% e 35,8%, respectivamente através de ELISA e RIFI.

No Jóquei Clube de Pelotas e em dois haras da zona sul do estado do Rio Grande do Sul, foram examinados 133 animais, dos quais 57,9% apresentaram-se sorologicamente positivos para *T. equi* pela RIFI (CUNHA et al., 1996).

Na região da Campanha, sul do estado do Rio Grande do Sul, municípios de Bagé e Dom Pedrito, Torres et al. (2012) realizaram um estudo com o objetivo de relacionar a incidência da Theileriose com a convivência dos equinos com bovinos e a infestação por *R. B. microplus* nos cavalos de duas propriedades distintas e encontrou sorologia (RIFI) positiva de 40% naqueles que não conviviam com o gado, enquanto os que estavam em contato direto, a sorologia positiva foi de 90,9%. Somente foram encontrados carrapatos nos equinos que são criados em conjunto com bovinos, sugerindo que o equino represente um hospedeiro alternativo para o *R. B. microplus* e ficou também evidenciado o potencial dessa espécie de carrapato na transmissão de *T. equi* em equinos.

Ainda no Rio Grande do Sul, Nizoli et al. (2008), realizaram um levantamento sobre Theileriose equina em uma propriedade da região sul do estado, encontrando positividade de 22% e 15%, pelas técnicas de RIFI e nPCR respectivamente.

Conforme exposto, tanto em outros países como no Brasil, as soroprevalências para *T. equi* e *B. caballi* apresentam prevalência bastante variável. Diversos fatores podem influenciar na epidemiologia destas hemoparasitoses, dentre os quais a presença de carrapatos, o grau de infestação e dispersão geográfica dos vetores, o clima, a altitude, as condições de manejo e o tipo de criação, dentre outros. Além disso, os diferentes testes utilizados nos estudos soropidemiológicos (RFC, RIFI e ELISA) também podem influenciar nas diferentes soroprevalências encontradas.

2.8 Manifestações Clínicas, Laboratoriais e Anatomopatológicas

As manifestações clínicas em animais afetados pela *T. equi* podem variar de acordo com a cepa do hemoparasita e a susceptibilidade do animal, podendo a sintomatologia ser inespecífica, o que dificulta o diagnóstico clínico. Deve ser levado em consideração o histórico do equino, envolvendo trânsito recente, status da doença na região e a presença de carrapatos vetores no rebanho (BRÜNING, 1996).

O período de incubação da *T. equi* varia de 12 a 19 dias (DE WALL, 1992), ocasionando uma doença que pode ser hiperaguda, aguda, subaguda ou crônica, em geral caracterizada por febre de natureza intermitente, anemia, icterícia, hepato e esplenomegalia. Bilirrubinúria e hemoglobínúria podem estar presentes durante os estágios mais tardios da doença, sendo a infecção intrauterina de fetos uma séria complicação, podendo levar a abortos (DE WALL, 1992).

A maioria dos animais soropositivos são portadores assintomáticos com baixos níveis de parasitismo, não manifestando sintomatologia óbvia (ROTHSCHILD, 2013), com tais equinos, quando submetidos a treinamentos atléticos ou trabalhos pesados, podendo demonstrar queda de desempenho e baixo rendimento (DA COSTA PEREIRA et al., 2007). Em um estudo de Botteon et al. (2005) verificou-se que essa queixa antecedeu um quadro clínico de babesiose, sendo que o quadro de queda de desempenho nem sempre é identificado como um problema que deve ser corretamente diagnosticado e tratado. Na prática corrente no meio equestre, via de regra, os animais são submetidos a tratamentos com drogas babesicidas a qualquer sinal de queda de desempenho, mesmo que o diagnóstico final não tenha sido realizado.

A doença na forma hiperaguda ocorre em potros recém-nascidos que se infectaram ainda no útero, via transplacentária (GEORGES et al., 2011); assim como em equinos adultos oriundos de áreas indenes introduzidos em regiões enzoóticas com grande infestação de carrapatos vetores (DE WALL, 1992); e em animais portadores, com doença subclínica, expostos à estresse de exercícios físicos intensos (HAILAT et al., 1997).

Durante a infecção hiperaguda por *T. equi*, há intensa replicação e lise dos eritrócitos, o que pode levar os animais a óbito por anemia. Os equinos podem ter sinais inespecíficos e serem encontrados mortos ou morrendo (ROTHSCHILD, 2013), com a letalidade da doença em equinos adultos de regiões indenes, sem imunidade, introduzidos em regiões endêmicas podendo chegar a mais de 50% (ROTHSCHILD, 2013).

Potros que nascem contaminados demonstram anemia, icterícia, febre, petéquias nas mucosas e hemoglobínúria, além de letargia que pode evoluir para incapacidade em ficar de pé e de mamar. Alguns potros podem parecer normais ao nascer e desenvolverem doença após 2 a 3 dias (DE WALL, 1992). Relato de caso de potro nascido infectado evidenciou, como principal sinal clínico, uma severa anemia e icterícia, sintoma que pode ser confundido com isoeritrólise em recém-nascidos. Laboratorialmente foi observada hemoglobínúria, hiperbilirrubinemia, bilirrubinúria, baixa contagem de eritrócitos e hematócrito, trombocitopenia, linfopenia e alta parasitemia ao exame de esfregaço sanguíneo, com 63% das hemácias parasitadas (GEORGES et al., 2011).

A doença aguda é caracterizada por febre (maior que 40°C) acompanhada de sudorese, hiporexia ou anorexia, desidratação, letargia, elevação da frequência respiratória e frequência cardíaca, congestão de mucosas, taquicardia e sons cardíacos alterados, anemia podendo, em casos intensos, apresentar hemoglobínúria e bilirrubinúria, culminando com o óbito do equino (DE WALL, 1992; ROTHSCHILD, 2013). A pneumonia pode ser uma complicação advinda do edema e inflamação pulmonar, com o envolvimento do trato digestivo podendo ocorrer em casos terminais, com sinais de cólica, devido à deposição de bilirrubina nas serosas e peritônio, com impactação seguida de diarreia e enterite catarral. Em casos severos, a

inflamação das membranas mucosas e vasos sanguíneos ocorre em vários órgãos, levando a uma variedade de manifestações atípicas, incluindo insuficiência renal e hepática (ROTHSCHILD, 2013). Complicações cardíacas, com danos ao miocárdio e arritmias, tem sido associadas a casos agudos de Theileriose equina (DIANA et al., 2007).

Casos subagudos mostram vários graus de anorexia, perda de peso, temperatura normal ou elevada, febre intermitente, edema nas porções distais dos membros, esplenomegalia, aumento no pulso e frequência respiratória, anemia normocítica e normocrômica. As mucosas apresentam-se com colorações róseas pálidas ou amarelas pálidas a amarela brilhante, sendo possível observar petéquias ou equimoses em alguns casos. Em casos negligenciados a anemia torna-se intensa, com os animais podendo evoluir para o óbito. Alguns animais podem desenvolver dor abdominal e quadros de Síndrome Cólica Equina intermitentes. A urina apresenta coloração amarelo escura, laranja, marrom e, em alguns casos, castanho avermelhada, como resultado dos pigmentos de bile e hemoglobina resultantes da eritrólise. Esplenomegalia é típico de casos subagudos, podendo ser detectada por palpação retal (DE WALL, 1992; ROTHSCHILD, 2013).

Casos crônicos tem um histórico de sinais clínicos muito inespecíficos como inapetência, baixo desempenho atlético, perda de peso e baixo escore corporal, sendo que a anemia é mínima (DE WALL, 1992). Garanhões podem ter perda parcial ou completa da fertilidade, com éguas prenhes podendo abortar (DE WALL, 1992). Os sinais clínicos, nestes casos crônicos, são similares a outros processos inflamatórios crônicos ou a sintomatologia de animais com anemia infecciosa equina (ROTHSCHILD, 2013). Na doença crônica a parasitemia é baixa, sendo a principal manifestação a anemia que, ainda que discreta, leva à diminuição do desempenho atlético dos animais. Em animais submetidos à imunossupressão, seja por restrição alimentar ou uso de corticosteróides, a doença pode ser reagudizada com os equinos podendo apresentar diferentes graus de anemia, com agravamento dos sinais clínicos (NOGUEIRA et al., 2005).

Os animais imunocompetentes e que sobrevivem à infecção aguda tornam-se portadores assintomáticos e serão carreadores da *T. equi* (RONCATI, 2006). Esses animais estarão protegidos da doença intensa em função da produção de anticorpos por parte do sistema imune que está continuamente sendo estimulado pelos parasitas remanescentes (KNOWLES et al., 1994). Animais infectados por *T. equi* persistem infectados por anos, provavelmente durante toda vida, enquanto infecções por *B. caballii* não são persistentes, sendo pouco estáveis. A doença torna-se crônica devido à fraca imunidade natural do hospedeiro que se deve à adaptação do parasito às defesas naturais, ou seja, sua capacidade de evasão da resposta imune através da variação de seus antígenos de superfícies (NIZOLI, 2005).

A produção de anticorpos é idade dependente, com os equinos passando a apresentar uma resposta sorológica mais rápida, com títulos mais altos e por um período de tempo maior a medida que os animais tornam-se mais velhos (REHBEIN; HEIDRICH-JOSWING, 1983). Apesar destes protozoários estimularem tanto a imunidade inata quanto a adquirida, os mecanismos de imunidade inata contra estes agentes ainda não estão bem definidos (ABBAS et al., 2008).

Os principais achados laboratoriais da Theileriose equina são redução na contagem de eritrócitos, plaquetas e concentração de hemoglobina, sendo neutropenia e linfopenia característicos de infecções agudas. Decréscimo no fibrinogênio plasmático e elevação da bilirrubina, assim como vários graus de hemoglobinúria e bilirubinúria podem ser observados, dependendo do estágio da doença (DE WALL, 1992).

Como principais achados de necropsia observa-se anemia e icterícia, edema de subcutâneo e subserosas com vários graus de emaciação; hepato e esplenomegalia; rins aumentados de tamanho e de coloração castanho-avermelhado; ascite; hidrotórax e

hidropericárdio; hemorragias no epicárdio e endocárdio; aumento dos linfonodos; e congestão e edema de pulmões (DE WALL, 1992); além de enterite catarral em alguns casos (ROTHSCHILD, 2013).

2.9 Diagnóstico

2.9.1 Parasitológico

A detecção de *T. equi* e *B. caballi* através da visualização dos hemoparasitas em esfregaços sanguíneos é uma das formas mais específicas e práticas de diagnóstico, podendo os hemoparasitas ser demonstrados através de coloração dos esfregaços, preferencialmente, com solução de Giemsa a 10%. Casos agudos de *T. equi* podem apresentar mais de 20% das hemácias parasitadas, com os trofozoítos assumindo uma variedade de formas (oval, arredondado, elíptico) maiores que 3 µm de diâmetro. Nesta espécie os merozoítos são piriformes, com cerca de 1,5 µm de comprimento, podendo aparecer em tétrades e apresentando-se no típico formato de “cruz de malta” no interior do eritrócito (DE WALL, 1992). A *B. caballi* pode assumir um formato maior, sendo o diagnóstico do hemoparasita nos esfregaços possível, principalmente na fase aguda da doença, quando há alta proporção de hemácias parasitadas. Em ambas as hemoparasitoses, animais portadores assintomáticos possuem baixo número de hemoparasitas circulantes, ocasionando decréscimo na sensibilidade do exame de esfregaço (ROTHSCHILD, 2013).

2.9.2 Sorológico

A Reação de Fixação de Complemento (RFC) foi desenvolvida em 1945, sendo aceita como teste oficial para babesiose equina pelo Departamento de Agricultura Americano em 1969. Posteriormente aceito como teste oficial pela OIE, passou a ser utilizada no mundo todo. Entretanto, ao longo dos anos ficou provado que a RFC não detectava infecções latentes e casos crônicos, podendo dar resultados falso-positivos assim como reações cruzadas, além de diversos outros problemas técnicos, não devendo ser considerado o teste “padrão ouro” para o diagnóstico das Piroplasmoses equinas (BRÜNING, 1996).

Considera-se que o teste “padrão ouro” para o diagnóstico das Piroplasmoses equinas deve ser um teste que seja: (1) sensível a ponto de detectar infecções recentes, infecções agudas, e infecções latentes de portadores assintomáticos; (2) específico para a diferenciação entre os dois hemoparasitas; e (3) econômico no que se refere ao gasto de material e de tempo na sua realização. Assim, a RFC não preenche tais critérios, pela inespecificidade, baixa sensibilidade e gastos com materiais. A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) tem sensibilidade e especificidade altas, mas não pode ser considerada econômica como teste de rotina. O mesmo se aplica ao *Western blotting*. O ELISA é uma alternativa, sendo um candidato ao preenchimento destes requisitos, tornando-se o “padrão ouro” (BRUNING, 1996).

Nos Estados Unidos foi desenvolvido um ELISA competitivo usando EMA-1 e anticorpos monoclonais específicos. A EMA-1 é uma proteína de superfície do estágio eritrocitário da *T. equi* que possui um epitopo que é imunodominante e conservado no mundo todo. Tal teste foi superior à RFC ao detectar infecções latentes não detectadas por este. Em 2004 a OIE aprovou este teste para *T. equi* e *B. caballi*, sendo o teste recomendado para trânsito internacional de equinos. Tal teste também é o exame que regula a entrada de equinos nos Estados Unidos (ROTHSCHILD, 2013). Atualmente, a Organização Internacional de Epizootias (OIE) recomenda como testes oficiais para trânsito internacional de equídeos a RIFI e o ELISA (OIE, 2013).

Em estudo comparativo entre os testes de RFC, RIFI e ELISA para detecção de anticorpos anti - *T. equi*, verificou-se que RIFI e ELISA detectaram soropositividade em 76% dos equinos testados, enquanto a RFC em somente 61%, havendo infecções latentes não detectadas por este, gerando falsos negativos. O teste de ELISA foi comparado com a RIFI, observando-se uma concordância de 83,5%, sugerindo que ambos os testes podem ser indicados para a realização de estudos soropidemiológicos. Os resultados obtidos pela RFC demonstraram baixa sensibilidade em relação à RIFI e ao ELISA (SANTOS et al. 2009).

Santos et al. (2009) ainda salientam que as desvantagens da RIFI em relação ao ELISA é o fato do antígeno ser preparado à partir de esfregaços sanguíneos com percentual variado de eritrócitos infectados. Ademais a produção e a disponibilidade deste antígeno em particular constitui um dos maiores entraves deste método de diagnóstico. Além disso, a RIFI é um teste subjetivo em que a experiência do observador é necessária para diferenciar entre reações fracamente positivas e negativas, resultando no aparecimento de amostras falso-positivas.

O teste de ELISA, por sua vez, é realizado utilizando uma quantidade conhecida e determinada de antígeno, permitindo, assim, melhor padronização do ensaio. Aliado a isso está o fato de que no ELISA vários epitopos antigênicos são expostos pela ruptura do parasito durante a preparação do antígeno, ao contrário da RIFI em que os anticorpos interagem preferencialmente com antígenos de superfície (SANTOS et al. 2009). O ELISA também tem a vantagem de processar um grande número de amostras e ter uma leitura automatizada, o que evita a subjetividade da RIFI.

Baldani et al. (2004) desenvolveram um ELISA baseado em antígeno bruto de *T. equi* oriunda de cepas nacionais visando a detecção de equinos portadores crônicos assintomáticos, obtendo excelente resultado com 100% de sensibilidade e especificidade. Assim, indicando o ELISA como teste passível de utilização no diagnóstico sorológico da hemoparasitose, bem como teste apropriado à estudos epidemiológicos em áreas endêmicas. Além disso, estes autores enfatizam que o uso de cepas brasileiras evita a possibilidade de diferenças antigênicas existentes entre isolados de diferentes regiões, que poderiam interferir nos resultados.

Assim, temos que o diagnóstico das Piroplasmoses equinas pode ser realizado através de métodos diretos e indiretos (POTGIETER et al., 1992), dentre os quais se destacam a pesquisa parasitológica direta, realizada por meio de esfregaços sanguíneos, a reação em cadeia da polimerase (PCR) (McLAUGHLIN et al., 1992), o cultivo *in vitro* do parasito e os métodos sorológicos, tais como o ensaio imunoenzimático (ELISA), a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e a reação de fixação do complemento (RFC).

É digno de nota que todos esses testes apresentam vantagens e desvantagens, as quais devem ser cuidadosamente avaliadas. Quanto as técnicas sorológicas, estas são de larga aplicação em estudos de levantamento epidemiológico devido sua alta sensibilidade, desta forma detectando infecções subclínicas ou crônicas com eficácia superior àquela obtida através dos exames diretos em esfregaços sanguíneos. O primeiro teste sorológico aplicado para detecção de anticorpos anti-*Babesia* em equinos foi a RFC (HIRATO et al., 1945) que em 1969 foi considerado o teste oficial para o diagnóstico das Piroplasmoses equinas. Posteriormente, a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) determinou que a RIFI ou mesmo o ELISA pudessem ser utilizados em substituição a RFC, pois este teste não detecta infecções crônicas, podendo apresentar resultados falso-negativos (FRIEDHOFF; SOULÉ 1996; IKADAI et al. 2002).

2.9.3 Molecular

A detecção do DNA do hemoparásita usando a reação de cadeia da polimerase (PCR) é atualmente o teste mais sensível, sendo o teste ideal para a detecção de equinos portadores

assintomáticos (RAMPERSAD et al., 2003). O teste de reação da cadeia da polimerase em tempo real (q-PCR), como ferramenta molecular de alta especificidade e sensibilidade, também tem sido satisfatoriamente utilizado em estudos epidemiológicos (PECKLE et al., 2013).

O método utilizando a PCR tem sido utilizado para detectar as Piroplasmoses equinas (BASHIRUDDIN et al., 1999; MACHADO et al., 2012; BAPTISTA et al., 2013; ROSALES et al., 2013). A sensibilidade da reação de PCR é mais elevada quando comparada a exame microscópico de esfregaços sanguíneos (RAMPERSAD et al., 2003; ALHASSAN et al., 2007). O diagnóstico pela PCR possui a sensibilidade para detectar o DNA do parasita em 2,5µl de uma amostra de sangue com 0,000001% de parasitemia (ALHASSAN et al., 2007; XUAN et al., 2001). Entretanto, equinos portadores de *T. equi* não são consistentemente diagnosticados em amostras de sangue, como foi demonstrado por Ribeiro et al. (2013) ao testar 25 equinos negativos pelo método da PCR em amostras de sangue total, sendo que ao utilizar amostras de punção esplênica, cinco (20%) apresentaram resultado positivo.

Além disso, vários estudos demonstram elevadas soroprevalências em testes sorológicos quando comparados a prevalência pela PCR (MACHADO et al., 2012; BAPTISTA et al., 2013; MUNKHJARGAL et al., 2013), sugerindo uma maior sensibilidade dos métodos sorológicos que os de detecção molecular. Uma considerável diferença entre os dois métodos foi demonstrada em pesquisa realizada em cavalos da Jordânia, quando o ELISA revelou 14,6% de soroprevalência para *T. equi* enquanto nenhum resultado positivo foi obtido pela PCR (ABUTARBUSH et al., 2012). Esta discrepância está muito relacionada com aquilo que cada método busca identificar, sendo que no caso da sorologia identificamos a presença de resposta imune, sem necessariamente o agente etiológico estar presente no organismo. No caso da PCR, o método identifica a presença ou ausência do agente na amostra analisada.

2.10 Tratamento

Drogas normalmente efetivas para o tratamento de animais acometidos por *Babesia*, como o diaminazeno administrado a 11 mg/kg por dois dias consecutivos, não foram efetivas na eliminação de *Theileria equi* (DE WALL, 1992). Estudos de sensibilidade à fármacos demonstram que os estágios exoeritrocíticos (esquizontes) de *T. equi* tem alta susceptibilidade a drogas como halofuginone, parvaquone e oxitetraciclina, mas não à drogas babesicidas como o diaminazeno. Entretanto, nenhuma destas drogas aparenta ter efeito satisfatório na eliminação da infecção de *T. equi*, com o equino apesar de apresentar melhora clínica, permanecendo infectado por toda sua vida (BRUNING, 1996).

O dipropionato de imidocarb na dose de 4.0 mg/kg, intramuscular, com 72 horas de intervalo num total de 4 aplicações mostrou-se capaz de eliminar a infecção por *T. equi* em 24 de 25 cavalos tratados. Tal fato foi comprovado por nested PCR e inoculação de sangue dos animais tratados em cavalos susceptíveis esplenectomizados que não desenvolveram a doença após a inoculação (UETI et al., 2012). Um dos cavalos que não respondeu ao tratamento, com a não eliminação da *T. equi*, foi submetido a uma nova sessão e teve o parasita eliminado, sugerindo não ser uma variante resistente ao medicamento, mas talvez resultante do mecanismo de evasão do parasita. A falha do imidocarb pode estar ligada à sua incapacidade em eliminar completamente os estágios pré-eritrocíticos da *T. equi*, que encontram-se em células mononucleares sanguíneas, antes de tornarem-se esquizontes e infectarem o eritrócito (UETI et al., 2012). Efeitos adversos como a atividade anticolinesterásica do imidocarb são relatados, entre eles: diarreia e cólica espasmódica, que ocorrem 15-20 minutos após a injeção. Drogas anticolinérgicas como a n-butil escopolamina administrada intravenosa a 0,3 mg/kg é efetiva em amenizar os sintomas adversos (UETI et al., 2012).

Enquanto isso, Hines et al. (2015) quantificaram a variação susceptibilidade *in vitro* de dois isolados de *T. equi* à exposição ao dipropionato de imidocarb e a um composto inibidor da kinase, sendo que houve diferença de sensibilidade ao imidocarb indicando possibilidade de resistência de determinadas cepas do hemoparasita à droga, enquanto que não houve diferença de susceptibilidade a um composto inibidor da kinase. Além disso, demonstraram *in vivo* a falha do imidocarb na eliminação da infecção por *T. equi* em quatro equinos experimentalmente infectados, mesmo após a aplicação do tratamento de 4mg/kg, intramuscular, com 72h de intervalo num total de 4 aplicações, por duas vezes. Após demonstrar as falhas do imidocarb e a eficiência do inibidor da kinase, os autores sugerem que o novo composto pode representar uma efetiva alternativa para o tratamento de infecções resistentes por *T. equi*.

Apesar do relato de sucesso na esterilização química de *T. equi* em equinos através de tal tratamento com imidocarb, as altas doses utilizadas aproximam-se de 50% da dose letal (DL 50) do fármaco, o que pode levar a sintomas de intoxicações moderados à severos e até mesmo ao óbito. Assim, tal protocolo torna-se de uso perigoso, principalmente em animais de alto valor. Além disso, é possível que algumas cepas de *T. equi* podem ter diferentes susceptibilidades ao tratamento (ROTHSCHILD, 2013).

Além do tratamento dirigido contra o hemoparasita, em casos graves, principalmente quando há intensa hemólise e manifestação de enterocolite, há a necessidade de terapia de suporte que pode incluir transfusão de sangue, hidratação intra-venosa, infusão de glicose (DE WALL, 1992) e uso de antiinflamatórios não esteroidais (ROTHSCHILD, 2013).

2.11 Prevenção e Métodos de Controle

O controle das Piroplasmoses equinas deve incluir um controle efetivo de carrapatos, monitoramento sorológico dos equinos e aplicação de quimioterápicos (BRUNING, 1996).

Desta forma, o controle dos vetores é fundamental para o sucesso de qualquer programa de controle e/ou erradicação deste hemoparasita. Além disso, devem ser tomadas medidas preventivas relacionadas ao trânsito de animais (monitoramento sorológico), à introdução de animais (evitar introduzir animais positivos no rebanho), à vigilância acarológica e à quarentena.

As formas de se prevenir a ocorrência da doenças variam de acordo com o status da hemoparasitose na área em consideração. Em áreas livres da doença, a entrada de equinos e carrapatos deve ser monitorada. Estratégias de premunição pode ser um método importante para evitar surtos da doença em áreas endêmicas (ROTHSCHILD, 2013).

Em sistemas de manejo intensivo, provavelmente é possível controlar a doença eliminando o contato entre os carrapatos vetores e os equinos através da aplicação regular de acaricidas. Entretanto, em sistema de criação extensivos em áreas endêmicas tal controle certamente será mais difícil. Nestas condições, a exposição estratégica e controlada dos potros à carrapatos e à infecção natural irá auxiliar no desenvolvimento de imunidade sem a manifestação de sintomatologia clínica severa da doença, gerando uma resistência natural no equino (DE WALL, 1992). Várias estratégias de imunização tem sido testadas, entretanto, até o momento, não há vacinas comerciais efetivas para *T. equi* (ROTHSCHILD, 2013).

A esterilização química é raramente recomendada em áreas endêmicas, com o tratamento só devendo ser realizado em animais com doença moderada ou intensa. No entanto, é indicada quando equinos oriundos destas áreas são transportados para regiões ou países livres da doença onde carrapatos vetores estejam presentes (DE WALL, 1992).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição da Área de Estudo

O presente estudo foi realizado em rebanho de equinos de uso militar da Academia Militar das Agulhas Negras (AMAN) e da Coudelaria do Rincão (CR).

3.1.1 Academia Militar das Agulhas Negras

A AMAN é localizada na microrregião do Vale do Paraíba Fluminense, no município de Resende, estado do Rio de Janeiro. O município possui uma área de 1.113,507 km², localiza-se a 22°27' de latitude sul e a 44°28' de longitude oeste, com altitude em relação ao nível do mar de 440 m, possuindo um clima classificado como tropical de altitude (Cwa), segundo a classificação climática de Köppen-Geiger (PIEEL et al., 2007).

Tal clima é caracterizado por apresentar médias de temperatura amenas, entre 18°C e 26°C, e amplitude térmica anual entre 7°C e 9°C. No verão, as temperaturas raramente ultrapassam os 30°C. O inverno é relativamente frio com estação seca, estiagem, neste período.

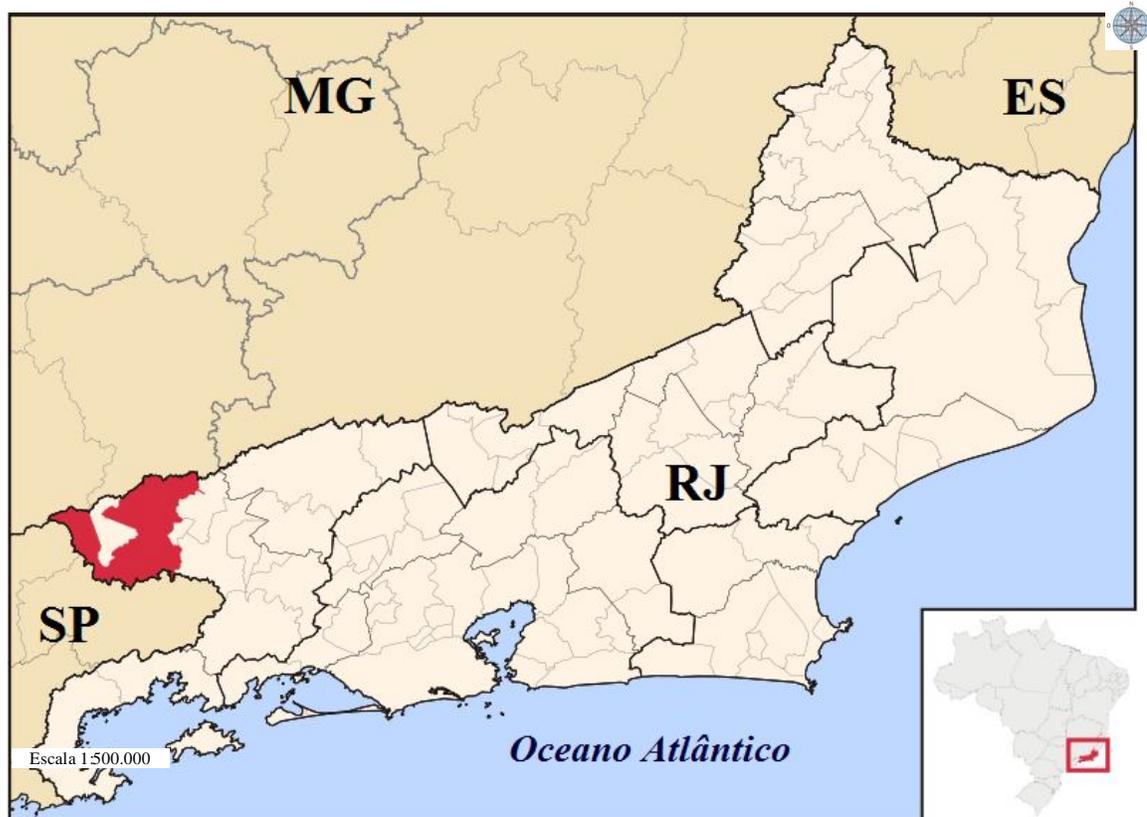


Figura 1. Localização geográfica, em vermelho, do município de Resende no estado do Rio de Janeiro.

A AMAN é uma instituição de ensino superior do Exército Brasileiro, contando com um efetivo de aproximadamente cinco mil pessoas. Situada no município de Resende, é a

maior escola de formação militar da América Latina, com 67 km² de área total dentro do município de Resende.

Basicamente a área da AMAN é dividida em área residencial, onde localiza-se a Vila Militar (Bairros Independência, Guararapes e Monte Castelo); Área Acadêmica (Prédios do Conjunto Principal, Alas de alojamentos dos Cadetes, Seção de Educação Física e Hospital Escolar); Área de Parques (onde localizam-se as instalações dos Cursos, entre outras edificações, inclusive o Hospital Veterinário, a Seção de Equitação e o Curso de Cavalaria); e Campo de Instrução, que são as áreas de treinamento de operações militares, composta por áreas rurais, de campos, capoeiras e fragmentos de Mata Atlântica.

A área da AMAN é cortada por diversos córregos e cursos d'água, com destaque ao Rio Alambari, afluente do Paraíba do Sul, que nasce no Parque Nacional do Itatiaia e percorre praticamente toda sua área. A presença abundante de cursos de água, campos e fragmentos de Mata Atlântica proporcionam uma rica fauna de animais silvestres na região, com destaque a alguns que podem ser reservatórios de agentes zoonóticos como: capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*); gambás (*Didelphis aurita*); ouriços (*Coendou villosus*); cutias (*Dasyprocta aguti*); jacus, (*Penelope ochrogaster*); preás (*Cavia aperea*) e tatus (*Dysipus novectus*), entre outros. Além disso, em parte das áreas do Campo de Instrução ainda há a presença de outros tipos de animais domésticos de arrendatários como caninos, bovinos, bubalinos e equinos.



Figura 2. Imagem aérea da Academia Militar das Agulhas Negras, localizada no município de Resende, Rio de Janeiro.

3.1.2 Coudelaria do Rincão

A Coudelaria do Rincão está localizada no município de São Borja, região oeste do estado do Rio Grande do Sul, fronteira com a Argentina, a 55° 35' 00" de latitude sul e a 28° 45' 40" de longitude oeste, com uma altitude em torno de 130m acima do nível do mar. O clima, de acordo com a classificação de Koppen, é subtropical úmido, caracterizado por estações bem definidas, sendo as chuvas bem distribuídas ao longo do ano, com precipitação média anual de 1.350 mm, uma temperatura média anual de 21° C e com umidade relativa do ar média de 75%, de acordo com os dados da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), estação São Borja, Rio Grande do Sul. A área total da Coudelaria é de

14.936,74 hectares, sendo 1.200 hectares ocupados pelo efetivo equino. O restante da propriedade é utilizada para bovinocultura de corte e leite, formação de pastagens, produção de grãos, manobras e treinamentos militares (OLIVEIRA, 2007).



Figura 3. Localização geográfica, em vermelho, do município de São Borja no estado do Rio Grande do Sul

A Coudelaria se originou da antiga estância de São Gabriel, que pertencia a Companhia de Jesus. Em 1843, foi incorporada aos bens do Estado. Em 1891 foi delegada ao Ministério do Exército, com o nome de Colônia de São Gabriel. Somente em 1922 foi criada a Coudelaria Nacional de Rincão que em 1975 foi extinta, sendo seu acervo encaminhado à Coudelaria de Campinas e utilizada pelo Exército apenas como Campo de Instrução de Rincão. Recriada em 1987, incorporou o plantel da extinta Coudelaria de Campinas, permanecendo até a presente data como Coudelaria e Campo de Instrução de Rincão.

Sua finalidade é a produção de equinos para o Exército Brasileiro, tendo especial atenção as áreas de produção, manejo sanitário e nutricional do plantel. Sua infra estrutura atende às necessidades da atividade a qual se propõe, possui pastagens naturais e artificiais,

baías e piquetes para os garanhões, piquete maternidade para fêmeas próximas ao parto, pavilhão de baias para mães com potro ao pé e pavilhão de potros desmamados.



Figura 4. Imagem aérea da Coudelaria do Rincão, localizada no município de São Borja, Rio Grande do Sul

3.2 Inquérito Epidemiológico

3.2.1 Delineamento do estudo e amostragem

Efetuuou-se um estudo do tipo transversal de uma coorte de equinos de uso militar do município de Resende - RJ, mantidos na área da Academia Militar das Agulhas Negras e no município de São Borja - RS, mantidos na área da Coudelaria do Rincão.

O cálculo da amostra da AMAN foi baseado em resultado de estudo prévio de soroprevalência para *T. equi*, pela técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), que encontrou prevalência de 85,96% (HENRIQUES, 2006). O cálculo da amostra da CR foi baseado em 50% do efetivo.

Assim, obteve-se o número de 185 amostras de soros equinos para a região da AMAN, admitindo-se um intervalo de confiança de 95%, uma margem de erro de 5%, e seguindo-se a equação seguinte descrita por Sampaio (2002):

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

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

Entretanto, optou-se pela realização de um censo da população de equinos de uso militar, visto que o tamanho amostral calculado superou o tamanho da população de animais do plantel da AMAN, que era de 174 equinos de uso militar. Para a CR decidiu-se pelo número de 300 amostras de soros equinos da propriedade.

Sendo assim, os equinos de uso militar presentes nos dois rebanhos no momento do estudo foram submetidos a exame físico visando verificar a infestação de carrapatos, assim como tiveram amostras de sangue coletadas, no período de janeiro de 2013 a março de 2013.

3.2.2 Caracterização dos rebanhos

Por se tratarem de equinos de uso militar, o rebanho em estudo tem características particulares quanto ao manejo sanitário, zootécnico e quanto ao tipo de utilização.

No momento em que foi realizado o estudo na AMAN, os 174 equinos eram submetidos a dois tipos de manejo: Regime estabulado e semi estabulado. No regime estabulado os equinos eram mantidos em baias a maior parte do dia, recebendo feno de alfafa e concentrado (ração balanceada) em horários determinados, sendo ocasionalmente soltos em piquetes, por curtos períodos. No regime semi-estabulado os equinos são mantidos soltos em áreas de pastagem a maior parte do dia, sendo presos em baias para fins de fornecimento de concentrado e para utilização em instruções militares quando necessário.

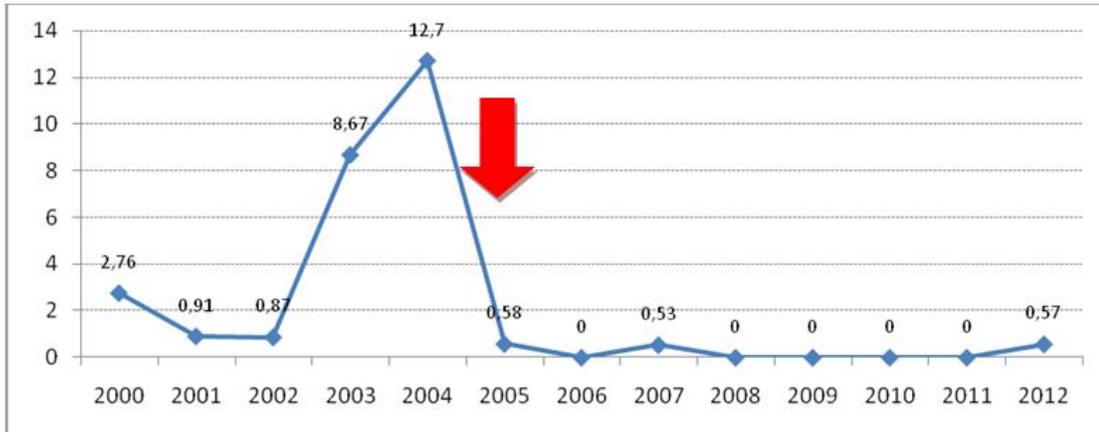


Figura 5. Imagens de equinos da AMAN. a) equinos semi-estabulados em baias do pavilhão Geral; b) Pavilhões de baias dos equinos do C Cav; c) equinos semi-estabulados nas baias do pavilhão Box; d) imagem do pavilhão Odim e equinos soltos em piquete deste pavilhão.

Com relação ao controle de ectoparasitas, tais equinos têm sido submetidos, desde o ano de 2005, a um controle de carrapatos baseado em pulverização com solução de cipermetrina a 15%, diluída na proporção de 2 ml por litro de solução, sendo aplicados 4 litros de solução por equino. As aplicações são realizadas semanalmente, em todo o plantel, entre os meses de abril a outubro, e mensalmente entre os meses de novembro a março, conforme proposto por

Labruna et al. (2004), associada com aplicação de pastas à base de produtos carrapaticidas nos pavilhões auriculares e nos divertículos nasais conforme proposto por Bello et al. (2008), a cada 35 dias, durante todo o ano. Tal controle, reduziu os casos clínicos agudos de Piroplasmoses, especialmente naqueles animais introduzidos no rebanho oriundos da Coudelaria do Rincão, conforme descrito por Campos et al., (2013) (Figura 5).

Coefficientes de incidências de babesiose equina no rebanho da Academia Militar das Agulhas Negras, Resende – RJ, de 2000 a 2012. A seta vermelha indica o momento do início do controle estratégico de carrapatos no rebanho.



Número de casos e efetivo de referência nos anos, levantados nos registros do HVet AMAN, e coeficientes de incidência calculados (casos / 100 equinos / ano) para os anos de 2000 a 2012.

Ano	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Nº casos	6	2	2	17	25	1	0	1	0	0	0	0	1
Efetivo	217	219	229	196	196	170	162	188	218	178	192	185	173
Incidência	2,76	0,91	0,87	8,67	12,7	0,58	0	0,53	0	0	0	0	0,57

Figura 6: Resultado do controle de carrapatos sobre a incidência de casos clínicos agudos de Piroplasmoses no rebanho equino da Academia Militar das Agulhas Negras, de acordo com Campos et al. (2013).

Na Coudelaria do Rincão, os animais são utilizados para reprodução, divididos em diferentes categorias: garanhões, fêmeas prenhas, fêmeas vazias, potros de diferentes idades. O manejo alimentar é o pasto artificial e nativo, com suplementação energética, proteica e mineral. O controle de carrapatos é realizado através de pulverização com produtos carrapaticidas quando é constatada algum tipo de infestação. Os animais são soltos em diversos piquetes de forrageiras nativas e artificiais presentes na propriedade (Figura 7). Como característica marcante no manejo dos equinos, está a utilização de pastagens consorciadas com o rebanho bovino, caracterizando o manejo como "pastejo misto".

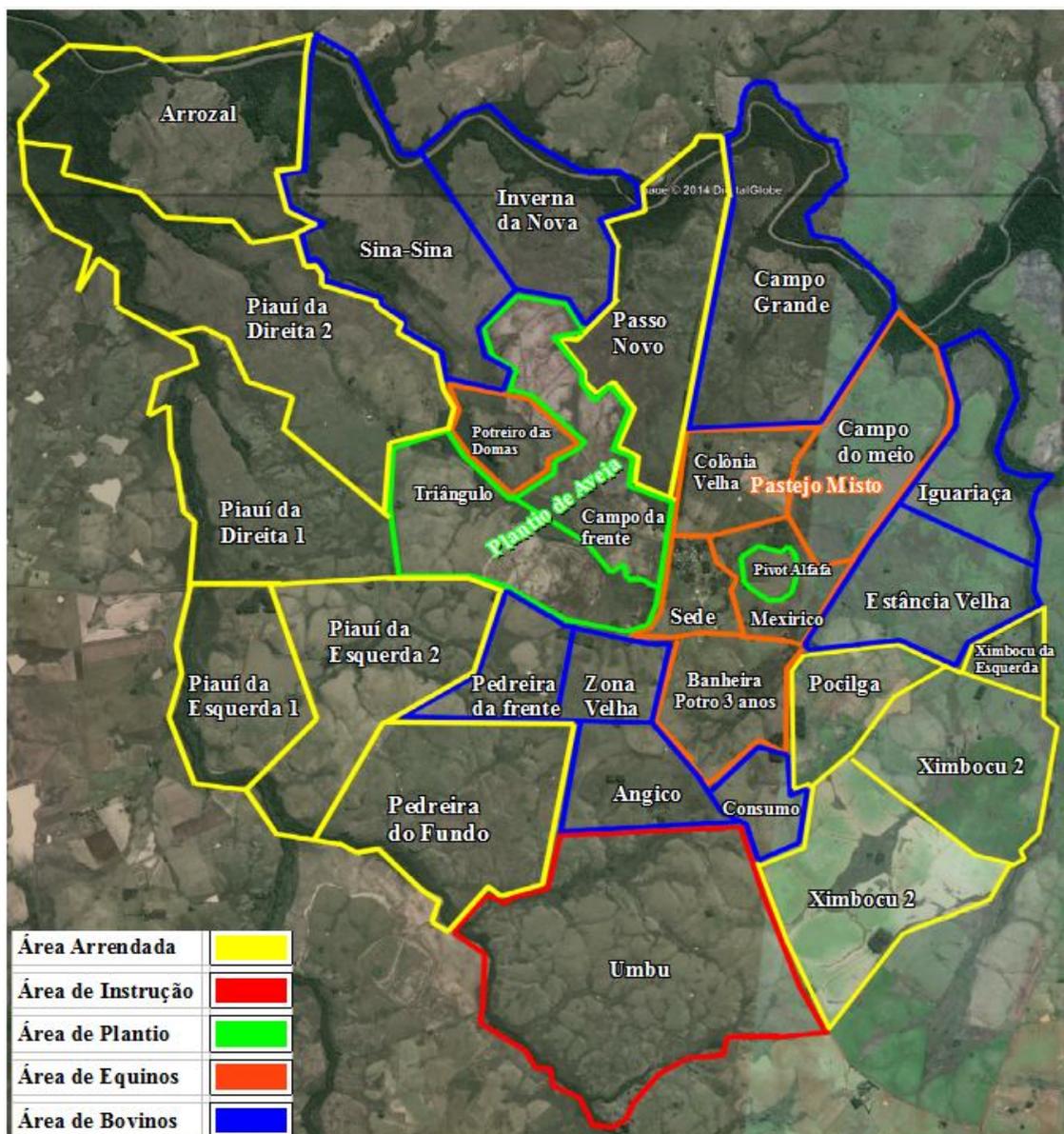


Figura 7. Imagem do mapa dos diversos piquetes existentes, destacando a área de pastejo misto, na Coudelaria do Rincão, município de São Borja, Rio Grande do Sul.

3.2.3 Ficha de informação

Cada animal teve seus dados registrados em uma Ficha Individual de Informação de Equino (Anexo A), visando recolher informações inerentes aos equinos (idade, sexo, pelagem, raça), quanto à infestação por carrapatos (presença ou ausência, e gênero de carrapatos que infestavam cada animal no momento da coleta), e quanto às condições de manejo (estabulado ou semi-estabulado, característica do ambiente de pastejo, áreas de criação em que se encontra, entre outras). A coleta de tais informações foi realizada no ato da coleta (cor, sexo, tipo de manejo) e através do Sistema de Controle de Equinos do Exército (Sistema Pégasus), (idade, tempo de criação). Todas as informações adquiridas a partir de tais fichas foram tabuladas a fim de avaliar possíveis fatores associados à sororeatividade dos equinos à *T. equi* e *B. caballi*.

3.2.4 Coleta de carrapatos e de amostras de sangue

Todos os equinos tiveram o corpo inspecionado visualmente, com atenção nas regiões mais comumente parasitadas por Ixodídeos como: pavilhão auricular, cabeça, pescoço, peito, axilas, região inguinal e embaixo da cauda. Dos animais parasitados foram coletados todos os carrapatos presentes, os quais foram armazenados em tubos identificados contendo álcool isopropílico para a posterior identificação das espécies e contagem do número de carrapatos. A presença de infestação de carrapatos foi categorizada considerando-se animais infestados aqueles que apresentavam ao menos um carrapato realizando parasitismo. O grau de infestação de carrapatos foi categorizado em infestação ausente ou leve (animais com até 20 carrapatos) e moderada a pesada (animais com mais de 20 carrapatos).

Para o exame de ELISA, uma amostra de 10 mL de sangue periférico foi coletada de cada animal através de venopunção da veia jugular, colocada em tubo seco (sem anticoagulante), devidamente identificado e acondicionado em recipiente térmico e encaminhada ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da AMAN (LAC HVet AMAN). À seguir, as amostras foram centrifugadas a 2500xg por 5 minutos, sendo o soro separado e aliquoteado em microtubos de polipropileno de 1,5 mL, identificados e acondicionados a -80°C.

Para a PCR, uma amostra de 10 mL de sangue periférico foi coletada de cada animal através de venopunção da veia jugular, sendo colocada em tubo com anticoagulante EDTA (ácido etileno diamino tetraacético), retirando-se à seguir alíquotas e acondicionando-as em tubos de polipropileno de 1,5mL, estéreis, mantidos a temperatura de -80°C para extração posterior de ácido desoxirribonucleico (DNA).

Posteriormente, foram encaminhados, sob refrigeração, ao Laboratório de Hemoparasitos e Vetores da Estação Experimental de Pesquisa Parasitológica W.O. Neitz (E.E.P.P. W.O. Neitz), na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, onde foram mantidos a -80°C até o momento da realização dos ensaios sorológicos e moleculares no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Parasitologia Animal.

3.3 Teste Sorológico

3.3.1 Obtenção do antígeno

Utilizamos antígenos brutos de *T. equi* e *B. caballi* gentilmente cedidos pelo Departamento de Patologia Animal FCAV UNESP Jaboticabal, através da Professora Rosângela Zacarias Machado, para a realização dos exames de ELISA. Tal antígeno foi obtido conforme descrito por Baldani et al. (2004).

3.3.2 Obtenção do controle positivo

Os soros dos controles positivos foram obtidos de amostras do banco de amostras positivas do Laboratório de Hemoparasitoses da Estação Experimental W.O. Neitz. Todas as amostras eram provenientes de animais esplenectomizados e cronicamente infectados por *T. equi* e *B. caballi*, comprovadamente positivas por teste sorológico (RIFI) e molecular (PCR).

3.3.3 Obtenção dos controles negativos

Os soros dos controles negativos foram obtidos de amostras do banco de amostras positivas do Laboratório de Hemoparasitoses da Estação Experimental W.O. Neitz. Todas as amostras foram comprovadamente negativas por teste sorológico (RIFI) e molecular (PCR).

para *T. equi* e *B. caballi*, sendo provenientes de animais de alto nível zootécnico criados na região serrana do Rio de Janeiro (Petrópolis e Teresópolis), com excelente controle sanitário nas propriedades.

3.3.4 Ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) indireto

As amostras coletadas foram analisadas através do ELISA indireto, conforme padronizado por Baldani et al. (2004), modificado por MACHADO. Realizou-se o ensaio para detectar anticorpos da classe IgG homólogos contra *T. equi* e *B. caballi*, utilizando o antígeno bruto de *T. equi* e *B. caballi* diluído a 1600 µg/mL em tampão carbonato pH 9,6, sensibilizando-se microplacas de poliestireno com 96 orifícios (Nunclon™ Maxisorp; Nunc, Dinamarca), incubadas *overnight* em câmara úmida a 4 °C.

Após sensibilização, as placas foram lavadas por três vezes com Tampão salino fosfato (PBS tween 80 0,05% pH 7,4 – PBST) e bloqueadas com 200 µL de leite em pó 6% diluído em PBST e incubadas por 90 minutos, em câmara úmida, em estufa bacteriológica a 37° Celsius. Posteriormente, lavaram-se por três vezes as placas conforme descrito anteriormente.

Foram utilizadas 5 amostras negativas de animais previamente testados e três de controles positivos de equinos esplenectomizados e cronicamente infectados. Os controles negativos, os controles positivos e os soros testes foram diluídos na concentração de 1:100 em PBST e dispostos 100 µL por poço nas placas, que foram incubadas à 37° Celsius por 60 minutos em câmara úmida e, posteriormente, lavadas como na etapa anterior.

Então, foi disposto 100 µL do conjugado IgG de coelho anti-IgG equino ligado a fosfatase alcalina (*antihorse IgG, whole molecule, alkaline phosphatase*, SIGMA® cat. N°A6063) na diluição de 1:15.000 em PBST. As placas foram incubadas por mais 60 minutos nas mesmas condições anteriores e, em seguida, foram realizadas as lavagens das placas.

Por fim, as placas foram forradas com a solução reveladora composta pelo substrato paranitro fenil-fosfato de sódio (PNPP) (Sigma Chemical, EUA) diluído em tampão dietanolamina pH 9,8 na concentração de 10 mg/mL. Estas permaneceram à temperatura ambiente até a revelação e momento de leitura em espectrofotômetro para microplacas de 96 orifícios (Multiskan FC Thermo Science / Uniscience, Modelo 1, Versão 1.00.79, NS 357-00429), utilizando filtro para comprimento de onda de 405nm. Em todas as fases do ensaio utilizou-se 200µL de solução por orifício.

Após a leitura, a atividade imunológica de cada soro foi calculada baseada na razão de amostra de soro positivo (valor S/P), considerando o seguinte cálculo: a média de densidade óptica (DO) da amostra menos a média da DO dos soros controles negativos, dividido pela média da DO dos soros controles positivos menos a média da DO dos controles negativos. O valor do ponto de corte foi calculado como sendo duas vezes e meia o valor da DO média dos controles negativos, conforme descrito por Baldani et al., (2004). Foi considerado positivo todas as amostras com valor S/P acima do valor do ponto de corte.

3.4 Teste Molecular

3.4.1 Extração de DNA das amostras

De cada amostra de sangue foi extraído o DNA a partir de 300 µL de sangue total, através do kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega®, Madison, WI, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de DNA extraído do sangue foram quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop® ND-2000 (Nanodrop Technologies, DE, USA), padronizadas na concentração de 60 ng/µL, a partir da diluição em solução de Tris-EDTA, e armazenadas a -80°C até o momento da realização da técnica de PCR.

3.4.2 Sensibilidade analítica da PCR para detecção de *T. equi* e *B. caballi*

Para avaliar a melhor concentração de *primers* utilizada na reação da PCR foram realizadas oito diluições seriadas de uma amostra de DNA positiva para *T. equi* e *B. caballi* (10ng/μL até 10⁻⁷ng/μL), variando as concentrações dos *primers* em 0,4μM, 0,6μM, 0,8μM no intuito de obter a otimização da concentração final utilizada na PCR.

3.4.3 Ensaios da PCR

As amostras de DNA foram submetidas ao diagnóstico molecular através da técnica de *nested* PCR, para a amplificação de dois fragmentos específicos de aproximadamente 530 pb para a primeira reação da PCR e 430pb para a segunda PCR, ambos do gene BC48, específico para *B. caballi* e fragmentos de 268 pb para a primeira reação e 218 pb para a segunda reação para o gene EMA-1 (*Especific Merozoite Antigen*), específico para *T. equi* (BATTSETSEG et al., 2001). Para a primeira e segunda reação de *B. caballi* e *T. equi* foi utilizado um volume final de 25 μL, sendo 60ng/μL de DNA, 12,5μL de PCR MasterMix (Amplitaq Gold®), 0,6μM de cada *primer* (*forward* e *reverse*), e 7μL de água ultrapura. As condições de amplificação para *B. caballi* e *T. equi* em ambas as PCR foram: 40 ciclos a 96°C por 4min, desnaturação a 94°C por 50s; anelamento dos *primers* a 56°C por 1min; amplificação a 72°C por 1min e extensão final a 72°C por 5min. O processo de amplificação foi realizado em termociclador (Mastercycler ProS, Eppendorf®) e a reação da PCR foi realizada baseada no estudo de Battsetseg et al. (2001) com algumas modificações.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão de corrida TAE (40mM Tris-acetato, 2 mM EDTA pH 8,0), durante 60 minutos, à 90V, seguido por coloração em brometo de etídio e visualização dos produtos amplificados sob luz ultravioleta, através de transiluminador (Electronic UV Transilluminator, L-PIX TOUCH).

3.5 Avaliação dos Resultados e Análise Estatística

Os resultados dos exames sorológicos (positivos no ELISA, sob a titulação de 1.600 μg/mL) e moleculares (positivos na PCR) foram comparados e associados às variáveis obtidas através da ficha de exame e informação, através da análise de regressão logística, em nível de 5% de significância. Para as variáveis com significância foram calculadas as *Odds Ratio* (OR) e os respectivos intervalos de confiança (IC). Todas as análises utilizaram o programa R (R Development Core Team 2010).

Para a avaliação dos possíveis fatores associados à soropositividade, as variáveis independentes selecionadas a partir das fichas de exame físico e informação dos equinos foram analisadas em função da frequência da detecção de soropositividade para o ELISA e positividade na PCR de *T. equi* e *B. caballi* utilizando o teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de 25% de significância, sendo as variáveis com diferença estatística incluídas no modelo de regressão logística, em nível de 5% de significância, através do programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2010).

4 RESULTADOS

4.1 Infestação por Carrapatos

Neste estudo foi observada a ocorrência de somente duas espécies de carrapatos realizando parasitismo nos equinos da AMAN, a saber: *A. sculptum* e *D. nitens*. Já na CR foi constatado o parasitismo somente pela espécie *R. B. microplus*. (Tabela 1).

Tabela 1. Presença ou ausência de equinos infestados por carrapatos observadas nos diferentes rebanhos para *Amblyomma sculptum*, *Dermacentor nitens* e *Rhipicephalus microplus* nos equinos de uso militar do município de Resende, Rio de Janeiro e São Borja, Rio Grande do Sul.

Rebanho	<i>Amblyomma sculptum</i>	<i>Dermacentor nitens</i>	<i>Rhipicephalus microplus</i>
Rio de Janeiro	Presença	Presença	Ausência
Rio Grande do Sul	Ausência	Ausência	Presença

4.2 Sensibilidade Analítica da Técnica de nPCR

Em relação à sensibilidade analítica da técnica, pôde-se observar que o limite de detecção do fragmento alvo de *B. caballi* e *T. equi* utilizando diluições seriadas de um DNA extraído de uma amostra sabidamente positiva (10ng/μL) para este patógeno, foi possível detectar até 10⁻⁴ng/μL de DNA alvo. Esta sensibilidade foi observada através da nPCR, utilizando oligonucleotídeos para amplificação de um fragmento de 430pb da segunda reação de PCR, do gene BC48, específico para *B. caballi* e um fragmento de 218pb do gene EMA1, específico para *T. equi*.

Em relação ao DNA extraído das 474 amostras de sangue de equinos testadas na nPCR, para o gene EMA1 e BC48, conforme metodologia descrita, foi evidenciada a amplificação em 73 amostras da AMAN e 161 amostras da CR para *T. equi*, correspondendo a uma prevalência de 41,95% e 53,66% respectivamente (Tabela 2), após visualização a partir da eletroforese em gel de agarose a 1% (Figura 1), e 01 amostra da CR para *B. caballi*, correspondendo a uma prevalência de 0,33% (Tabela 3).

Tabela 2. Resultados de *nested* PCR para *Theileria equi*, respectivas prevalências nos rebanhos equinos, e resultado do teste de comparação de proporções.

	PCR		Prevalência	Teste de comparação de proporções <i>p</i> -valor
	Positivos	Negativos		
Rio de Janeiro	73	101	41,95%	0,018
Rio Grande do Sul	161	139	53,66% *	

Rio de Janeiro: 174 equinos da Academia Militar das Agulhas Negras, município de Resende.

Rio Grande do Sul: 300 equinos da Coudelaria do Rincão, município de São Borja.

Tabela 3. Resultados de *nested* PCR para *Babesia caballi*, respectivas prevalências nos rebanhos equinos, e resultado do teste de comparação de proporções.

	PCR		Prevalência	Teste de comparação de proporções <i>p</i> -valor
	Positivos	Negativos		
Rio de Janeiro	0	174	0%	1
Rio Grande do Sul	1	299	0,33%	

Rio de Janeiro: 174 equinos da Academia Militar das Agulhas Negras, município de Resende.

Rio Grande do Sul: 300 equinos da Coudelaria do Rincão, município de São Borja.

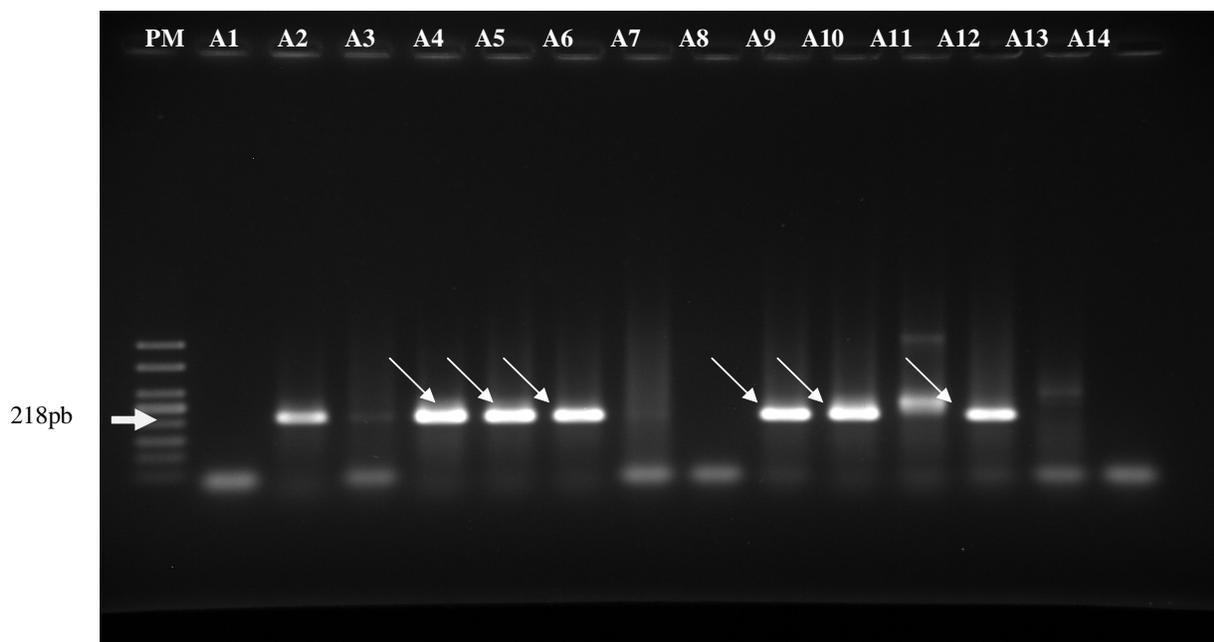


Figura 8: Gel de agarose (1%) com produtos da amplificação do fragmento de 218pb do gene EMA1, específico para *T. equi*. PM: Peso molecular de 1kb; A1 (Controle negativo); A2 (Controle positivo); A3, A7, A8, A11 e A13 (Amostras negativas); A4, A5, A6, A9, A10, A12: Amostras de DNA positiva através da PCR (seta branca).

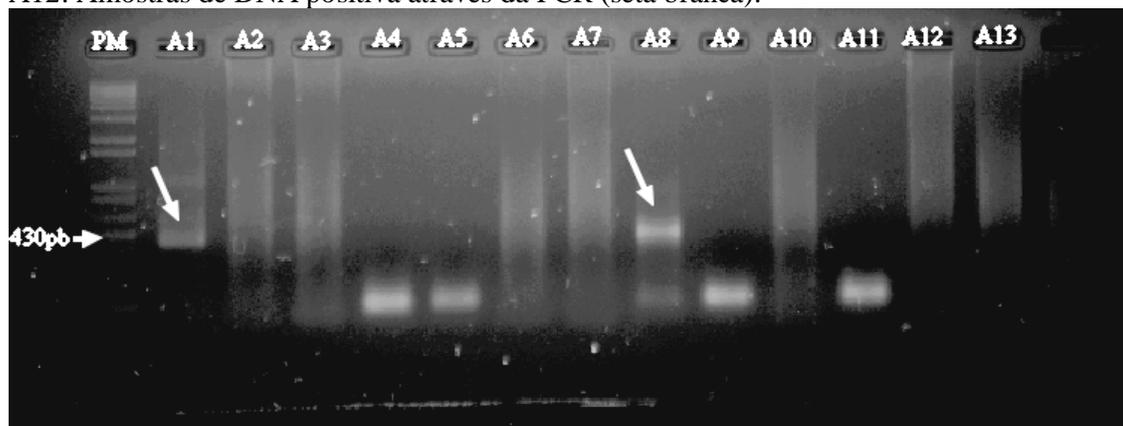


Figura 9: Gel de agarose (1%) com produtos da amplificação do fragmento de 430pb do gene BC48, específico para *B. caballi*. PM: Peso molecular de 1kb; A1 (Controle Positivo- seta branca); A2 (Controle negativo); A3, A4, A5, A6, A7, A9, A10, A11, A12, A13 (Amostras negativas); A8: Amostras de DNA positiva através da PCR (seta branca).

4.3 Inquérito Sorológico

A partir das 174 amostras do estado do Rio de Janeiro e 300 amostras do Rio Grande do Sul submetidas ao iELISA, foram detectados 127 animais sororeagentes na AMAN para *T. equi*, correspondendo a uma prevalência de 72,99% e 262 animais sororeagentes na CR, correspondendo a uma prevalência de 87,33% (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados de sororeatividade ao iELISA para *Theileria equi*, respectivas prevalências nos rebanhos equinos, e resultado do teste de comparação de proporções.

	iELISA		Prevalência	Teste de comparação de proporções <i>p</i> -valor
	Positivos	Negativos		
Rio de Janeiro	127	47	72,99%	0,0001
Rio Grande do Sul	262	38	87,33%*	

Rio de Janeiro: 174 equinos da Academia Militar das Agulhas Negras, município de Resende.

Rio Grande do Sul: 300 equinos da Coudelaria do Rincão, município de São Borja.

A partir das 174 amostras do estado do Rio de Janeiro e 300 amostras do Rio Grande do Sul submetidas ao iELISA, foram detectados 127 animais sororeagentes na AMAN para *B. caballi*, correspondendo a uma prevalência de 72,99% e 157 animais sororeagentes na CR, correspondendo a uma prevalência de 52,33% (Tabela 5).

Tabela 5. Resultados de sororeatividade ao iELISA para *Babesia caballi*, respectivas prevalências nos rebanhos equinos, e resultado do teste de comparação de proporções.

	iELISA		Prevalência	Teste de comparação de proporções <i>p</i> -valor
	Positivos	Negativos		
Rio de Janeiro	127	47	72,99%*	0,00001
Rio Grande do Sul	157	143	52,33%	

Rio de Janeiro: 174 equinos da Academia Militar das Agulhas Negras, município de Resende.

Rio Grande do Sul: 300 equinos da Coudelaria do Rincão, município de São Borja.

4.4 Análise Bivariada, Multivariada e Fatores Associados aos Equinos Sororeagentes

Na Tabela 6, apresenta-se o resultado da análise bivariada e multivariada dos fatores associados à soropositividade dos equinos frente à detecção de anticorpos anti-*T. equi* através do ELISA indireto. Dentre todas as variáveis, apenas a origem da Coudelaria do Rincão foi significativamente associado à soropositividade nos equinos.

Tabela 6. Análise bivariada e multivariada da frequência de equinos soropositivos através do ensaio de imunoadsorção enzimático (ELISA) indireto para *Theileria equi*, em função dos fatores associados, como gênero, idade, definição racial, manejo dos animais, origem, sistema de criação e presença de carrapatos nos equinos de uso militar dos estados do Rio de Janeiro e do Rio Grande do Sul.

Características dos animais e manejo	N	(%)	Bivariada		Multivariada		
			χ^2	P	P	OR	IC 95%
Estado							
Rio de Janeiro	174	73,0	15,38	0,00	0,14	*	*
Rio Grande do Sul	300	87,3				-	-
Gênero							
Macho	182	74,7	10,80	0,01	0,06	*	*
Fêmea	292	86,6				-	-
Idade							
≤ 6 anos	161	85,7	6,19	0,10	*	*	*
> 6 e ≤ 10 anos	131	83,2			0,16	-	-
> 10 e ≤ 20 anos	167	76,6			0,27	-	-
> 20 anos	15	93,3			0,13	-	-
Definição racial							
Com raça	238	83,6	0,77	0,44	-	-	-
Sem raça definida	236	80,5			-	-	
Tempo de criação na propriedade							
≤ 5 anos	249	80,3	3,18	0,21	*	*	*
> 5 e ≤ 15 anos	172	82,0			0,35	-	-
> 15 anos	53	90,6			0,10	-	-
Origem dos equinos							
Coudelaria do Rincão	373	86,3	21,58	0,00	0,01	2,89	(1,34 - 6,19)
Fora da Coudelaria	101	66,3				*	*
Grau de Infestação por carrapatos							
Moderado/alto	33	81,8	0,01	0,84	0,90	*	*
Leve/ausente	441	82,1				-	-

N: Número de amostras de animais; χ^2 : Valor do Qui-quadrado; P: p-valor; OR: *Odds Ratio*; IC: Intervalo de confiança. *Categoria de referência.

Na Tabela 7, apresenta-se o resultado da análise bivariada e multivariada dos fatores associados à soropositividade dos equinos frente à detecção de anticorpos anti-*B. caballi* através do ELISA indireto. Dentre todas as variáveis, apenas o manejo no estado do Rio de Janeiro foi significativamente associado à soropositividade nos equinos.

Tabela 7. Análise bivariada e multivariada da frequência de equinos soropositivos através do ensaio de imunoadsorção enzimático (ELISA) indireto para *Babesia caballi*, em função dos fatores associados como gênero, idade, definição racial, tempo do animal na propriedade, origem dos animais e grau de infestação de carrapatos nos equinos de uso militar dos estados do Rio de Janeiro e do Rio Grande do Sul.

Características dos animais e manejo	N	(%)	Bivariada		Multivariada		
			χ^2	P	P	OR	IC 95%
Estado							
Rio de Janeiro	174	73,0	19,56	0,00	0,00	3,12	(1,80 – 5,40)
Rio Grande do Sul	300	52,3					
Gênero							
Macho	182	65,4	3,67	0,06	0,45	-	-
Fêmea	292	56,5					
Idade							
≤ 6 anos	161	58,4	1,28	0,73	-	-	-
> 6 e ≤ 10 anos	131	60,3					
> 10 e ≤ 20 anos	167	59,9					
> 20 anos	15	73,3					
Definição racial							
Com raça	238	58,0	0,74	0,44	-	-	-
Sem raça definida	236	61,9					
Tempo de criação na propriedade							
≤ 5 anos	249	61,8	0,82	0,66	-	-	-
> 5 e ≤ 15 anos	172	57,6					
> 15 anos	53	58,5					
Origem dos equinos							
Coudelaria do Rincão	373	58,4	1,57	0,20	0,16	*	*
Fora da Coudelaria	101	65,3					
Grau de Infestação por carrapatos							
Moderado/alto	33	66,7	0,67	0,52	0,26	-	-
Leve/ausente	441	59,4					

N: Número de amostras de animais; χ^2 : Valor do Qui-quadrado; P: p-valor; OR: *Odds Ratio*; IC: Intervalo de confiança. *Categoria de referência.

4.5 Avaliação de Infecção e Co-infecção considerando iELISA e nPCR

Na tabela 8, apresenta-se o resultado geral, considerando o iELISA e *nested* PCR nos dois rebanhos, apresentando soroprevalência de 50,21% de Co-infecção para os dois agentes pelo ELISA, sendo 53,45% na AMAN e 48,33% na Coudelaria do Rincão. Enquanto isso, pela PCR, apresentou 0,21 % de Co-infecção, sendo 0,33% na Coudelaria do Rincão.

Tabela 8. Determinação das Piroplosomoses equinas, através do iELISA e *nested* PCR, nos rebanhos de equinos de uso militar.

iELISA		<i>T. equi</i>		<i>B. caballi</i>		Co-infecção		Negativos	
Rebanhos	N	n	%	n	%	n	%	n	%
Rio de Janeiro	174	34	19,54	34	19,54	93	53,45	13	7,47
Rio Grande do Sul	300	117	39	12	4	145	48,33	26	8,67
Total	474	151	31,86	46	9,7	238	50,21	39	8,23
<i>nested</i> PCR		<i>T. equi</i>		<i>B. caballi</i>		Co-infecção		Negativos	
Rebanhos	N	n	%	n	%	n	%	n	%
Rio de Janeiro	174	73	41,95	0	0	0	0	101	58,05
Rio Grande do Sul	300	161	53,66	1	0,33	1	0,33	139	46,34
Total	474	234	49,37	1	0,21	1	0,21	240	50,63

Prevalência total de equinos positivos por iELISA: 91,77% (n= 435)

Prevalência total de equinos positivos por *nested* PCR: 49,58% (n= 235)

5 DISCUSSÃO

No presente estudo foi observada, na AMAN, uma prevalência de 72,99% de equinos sororeativos ao ELISA indireto com antígeno bruto de *T. equi* e *B. caballi*. Tal fato corrobora um quadro de enzootia de *T. equi* na região, conforme identificado por Henriques (2006), corroborando dados referentes a endemicidade de algumas regiões do estado do Rio de Janeiro (PFEIFER BARBOSA et al., 1995; SANTOS et al., 2011), bem como a ampla distribuição desta hemoparasitose no Brasil (HEIM et al., 2007). Na Coudelaria do Rincão a prevalência de 85% para *T. equi* é compatível com os resultados encontrados por Torres et al. (2012), os quais encontraram prevalência de 90,9% na região da Campanha do estado do Rio Grande do Sul, em propriedades onde os equinos realizavam pastejo misto com bovinos.

A pesquisa molecular para *T. equi* indicou positividade de 46% no rebanho do Sudeste e 53% no rebanho da região Sul, demonstrando o estado de portadores assintomáticos dos animais examinados corroborando com citações de De Waal (1992). Além disso, nos animais oriundos da Coudelaria do Rincão verificou-se uma maior positividade estatisticamente significativa, indicando que a presença do carrapato *R. microplus* como provável vetor competente para a transmissão é a maior causa dessa maior positividade, corroborando com os dados já relatados por Heuchert et al. (1999), Souza et al. (2000), Nizoli et al. (2008) e Torres et al. (2012).

Com relação à sorologia para *B. caballi* o rebanho de equinos militares do Sudeste apresentou diferença significativamente maior do que o do Sul devido à presença do carrapato *D. nitens* parasitando os equinos da AMAN, compatível com os achados de Heuchert et al. (1999), os quais afirmaram que a soroprevalência tem uma tendência de cair do norte para o sul do país devido à diminuição da presença do vetor nas regiões mais ao sul. Estes achados referentes à sorologia na Coudelaria do Rincão podem ser tomados como elevados, considerando que não foram encontrados carrapatos *D. nitens* parasitando os animais. No entanto, tal resposta sorológica pode ser explicada como decorrente da infestação por carrapatos infectados em animais transferidos do sudeste para o sul para fins de reprodução. Além disso, também é possível que carrapatos vetores deste agente possam ter sido transportados nos diversos caminhos que circulam na propriedade para transportar equinos para outras regiões do Brasil.

Aguirre et al. (2004) relataram o óbito de duas potras na Argentina devido a à infecção por *B. caballi*, relacionando este achado à presença do carrapato *D. nitens* parasitando os animais em questão. Além disso, Evans et al. (2001) relataram a presença do *D. nitens* parasitando equinos utilizados como animais de tração de carroças na cidade de Viamão, estado do Rio Grande do Sul. Assim, esta resposta sorológica considerada elevada no rebanho da Coudelaria do Rincão indicaria que os animais tiveram contato com a *B. caballi*. Não pode estar descartada a possibilidade de transmissão mecânica por fômites contaminados (GERSTENBERG et al., 1998) e mesmo por outros artrópodes hematófagos como moscas e tabanídeos, apesar de ainda não existir comprovação científica da competência vetorial dos mesmos (PHIPPS; OTTER, 2004).

A despeito da alta prevalência pela PCR, identificando um elevado número de animais portadores de *T. equi* (49,37%), nenhum animal dos rebanhos estudados apresentava sintomatologia clínica no período de coleta das amostras, corroborando com os achados que reportaram ser rara a ocorrência de manifestações clínicas e surtos em áreas enzoóticas, conforme relatado por De Wall (1992) e Heuchert et al. (1999). Ademais, este achado corrobora com o afirmado por Rothschild (2013), o qual reportou que em regiões enzoóticas a

maioria dos animais recupera-se da doença, tornando-se portadores e carreadores assintomáticos. Desta forma, conclui-se que os rebanhos avaliados estão em estabilidade enzoótica (MAHONEY; ROSS, 1972). Assim, por serem regiões endêmicas, com a presença de muitos animais portadores assintomáticos, faz-se necessário aplicar medidas preventivas em equinos oriundos de regiões não enzoóticas que adentram nos plantéis, de maneira a evitar a ocorrência de doença clínica, conforme preconizado por De Wall (1992). Tal fato é relevante, considerando que os equinos de uso militar da AMAN são oriundos, em sua maioria, da Coudelaria do Rincão, local de alta prevalência para *T. equi*, mas com menor prevalência para *B. caballi*, devido às condições climáticas desfavoráveis para o parasitismo dos equinos pelo *D. nitens*. Desta maneira, animais oriundos desta região ao adentrarem ao rebanho da AMAN, poderão estar mais expostos às manifestações clínicas agudas da doença, conforme previamente evidenciado (DE WALL, 1992). Apesar disso, o resultado negativo pela PCR para *B. caballi* na AMAN, não evidenciando infecção por este agente nos animais avaliados no período de realização deste inquérito, sugere que este patógeno está circulando em baixos níveis, e esporadicamente, dentro do referido rebanho.

O exame de ELISA indireto baseado em antígeno bruto de *T. equi* e *B. caballi* mostrou-se eficiente na varredura epidemiológica dos rebanhos, identificando exposição prévia a estes patógenos, corroborando o observado por Baldani et al. (2004) na microrregião de Jaboticabal, estado de São Paulo.

Neste estudo transversal, a infestação por *D. nitens* na região Sudeste demonstrou a ocorrência de associação com a soropositividade dos equinos para *B. caballi*, pois sabe-se que o carrapato *D. nitens* é vetor competente da *Babesia caballi* (MUJICA, 2002; ROBY; ANTHONY, 1963), sendo que o *A. sculptum* ainda não foi comprovado vetor competente tanto para este agente, quanto para *T. equi*, apesar de existirem evidências epidemiológicas citadas por Scoles et al. (2011) e Peckle et al. (2013) para este segundo agente. Convém ressaltar que, com o recente reconhecimento de que o anteriormente conhecido como *A. cajennense* na verdade se trata de um complexo com diferentes espécies, possuindo mesmas características morfológicas externas, no entanto com diferentes condições biológicas, envolvendo inclusive sucesso ou insucesso na fecundação de indivíduos provenientes de diferentes regiões, tem-se um vácuo que demandará investigações quanto a qual espécie dentre as deste complexo ocorrem em cada região, bem como qual a potencialidade destas como reservatórios e ou vetores dos diferentes patógenos comumente veiculados por carrapatos (NAVA et al., 2014).

Com relação ao controle de carrapatos adotado na AMAN, incluindo banhos com a base cipermetrina aplicados semanalmente, entre os meses de abril a outubro, e mensalmente, de novembro a março, associados com a aplicação de pastas à base de produtos carrapaticidas nos pavilhões auriculares e divertículos nasais desde o ano de 2005, observou-se diminuição na incidência de casos clínicos de Piroplasmose equina transmitida por *D. nitens* e causada por *B. caballi*, no rebanho (CAMPOS et al., 2013). Tal controle no entanto, voltado especificamente para carrapatos do gênero *A. sculptum* (LABRUNA et al., 2004) e *D. nitens*, aparentemente não impactou na soroprevalência para *T. equi*, comparando-se aos dados obtidos por Henriques (2006), com 85,96% de positividade na Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), comparando-se ao observado neste estudo (72,99%). Com relação a isso, há que se ressaltar que, provavelmente, a grande maioria dos equinos já chega na AMAN infectada pela *T. equi*. Desta maneira, a diminuição da infestação pelos carrapatos *A. sculptum* e *D. nitens* não iria interferir na sorologia da *T. equi*, visto as duas espécies de carrapatos possuem seus papéis ainda incertos como vetores desse agente (DENNING F., 1988, apud PFEIFER BARBOSA et al., 1995). Corroborando com isto, recente estudo também mostrou que ninfas de *A. sculptum* (Complexo *A. cajennense*) não se infectaram por *T. equi* após alimentarem-se em equinos cronicamente infectados (RIBEIRO et al., 2011). Além do banho

químico, uma prática de manejo que, certamente, miniza o risco de novas exposições e consequente aumento da resposta sorológica, é a manutenção dos rebanhos equinos totalmente afastados de rebanhos bovinos, diminuindo com isso a possibilidade do parasitismos pelo *R. microplus* (LABRUNA et al., 2001). Na ausência deste vetor, diminuem os riscos daqueles cavalos em estado de portadores assintomáticos tornarem-se uma ameaça para os animais livres da infecção, considerando a principal via de transmissão deste agente, que são os carrapatos.

Apesar de não reduzir a sorologia para *T. equi*, as populações de carrapatos *A. sculptum* e *D. nitens* aparentam terem sido muito impactadas pelo controle realizado há aproximadamente uma década de maneira ininterrupta, conforme pode ser verificado nos prontuários do Hospital Veterinário da AMAN, nos quais se verifica diminuição dos casos clínicos agudos causados pela *B. caballi*, visto ser o carrapato *D. nitens* um vetor competente para tal transmissão (MUJICA, 2002). Assim, conclui-se que o controle de carrapatos *A. sculptum* realizado na AMAN impactou significativamente a população de carrapatos, mas não a soroprevalência de *T. equi* no rebanho, mas diminuiu a ocorrência de casos clínicos agudos por *B. caballi*.

Somado a isto, também não foi evidenciada a associação entre o grau de infestação de carrapatos nos equinos e a soropositividade para *T. equi* no rebanho da AMAN. Desta forma, sugere-se que os carrapatos *A. sculptum* e *D. nitens* não sejam relevantes à manutenção desta enzootia no rebanho, ao contrário da *B. caballi* que apresentou maior soroprevalência nos equinos mantidos no rebanho da região Sudeste quando comparados com os equinos da região Sul. Tem-se que a transmissão por via iatrogênica, através de uso de seringas e agulhas contaminadas deverá ser considerada, mesmo com todos os cuidados relativos à biossegurança em todos os procedimentos invasivos nos equinos, como já foi relatado por Georges et al. (2012).

Algumas pesquisas também têm evidenciado o possível papel dos carrapatos *R. (B.) microplus* como vetores competentes para *T. equi* (GUIMARÃES et al., 1997; GUIMARÃES et al., 1998; UETI et al., 2005), havendo evidência epidemiológica que suporte tal afirmativa devido a ocorrência deste parasita em rebanho parasitado somente por este ectoparasita (SOUZA et al., 2000), bem como com a associação de equinos com bovinos, com presença de *R. (B.) microplus* e a soropositividade para *T. equi* nos animais (HEUCHERT et al., 1999). Entretanto, no rebanho da AMAN tal possibilidade é muito pouco provável, com o *R. (B.) microplus* desempenhando papel como vetor na manutenção da enzootia de *T. equi*, visto os equinos deste local serem criados sem contato com pecuária bovina. Fato contrário acontece no rebanho da Coudelaria do Rincão, onde o pastejo misto com bovinos é observado no manejo da propriedade, sendo o carrapato *R. (B.) microplus* a única espécie relatada nas fichas de informação dos animais. Ademais, não foi verificado parasitismo por *R. (B.) microplus* em nenhum equino do rebanho da AMAN.

Avaliando-se as variáveis que apresentaram significância na análise bivariada em modelo de regressão logística (análise multivariada), observou-se que somente o fator origem na Coudelaria do Rincão apresentou associação com a soropositividade para *T. equi* (OR 2,89; IC 1,34-6,19). Assim, a possibilidade dos animais chegarem positivos na AMAN deve ser considerada. Convém destacar que nenhum dos animais avaliados na região Sudeste nasceu no rebanho, sendo a maioria de origem de propriedades do Rio Grande do Sul, com maior porcentagem dos animais nascidos na Coudelaria do Rincão. Tal fato explica a associação positiva que existe entre a soropositividade para *T. equi* e a origem dos equinos no rebanho da Coudelaria do Rincão. Além da presença do vetor competente, outro fator que provavelmente mantém a prevalência de *T. equi* elevada na propriedade localizada no Rio Grande do Sul é a transmissão congênita, pois a Coudelaria do Rincão é um centro de reprodução, com vários nascimentos por ano. A transmissão transplacentária de *T. equi* em equinos é descrita por

Roncati (2006), Allsopp et al. (2007), Santos et al. (2008) e Georges et al. (2011).

A associação entre o pastejo misto com bovinos e a infestação dos equinos com carrapatos *R. (B.) microplus* no rebanho da Coudelaria do Rincão confirma os relatos de Bittencourt et al. (1990) e Franque et al. (2009) que, apesar de citarem que os equinos não são hospedeiros tão eficientes quanto os bovinos para esta espécie de carrapatos, são classificados como hospedeiros eventuais onde o ectoparasito poderá exercer hematofagia e desenvolver até uma geração, podendo, posteriormente, completar o seu ciclo nos bovinos. Tal característica somada aos relatos de Guimarães et al. (1997), Guimarães et al. (1998) e Ueti et al. (2005) fortalece os resultados encontrados, colocando o *R. (B.) microplus* como vetor competente para *T. equi* no rebanho da Coudelaria do Rincão, reforçado pela citação de Mason e Noval (1981), que demonstraram que a larva e o macho adulto do carrapato são capazes de trocar de um hospedeiro a outro em condições adversas, sugerindo a possibilidade destes se transferirem de animais infectados a não infectados, um aspecto significativo na epidemiologia da doença.

Essa associação de positividade dos equinos com o fator origem na Coudelaria do Rincão também foi observada por Henriques (2006) que identificou 85,96% de positividade por RIFI no rebanho da AMAN como um todo, sendo que tal índice diminuiu para 25% quando, foram analisados isoladamente, os 16 equinos da raça Bretão que eram integrantes do plantel naquela época e não tinham sua origem na Coudelaria do Rincão. Outro relato que confirma essa interferência de positividade para *T. equi* nos equinos oriundos no rebanho militar do Rio Grande do Sul foi encontrado no estudo realizado por Salvagni et al (2010) que encontrou soroprevalência pelo ELISA de 95% e positividade, via PCR, de 45% em equinos do Regimento Dragões da Independência, localizado em Brasília, região Centro-Oeste, e que possuem sua origem, na grande maioria, na Coudelaria do Rincão e não eram parasitados pelo *R. (B.) microplus*.

Para a *Babesia caballi*, verificou-se nesta análise estatística que a manutenção dos animais na região Sudeste apresenta associação com a soropositividade para o agente. Convém ser destacado que o rebanho da região Sul também apresentou 52,33% de positividade na sorologia e 0,33% na PCR, indicando que existe a presença da infecção e a exposição dos animais a este agente que está circulando naquele local. A presença de infestação somente pelo carrapato *R. (B.) microplus* sugere que o mesmo possa estar funcionando como dispersor da *B. caballi* no rebanho, corroborando com os achados de Battsetseg et al. (2002) que após identificarem, via PCR, *B. caballi* em ovos e larvas do carrapato sugeriram que o mesmo pudesse ser um vetor competente em sua transmissão.

Com relação à discrepância existente entre os resultados do ELISA e da PCR, refere-se muito ao que cada exame busca identificar segundo citações de Baldani et al. (2004), onde o primeiro procura identificar exposição prévia aos agentes e o segundo busca a infecção ativa, com o agente circulante no sangue dos equinos. Além disso, a dinâmica dos parasitas pode interferir nesses achados, quando no caso das infecções por *T. equi* os equinos tornam-se portadores assintomáticos, diferente da *B. caballi* que é "limpa" do organismo pelo sistema imune pelo agente ser pouco estável (NIZOLI, 2005). Assim sendo, os dados encontrados nos achados laboratoriais foram compatíveis com os encontrados por Rosales et al. (2013), com a PCR para *T. equi* sendo mais elevada que a *B. caballi*. Além disso, alguns resultados da PCR para *T. equi* em sangue total podem ser falso negativos, similar ao relatado por Ribeiro et al. (2013) que identificou alguns animais positivos pela PCR somente em sangue oriundo de punção esplênica, devido às características viscerotrópicas da *T. equi*.

6 CONCLUSÕES

A alta prevalência de animais positivos ao ELISA para *Theileria equi* indica que as áreas militares da Academia Militar das Agulhas Negras, município de Resende, estado do Rio de Janeiro, e da Coudelaria do Rincão, município de São Borja, estado do Rio Grande do Sul, são endêmicas para esta hemoparasitose, estando o rebanho equino em estabilidade enzoótica.

Os resultados obtidos, via PCR, indicam o elevado número de equinos portadores de *T. equi* nos rebanhos da AMAN e da Coudelaria do Rincão, e a alta prevalência de soropositividade e de equinos portadores de *T. equi* na AMAN está relacionada com a origem dos animais na Coudelaria do Rincão.

A associação entre o pastejo misto com bovinos e a sororeatividade para *T. equi*, evidenciam a possibilidade do carrapato *R. (B.) microplus* estar envolvido na transmissão deste agente.

Os resultados da PCR associados ao histórico da doença nos plantéis equinos indicam que a *Babesia caballi* apresenta baixa infecção ativa nos rebanhos, apesar de permanecerem com resposta sorológica indicativa de elevada exposição.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, 2008. 576p.

ABUTARBUSH, S. M.; ALQAWASMEH, D. M.; MUKBEL, R. M.; AL-MAJALI, A. M. Equine babesiosis: seroprevalence, risk factors and comparison of different diagnostic methods in Jordan. **Transbound Emergency Disease**, v. 59, p. 72-78, 2012.

AGUIRRE, D. H.; CAFRUNE, M. M.; RADA, M.; TORIONI ECHAIDE, S. Babesiosis clínica en equinos de Cerrilos, Salta, Argentina. **Revista de Investigaciones Agropecuarias**, v. 33, n. 3, p. 123-133, 2004.

ALHASSAN, A.; GOVIND, Y.; TAM, N.T.; THEKISOE, O.M.; YOKOYAMA, N.; INOUE, N.; IGARASHI, I. Comparative evaluation of the sensitivity of LAMP, PCR and in vitro culture methods for the diagnosis of equine piroplasmiasis. **Parasitology Research**, v. 100, n. 5, p. 1165–1168, 2007.

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.

ALSAAD, K.M. Acute babesiosis in foals. **Journal of Animal and Vetererinary Advances**, v. 8, n. 12, p. 2585-2589, 2009.

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, p. 319-324, 1999.

AYRES, M.; AYRES JR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. **BioEstat 5.0 - Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas**. Sociedade Civil Mamirauá, Tefé, 2007. 380p.

BALARIN, M.R.S.; LOPES, R.S.; KOHAYAGAWA, A.; LAPOSY, C.B.; FONTEQUE, J.H. Valores da Amplitude de Distribuição do Tamanho dos Eritrócitos (RDW) em equinos Puro Sangue Inglês (PSI) submetidos a exercícios de diferentes Intensidades. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 43, n. 5, p. 637-641, 2006.

BALDANI, C. D.; MACHADO, R. Z.; BOTTEON, P. T. L.; TAKAKURA, F. S.; MASSARD, C. L. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of IgG antibodies against *Babesia equi* in horses. **Ciência Rural**, v. 34, n. 5, p. 1525 – 1529, 2004.

BALDANI, C. D.; NAKAGHI, A. C. H.; MACHADO, R. Z. Occurrence of *Theileria equi* in horses raised in the Jaboticabal microregion, São Paulo State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 4, p. 228-232, 2010.

BAPTISTA, C.; LOPES, M. S.; TAVARES, A. C.; ROJER, H.; KAPPEMEYER, L.; MENDONÇA, D.; DA CAMARA MACHADO, A. Diagnosis of *Theileria equi* infections in

horses in the Azores using cELISA and nested PCR. **Ticks Tick Borne Disease**, v. 4, p. 242-245, 2013.

BARROS-BATTESTI, D.M.; ARZUA, M.; BECHARA, G.H. **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies**. 1ª ed. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan; 2006. 223p.

BASHIRUDDIN, J. B.; CAMMA, C.; REBELO, E. Molecular detection of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horse blood by PCR amplification of part of the 16S rRNA gene. **Veterinary Parasitology**, v. 84, p. 75-83, 1999.

BASTOS, K.M.S.; DAEMON, E.; FACCINI, J.L.H.; CUNHA, D.W. Efeito de diferentes temperaturas sobre a fase não parasitária de *Dermacentor (Anocentor) nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 5, n. 1, p. 29-32, 1996.

BATTSETSEG, B.; LUCERO, S.; XUAN, X.; CLAVERIA, F. G.; INOUE, N.; ALHASSAN, A.; KANO, T.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; MIKAMI, T.; FUJISAKI, K. Detection of natural infection of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* with *Theileria equi* and *Babesia caballi* in Brazilian horses using nested polymerase chain reaction. **Veterinary Parasitology**, v. 107, n. 4, p. 351-357, 2002.

BATTSETSEG, B.; XUAN, X.; IKADAI, H.; BAUTISTA, J. L.; BYAMBAA, B.; BOLDBAATAR, D.; BATTUR, B.; BATTSETSEG, G.; BATSUKH, Z.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; MIKAMI, T.; FUJISAKI, K. Detection of *Babesia caballi* e *Theileria equi* in *Dermacentor nuttalli* adults ticks. **Internacional Journal of Parasitology**, v. 31, n. 4, p. 384-386, 2001.

BELLO, A. C. P. P.; CUNHA, A. P.; LEITE, R. C.; OLIVEIRA, R. R.; RIBEIRO, A. C. C. L.; DOMINGUES, L. N.; FREITAS, C. M. V.; BASTIANETTO, E.; DALLAROSA, R. C. Controle de *Anocentor nitens* (NEUMANN, 1897) (ACARI:IXODIDAE) em equinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, n. 17, Supl 1, p. 59-63, 2008.

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 , p. 201–211, 2010.

BITTENCOURT, A. J.; FONSECA, A. H.; FACCINI, J. L. H.; BUENO, B. H. Comportamento do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari) em infestações artificiais e naturais em diferentes hospedeiros. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v. 13, p. 173-182, 1990.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; MASSARD, C.A. Aspectos epidemiológicos da babesiose Equina na microrregião Fluminense do Grande Rio-Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 4, n. 1, p. 13-17, 1997.

BOLDBAATAR, D.; XUAN, X.; BATTSETSEG, B.; IGARASHI, I.; BATTUR, B.; BATSUKH, Z.; BAYAMBAA, B.; FUJISAKI, K. Epidemiological study of equine piroplasmiasis in Mongolia. **Veterinary Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 29–32, 2005.

- BORGES, L.M.F.; LEITE, R.C. Comparação entre as populações auriculares e nasais de *Dermacentor nitens* (Neumann, 1897) oriundas de equinos de Minas Gerais e Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 2, n. 2, p. 109-110, 1993.
- BORGES, L.M.F.; OLIVEIRA, P.R.; RIBEIRO, M.F.B. Seasonal dynamics of *Anocentor nitens* on horses in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 89, n. 1, p. 165-171, 2000.
- BORGES, L.M.F.; OLIVEIRA, P.R.; RIBEIRO, M.F.B. Seasonal dynamics of the free-living phase of *Anocentor nitens* at Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 87, n. 1, p. 73-81, 1999.
- BÖSE, R.; JORGENSEN, W. K.; DALGLIESH, R. J.; FRIEDHOFF, K. T. DE VOS, A. J. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 57, n. 1-3, p. 61-74, 1995.
- BOTTEON, P. T. L., BOTTEON, R.C.C.M.; REIS, T.P.; MASSARD, C.L. Babesiose em cavalos atletas portadores. **Ciência Rural**, v. 35, n. 5, p. 1136-1140, 2005.
- BRÜNING, A. Equine piroplasmiasis: an update on diagnosis, treatment and prevention. **British Veterinary Journal**, v. 152, p. 139-151, 1996.
- BUTLER, C. Can *Theileria equi* be eliminated from carrier horses? **The Veterinary Journal**, v. 196, p. 279, 2013.
- CAMACHO, A. T.; GUITIAN, F. J.; PALLAS, E.; GESTAL, J. J.; OLMEDA, A. S. HABELA, M. A.; TELFORD, S. R.; SPIELMAN, A. *Theileria (Babesia) equi* and *Babesia caballi* infections in horses in Galicia, Spain. **Tropical Animal Health and Production**, v. 37, n. 4, p. 293-302, 2005.
- CAMPOS, C. H. C; PRADO, R. F. S.; SOARES, O. A. B.; COUTINHO, R. N.; MARQUES, F. S. Estudo epidemiológico da babesiose equina, antes e após o controle estratégico de carrapatos, no rebanho equino da Academia Militar das Agulhas Negras. **Revista Veterinária e Zootecnia em Minas**, Suplemento Especial, p. 51-54, 2013.
- CAMPOS, V. A. L.; McMANUS, C.; FUCK, B. H.; SILVA, L. F. A.; LOUVANDINI, H.; DIAS, L. T.; TEIXEIRA, R. A. Influência de fatores genéticos e ambientais sobre características reprodutivas do rebanho equino do Exército Brasileiro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 1, p. 16-22, 2007.
- CORDERO del CAMPILLO, M.; ALVAREZ, J. O.; VÁZQUEZ, F. A. R., DIAZ, A. E. Equine babesia infection in Spain. **Trabajos de la Estación Agrícola Experimental de León**, v. 11, n. 1, p. 11-22, 1974.
- COSTA, R. P.; MELLO, R. P. Nota prévia sobre a ocorrência de *Babesia caballi* (Nuttall, 1910) em *Equus caballus* no Brasil. **Veterinária**, v. 16, p. 74-75, 1963.
- CUNHA, A. P.; BELLO, A. C. P. P.; LEITE, R. C.; RIBEIRO, A. C. C. L.; FREITAS, C. M. V.; BASTIANETTO, E.; OLIVEIRA, P. R. Efeito do controle estratégico de *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787) (Acari: Ixodidae) sobre a população de *Anocentor nitens* (NEUMANN, 1897) (ACARI: Ixodidae) em equinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 4, p. 215-219, 2007.

- CUNHA, C. W.; DA SILVA, S. S.; PIMENTEL, C. A.; DAPPER, E. Avaliação da frequência de equinos soropositivos a *Babesia equi* no Jockey Club de Pelotas e em dois haras da zona sul do Rio Grande do Sul, RS. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 5, n. 2, p. 119-122, 1996.
- DA COSTA PEREIRA, M. A. V.; MASSARD, C.L.; FACCINI, J.L.H.; SIQUEIRA, L.F.G. Ocorrência de *Babesia equi* (LAVERAN, 1901) e *Babesia caballi* (NUTTALL & STRICKLAND, 1912) em equinos da raça Puro Sangue Inglês de pequenos estabelecimentos equestres. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, n. 4, p. 405-409, 2004.
- DA COSTA PEREIRA, M. A. V.; MASSARD, C.L.; FACCINI, J.L.H.; SIQUEIRA, L.F.G. Variação da sorotitulação ao teste de fixação de complemento para *Babesia equi* e *Babesia caballi* em equinos da Região Serrana do Rio de Janeiro. **ARS Veterinária**, v. 21, n. 3, p. 338-343, 2005.
- DA COSTA PEREIRA, M. A. V.; MASSARD, C. L.; VITA, G. F. Babesiose equina: Enzootia em Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 102, p. 165-167, 2007.
- DANTAS-TORRES, F.; CHOMEL, B.B.; OTRANTO, D. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 10, p.437-446, 2012.
- DENNING, F. Erfolgrlose Versuche zur Ubertragung von *Babesia equi* durch *Anocentor nitens* and *Amblyomma cajennense*. Thesis, Hannover School of Veterinary Medicine, 122 p. 1988. apud SOUZA, A. P.; BELLATO, V.; SARTOR, A.A.; SILVA, A.B. Prevalência de anticorpos anti-*Babesia equi* em equinos no Planalto Catarinense. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 119-121, 2000.
- DE WAAL DT, VAN HEERDEN J, POTGIETER FT. An investigation into the clinical pathological changes and serological response in horses experimentally infected with *Babesia equi* and *Babesia caballi*. **Onderstepoort Journal Veterinary**, v. 54, n. 4, p. 561–568, 1987.
- DE WAAL, D. T.; VAN HEERDEN, J. **Equine babesiosis**. In: Infectious Diseases of Livestock with Special Reference to South Africa, Oxford University Press, p.295–304., Cape Town, 1994 apud RUEGG, S. R. ; HEINZMANN, D.; BARBOUR, A.D.; TORGERSON, P. R. Estimation of the transmission dynamics of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses. **Parasitology**, v. 135, n. 5, p. 555–565, 2008.
- DE WAAL, D. T. Equine Piroplasmiasis: a review. **British Veterinary Journal**, v. 148, n. 1, p. 6–14, 1992.
- DE WAAL, D. T. The transovarial transmission of *Babesia caballi* by *Hyalomma truncatum*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 1, p. 99-100, 1990.
- DIANA, A.; GUGLIELMINI, C.; CANDINI, D.; PIETRA, M.; CIPONE, M. Cardiac arrhythmias associated with piroplasmiasis in the horse: A case report. **The Veterinary Journal**, v. 174, p. 193–195, 2007.
- DONNELLY, J.; JOYNER, L.P.; GRAHAM-JONES, O.; ELLIS, C.P. A comparison of the complement fixation and immunofluorescent antibody tests in a survey of the prevalence of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horses in the sultanate of Oman. **Tropical Animal Health and Production**, v. 12, p. 50-60, 1980.

EASLEY, J.R. Erythrogram and red cell distribution width of equidae with experimentally induced anemia. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, n. 11, p. 2378-2384, 1985.

EXÉRCITO BRASILEIRO - DLog. **Normas para o Controle de Equídeos no Exército**. Brasília: Ministério da Defesa, 2013, 50p.

FALCE, H. C. Infestações múltiplas por ixodídeos (Acari: Ixodidae) em bovinos e equídeos no primeiro planalto do Estado do Paraná. **Revista do Setor de Ciências Agrárias**, v. 5, n. 1-2, p. 11-13, 1986.

FRANQUE, M. P.; SANTOS, H. A.; MUJICA, F. F.; MASSARD, C. L. Infestação experimental de equinos por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Ciência Rural**, v. 39, n. 7, p. 2117- 2122, 2009.

FRIEDHOFF, K. T. Epidemiological aspects of equine babesiosis in a herd of horses of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 58, p. 1-8, 1995.

FRIEDHOFF, K. T.; SOULÉ, C. An account on equine babesiosis. **Revue Scientifique et Technique Office International Epizooties**, v. 15, n. 3, p. 1191–1201, 1996.

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

GARBA, U.M.; SACKY, A.K.B.; AGBEDE, R.I.S.; TEKDEK, L.B.; BISALLA, M. Hemogram changes in nigerian royal horses with natural piroplasmiasis. **Journal Indian Veterinary Association**, v. 9, n. 3, p. 5-9, 2011.

GARCIA-BOCANEGRA, I.; ARENAS-MONTES, A.; HERNANDEZ, E.; ADASZEK, L.; CARBONERO, A.; ALMERIA, S.; JAEN-TELLEZ, J.A.; GUTIERREZ-PALOMINO, P.; ARENAS, A. Seroprevalence and risk factors associated with *Babesia caballi* and *Theileria equi* infection in equids. **The Veterinary Journal**, v. 195, n. 2, p. 172-178, 2013.

GEORGES, K.C.; EZEOKOLI, C.D.; SPARAGANO, O.; PARGASS, I.; CAMPBELL, M.; D'ABADIE, R.; YABSLEY, M.J. A case of transplacental transmission of *Theileria equi* in a foal in Trinidad. **Veterinary Parasitology**, v. 175, p. 363–366, 2011.

GERSTENBERG, C.; ALLEN, W. R.; PHIPPS, L. P. Mechanical transmission of *Babesia equi* infection in a British herd of horse. 8 International Conferency on Equine Infectious Diseases. In: **Proceedings...Dubai**, Newmarket, R & W Publications, p. 217-222, 1998.

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

GRANDI, G.; MOLINARI, G.; TITTARELLI, D.; SASSERA, D.; KRAMER, L.H. Prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* Infection in Horses from Northern Italy. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 7, p. 955-956, 2011.

GRAUSE, J. F.; UETI, M. W.; NELSON, J. T.; KNOWLES, D. P.; KAPMEYER, L. S.; BUNN, T. O. Efficacy of imidocarb dipropionate in eliminating *Theileria equi* from experimental infected horses. **The Veterinary Journal**, v. 196, p. 541-546, 2013.

GUIMARÃES, A. M.; LIMA, J.D.; RIBEIRO, M.F.B.; CAMARGOS, E.R.S.; BOZZI, I.A. Ultrastructure of sporogony in *Babesia equi* in salivary glands of adult female *Boophilus microplus* ticks. **Parasitology Research**, v. 84, n. 4, p. 69-74, 1997.

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

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

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.

HENRIQUES, M. O. **Aspectos clínicos, laboratoriais e epidemiológicos da infecção natural por *Babesia equi* (Laveran, 1901) em equinos da Academia Militar das Agulhas Negras** 2006. 33 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

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

HINES, S. A.; RAMSAY, J. D.; KAPMEYER, L. S.; LAU, A. O. T.; 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. 33, p. 1-11, 2015.

HIRATO, K.; FRERICHS, W.M.; ALLEN, P.C. Studies on the complement fixation reaction for equine piroplasmiasis. **Japan Journal Veterinary Science**, v. 1, p. 204-207, 1945.

HOLBROOK, A.A.; ANTHONY, D.W. ; JOHNSON, A. J. Observations on the Development of '*Babesia caballi* (Nuttall) in the Tropical Horse Tick *Dermacentor nitens* (Neumann) **Journal Protozoology**, v. 15, n. 2, p. 391-396, 1968.

HOLBROOK, A.A. Biology of equine piroplasmiasis. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v. 155, n. 2, p. 453-454, 1969.

HOMER, M.J.; AGUILAR-DELFIN, I.; TELFORD, S.R.; KRAUSE, P.J.; PERSING, D.H. Babesiosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 3, p. 451-469, 2000.

HOURRIGAN, J.L.; KNOWLES, R.C. Equine piroplasmiasis (E.P.) **American Association of Equine Practitioners Newsletter**, v. 1, p. 119-128, 1979 apud RUEGG, S. R. ; HEINZMANN, D.; BARBOUR, A.D.; TORGERSON, P. R. Estimation of the transmission

dynamics of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses. **Parasitology**, v. 135, n. 5, p. 555–565, 2008.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal 2010**. Disponível em:<<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/ppm2010.pdf>>. Acessado em: 12 set. 2013.

IKADAI, H.; NAGAI, A.; XUAN, X.; IGARASHI, I.; KAMIO, T.; TSUJI, N.; OYAMADA, T.; SUZUKI, N.; FUJISAKI, K. Seroepidemiologic studies on *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in Japan. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 64, n. 4, p. 325-328, 2002.

JAFFER, O.; ABDISHAKUR, F.; HAKIMUDDIN, F.; RIYA, Q.; WERNERY, U.; SCHUSTER, R. K. A comparative study of serological tests and PCR for the diagnosis of equine piroplasmosis. **Parasitology Research**, v. 106, n. 3, p. 709-713, 2010.

KAPPMAYER, L.S.; THIAGARAJAN, M.; HERNDON, D.R.; RAMSAY, J.D.; CALER, E.; DJIKENG, A.; GILLESPIE, J.J.; LAU, A.; ROALSON, E.H.; SILVA, J.C.; SILVA, M.G.; SUAREZ, C.E.; UETI, M.W.; NENE, V.M.; MEALEY, R.H.; KNOWLES, D.P.; BRAYTON, K.A. Comparative genomic analysis and phylogenetic position of *Theileria equi*. **BMC Genomics**, v. 13, n. 603, p. 2-13, 2012.

KATZ, M.H. **Multivariate Analysis: A practical Guide for Clinicians**. 1^oed. Cambridge, Cambridge University, 1999. 192p.

KERBER, C. E.; FERREIRA, F.; PEREIRA, M.C. Control of equine piroplasmosis in Brazil. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 66, p. 123-127, 1999.

KERBER, C. E., LABRUNA, M.B.; FERREIRA, F.; DE WAAL, D.T.; KNOWLES, D.P.; GENNARI, S.M.. Prevalence of equine Piroplasmosis and its association with tick infestation in the State of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 4, p. 1-8, 2009.

KNOWLES, D.P. Equine babesiosis (Piroplasmosis): a problem in the international movement of horses. **British Veterinary Journal**, v. 52, n. 2, p. 123-126, 1996.

KNOWLES, D. P.; KAPPMAYER, L. S.; PERRYMAN, L. E. Specific immune responses are required to control parasitemia in *Babesia equi* infection. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 1909-1913, 1994.

LABRUNA, M.B.; KASAI, N.; FERREIRA, F.; FACCINI, J.LH.; GENNARI, S.M. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 105, n. 1, p. 65-77, 2002.

LABRUNA, M.B.; KERBER, C.E.; FERREIRA, F.; FACCINI, J.L.H.; DE WAAL, D.T.; GENNARI, S.M. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the State of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 97, n. 1, p. 1-14, 2001.

LABRUNA, M.B.; LEITE, R.C.; GOBESSO, A.A.O.; GENNARI, S.M.; KASAI, N. Controle estratégico do carrapato *Amblyomma cajennense* em equinos. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 195-200, 2004.

LEAL, D. C.; MADRUGA, C. R.; MATOS, P. F.; SOUZA, B. M. P. S.; FRANKE, C. R. Evaluation of PCR and multiplex PCR in relation to nested PCR for diagnosing *Theileria equi*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 7, p. 575-578, 2011.

LIMA, J. D., BIONDINI, J., REIS, R. Babesiose causada por *Babesia caballi* (Nuttall & Strickland, 1910) em um equino da raça Postier em Minas Gerais, Brasil. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, v. 28, n. 1, p. 87-92, 1976.

LIMA, R. A. S.; SHIROTA, R.; BARROS, G. S. C. **Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavallo**. São Paulo: Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada - ESALQ/USP. 2006. 251p.

LINHARES, G. F. C. **Aspectos biológicos e epidemiológicos das babesioses de equídeos, com ênfase à microrregião de Goiânia, Goiás, Brasil**. 1994. 105p. Tese (Doutorado em Ciência), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

LINHARES, G. F. C.; MASSARD, C. L.; ARAÚJO, J. L. B. Estudos sobre a epizootiologia de *Babesia caballi* (Nuttall; Strickland, 1910) na microrregião de Goiânia, Estado de Goiás. **Anais da Escola de Agronomia e Veterinária**, v. 27, n. 2, p. 27-33, 1997.

MACHADO, R. Z.; TOLEDO, C. Z. P.; TEIXEIRA, M. C. A.; ANDRÉ, M. R.; FRESCHI, C. R.; SAMPAIO, P. H. Molecular and serological detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in donkeys (*Equus asinus* in Brazil). **Veterinary Parasitology**, v. 186, p. 461–465, 2012.

MAHONEY, D. F.; ROSS, D. F. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. **Australian Veterinary Journal**, v. 48, n. 5, p. 292-298, 1972.

MANGOLD, A. J. GUGLIELMONE, A. A.; HUEDA, R. C. Hallazgo de *Anocentor nitens* Neuman, 1987, en la provincia de Jujuy. Comunicación previa. **Veterinary Argentina**, v. 3, p. 880-881, 1986.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Equídeos**. Disponível em:< <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>>. Acessado em: 04 jan 2014.

MARTIN, R. Equine piroplasmiasis: the temporary importation of seropositive horses into Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 77, p. 308-309, 1999.

MASON, C. A.; NOVAL, R. The transfer of *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae) from infested to uninfested cattle under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 8, p. 185-188, 1981.

MCLAUGHLIN, G. L.; MONTENEGRO-JAMES, S.; VODKIN, M. H.; HOWE, D.; TORO, M.; LEON, E.; ARMIJOS, R.; KAKOMA, I.; GREENWOOD, B.M.; HASSAN-KING, M.; MARICH, J.; RUTH, J.; JAMES, M. A. Molecular approaches to malaria and babesiosis diagnosis. **Memórias do Instituto Oswaldo**, v. 87, sup. 3, p. 57-68, 1992.

MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein, **Parasitology Research**, v. 84, n. 6, p. 467-475, 1998.

MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. The piroplasma: life cycle and sexual stage. **Advance in Parasitology**, v. 23, p. 37-103, 1985.

MUJICA, F. F. ***Babesia caballi* (Nutall & Strickland,1912): patogenicia, transmissão e alterações hemocitárias no carrapato *Anocentor nitens* (Neumann, 1897), vetor biológico nas Américas.** 2002. 80p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária - Parasitologia Animal), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

MUJICA, F. F.; PERRONE, T.; FORLNANO, M.; CORONADO, A.; MELÉNDEZ, R.D.; BARRIOS, N.; ÁLVAREZ, R.; GRANDA, F. Serological prevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in horses of Lara State, Venezuela. **Veterinary Parasitology**, v. 178, p. 180-183, 2011.

MUNKHJARGAL, T.; SIVAKUMAR, T.; BATTSETSEG, B.; NYAMJARGAL, T.; ABOULAILA, M.; PUREVTSEREN, B.; BAYARSAIKHAN, D.; BYAMBAA, B.; TERKAWI, M. A.; YOKOYAMA, N.; IGARASHI, I. Prevalence and genetic diversity of equine piroplasms in Tov province, Mongolia. **Infection and Genetic Evolution**, v. 16, p. 178-185, 2013.

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

NAVA, S.; BEATI, L.; LABRUNA, M. B.; CACERES, A. G.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n.sp, *Amblyomma interandinum* n.sp, *Amblyomma patinoi* n.sp, and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844, and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 3, p. 252-276, 2014.

NEITZ, W.O. Classification, transmission and biology of piroplasms of domestic animals. **Annals New York Academic Science**, v. 64, n. 2, p. 56-111, 1956.

NIZOLI, L. Q. **Alterações hematológicas e humorais de equinos expostos à infecção por *Babesia equi*, na região sul do Rio Grande do Sul.** 2005. 39 p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

NIZOLI, L. Q.; GOTZE, M. M.; FELIX, S. R.; SILVA, S. S.; NOGUEIRA, C. E. W. Frequency of seropositive equines for *Theileria equi* in the Southern Rio Grande do Sul State, Brazil. **Parasitology Latinoamerican**, v. 63, p. 46-50, 2008.

NOGUEIRA, C. E. W.; SILVA, S. S.; NIZOLI, L. Q.; RIBAS, L. M.; ALBUQUERQUE, L. P. A. N. Efeito quimioprolático do dipropionato de imidocarb na prevenção da agudização de babesiose equina em cavalos portadores da infecção. **A Hora Veterinária**, v. 25, n. 146, 2005.

O'DWYER, L. H. Piroplasmasida – *Babesia* spp. In: MONTEIRO, S.G. **Parasitologia na Medicina Veterinária**. 1. ed. São Paulo: Roca, p. 159-168, 2010.

OIE. **Organização Internacional de Epizootias.** disponível em: <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal Health in the World/docs/pdf/EQUINE PRIOPLOSMOSIS_FINAL.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/EQUINE_PRIOPLOSMOSIS_FINAL.pdf)>. acessado em 30 Nov 2013.

OLIVEIRA, J. E. G. **Assimetrias e semelhanças da criação de equinos no sul do Brasil (RS) e na Argentina: aspectos produtivos, sanitários e comerciais.** 2012. 82p. Tese (Doutorado em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

OLIVEIRA, J. E. G. **Planejamento otimizado da alimentação para um sistema de produção de equinos em pastejo.** 2007. 93p. Dissertação (Mestrado em Agronegócios), Universidade de Brasília, Brasília, DF.

PECKLE, M.; PIRES, M.S.; SANTOS, T.M.; ROIER, E.C.R.; DA 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, p. 2017–2025, 2013.

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

PFEIFER-BARBOSA, I.B.; FRIEDHOFF, K.T.; MASSARD, C.L.; LINHARES, G.F.C. Diagnosis of natural infection with *Babesia caballi* (Nuttall & Strickland, 1910) in horses and *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) in Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v. 15, n. 1, p. 105-107, 1992.

PFEIFER-BARBOSA, I.B.; MOLNAR, L.E.; DIAS TAVARES, H.L. Determination of the serological prevalence of equine babesioses by ifa test in the state of Pará, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 9, n. 1, p. 7-10, 2000.

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

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

PIOTTO, M. A. **Determinação da infecção por *Theileria equi* e *Babesia caballi* em equinos alojados no Jockey Clube de São Paulo por meio da técnica de C- ELISA (Competitive Enzyme Linked Immunosorbent Assay)** 2009. 63p. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária), Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

POTGIETER, F. T.; WALL, D. T.; POSNETT, E. S. Transmission and diagnosis of equine babesiosis in South África. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, sup. 3, p. 139-142, 1992.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2009. ISBN 3-900051-07-0, Disponível em: <http://www.R-project.org>. Acesso em 31 de janeiro de 2010.

- RAMPERSAD, J.; CESAR, E.; CAMPPELL, M.D.; SAMLAL, M.; AMMONS, D. A field evaluation of PCR for the routine detection of *Babesia equi* in horses. **Veterinary Parasitology**, v. 114, n. 2, p. 81–87, 2003.
- REHBEIN, G.; HEIDRICH-JOSWIG, S. Use os schizont and piroplasm antigens of *Babesia equi* in the indirect fluorescent antibody and complement fixation tests. **Veterinary Parasitology**, v. 12, p. 135-144, 1983.
- RIBEIRO, I. B.; CAMARA, A. C.; BITTENCOURT, M. V.; MARCOLA, T. G.; PALUDO, G. R.; SOTO-BLANCO, B. Detection of *Theileria equi* in spleen and blood asymptomatic piroplasm carrier horses. **Acta Parasitology**, v. 58, p. 218-222, 2013.
- RIBEIRO, M. F. B.; SAITO, J. F.; PIMENTEL, P. V. Babesiose equina I – Primo-infecção de potros em área endêmica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 47, n. 5, p. 641-647, 1995.
- RIBEIRO, M. F. B.; SILVEIRA, J. A. G.; BASTOS, C. V. Failure of the *Amblyomma cajennense* nymph to become infected by *Theileria equi* after feeding on acute or chronically infected horses. **Experimental Parasitology**, v. 128, p. 324–327, 2011.
- RIEK, R. F. The life cycle of *Babesia argentina* (Lignieres, 1903)(Sporozoa: Piroplasmidae) in the tick vector *Boophilus microplus*(Canestrini). **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 17, p. 247-254, 1966.
- RISTIC, M. **Equine babesiosis and trypanosomiasis**. Michigan State University, 1985 apud DE WAAL, D. T. Equine Piroplasmosis: a review. **British Veterinary Journal**, v. 148, n. 1, p. 6–14, 1992.
- ROBY, T. O.; ANTHONY, D. W. Transmission of equine piroplasmosis by *Dermacentor nitens* Neumann. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 142, p. 768-769, 1963.
- ROCHA, J. M.; COSTA, N. A.; VIEIRA FILHO, H.; ALENCAR, S. P. Diagnóstico da babesiose por *Babesia caballi* no Município de Garanhuns - PE. XXI Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Salvador. In: **Anais...CONBRAVET**: Salvador. p. 202, 1988.
- RONCATI, N. V. **Ocorrência de *Theileria equi* congênita em potros Puro Sangue Lusitano no Brasil, diagnosticada através da técnica RT-PCR**. 2006. 71p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- ROSALES, R.; RANGEL-RIVAS, A.; ESCALONA, A.; JORDAN, L. S.; GONZATTI, M. I.; ASO, P. M.; PERRONE, T.; SILVA-ITURRIZA, A.; MIJARES, A. Detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in Venezuelan horses using Competitive-Inhibition ELISA and PCR. **Veterinary Parasitology**, v. 196, p. 37-43, 2013.
- ROTHSCHILD, C.M. Equine Piroplasmosis. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, p. 497-508, 2013.
- RUBINO, G.; CITO, A. M.; LACINIO, R.; BRAMANTE, G.; CAROLI, A.; PIERAGOSTINI, E.; PETAZZIA, F. Hematology and Some Blood Chemical Parameters as a Function of Tick-Borne Disease (TBD) Signs in Horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 26, n. 10, p. 475-480, 2006.

- RÜEGG, S. R. ; HEINZMANN, D.; BARBOUR, A.D.; TORGERSON, P. R. Estimation of the transmission dynamics of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses. **Parasitology**, v. 135, n. 5, p. 555–565, 2008.
- RÜEGG, S.R.; TORGERSON, P.R.; DEPLAZES, P.; MATHIS, A. Age-dependent dynamics of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in southwest Mongolia based on IFAT and/or PCR prevalence data from domestic horses and ticks. **Parasitology**, v. 134, n. 7, p. 939–947, 2007.
- RÜEGG, S. R.; TORGERSON, P .R.; DOHERR, M. G.; DEPLAZES, P.; BÖSE, R.; ROBERT, N.; WALZER, C. Equine piroplasmoses at the reintroduction site of the Przewalski's horse (*Equus ferus przewalskii*) in Mongolia. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 42, n. 3, p. 518–526, 2006.
- SALIM, B. O. M.; HASSAN, S.M.; BAKHEIT, M.A.; ALHASSAN, A.; IGARASSHI, I.; KARANIS, P.; ABDELRAHMAN, M.B. Diagnosis of *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses in Sudan using ELISA and PCR. **Parasitology Research**, v. 103, p. 1145-1150, 2008.
- SALVAGNI, C. A.; DAGNONE, A. S.; GOMES, T. S.; MOTA, J. S.; ANDRADE, G. M.; BALDANI, C. D.; MACHADO, R. Z. Serologic evidence of equine granulocytic anaplasmosis in horses from central West Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 3, p. 135- 140, 2010.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2.ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2002. 265p.
- SANAVRIA, A.; PRATA, M.C.A. Ensaio metodológico para estudo do ciclo biológico do *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae) em equinos experimentalmente infestados. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 5, n. 2, p. 91-93, 1996.
- SANTOS, T. M.; FERRAZ, P. N.; ALMEIDA, F. Q.; MASSARD, C. L.; BALDANI, C. D.; BOTTEON, P. T. L.; SANTOS, H. A.; MACHADO R. Z.; ANDRADE, C. M. Estudo comparativo de três métodos de diagnóstico para detecção de anticorpos anti-*Theileria equi* em equinos de áreas endêmicas do estado do Rio de Janeiro. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 6, p. 484-490, 2009.
- SANTOS, T. M.; ROIER, E. C. R.; SANTOS, H. A.; PIRES, M. S.; VILELA, J. A. R.; MORAES, L. M. B.; ALMEIDA, F. Q.; BALDANI, C. D.; MACHADO, R. Z.; MASSARD, C. L. Seroprevalence and factors associated to *Theileria equi* in equids of Itaguaí and Serrana microregions, Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 2, p. 1-7, 2011.
- SANTOS, T. M.; SANTOS, H. A.; MASSARD, C. L. Diagnóstico molecular de babesiose congênita em potros neonatos no estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, Supl. 1, p. 348-350, 2008.
- SCHEIN, E. Equine babesiosis. In : **Babesiosis of domestic animals and man**. M. Ristic. Boca Raton. CRC, Press, p. 197-208, 1988.

- 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. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 10, p. 1903-1905, 2011.
- SEO, M.G.; YUN, S.H.; CHOI, S.K.; CHO, G.J.; PARK, Y.S.; KWON, O.D.; CHO, K.H.; KIM, T.H.; JEONG, K.S.; PARK, S.J.; KWON, Y.S.; KWAK, D. Seroprevalence of equine piroplasms in the Republic of Korea. **Veterinary Parasitology**, v. 179, p. 224–226, 2011.
- SEVINC, F.; MADEN, M.; KUMAS, C.; SEVINC, M.; EKICI, O.D. A comparative study on the prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in horse sub-populations in Turkey. **Veterinary Parasitology**, v. 156, p. 173-177, 2008.
- SIGG, L.; GERBER, V.; GOTTSTEIN, B.; DOHERR, M.G.; FREY, C.F. Seroprevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in the Swiss horse population. **Parasitology International**, v. 59, p. 313–317, 2010.
- SIMPSON, C. F.; KIRKHAM, W. W.; KLING, J. M. Comparative morphologic features of *Babesia caballi* and *Babesia equi*. **American Journal Veterinary Science**, v. 28, n. 127, p. 1693-1697, 1967.
- SOULE, C.; PERRET, C.; DORCHIES, P. Les babesioses equines: bilan des examens sérologiques réalisés en France (1974-1988). **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 141, n. 5, p. 355-359, 1990.
- SOUZA, A. P.; BELLATO, V.; SARTOR, A. A.; SILVA, A.B. Prevalência de anticorpos anti-*Babesia equi* em equinos no Planalto Catarinense. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 119-121, 2000.
- SOUZA, A. P; SERRA-FREIRE, N. M. Variação sazonal da fase não parasitária de *Amblyomma cajennense* e *Anocentor nitens* no município de Itaguaí, RJ: Avaliação epidemiológica e metodológica. **Revista Universidade Rural: Série Ciência vida**, v. 16, n. 1-2, p. 67-74, 1994.
- SOUZA, A. P; SERRA-FREIRE, N. M. Variação sazonal dos estádios adultos de *Amblyomma cajennense* e *Anocentor nitens*, como parasitas de cavalos, no município de Itaguaí, RJ, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 1, n. 1, p. 31–34, 1992.
- TENTER, A. M.; FRIEDHOFF, K. T. Serodiagnosis of experimental and natural *Babesia equi* and *Babesia caballi* infections. **Veterinary Parasitology**, v. 20, p. 49-61, 1986.
- TENTER, A. M.; OTTE, M. J.; GONZALEZ, C. A.; ABUABARA, Y. Prevalence of piroplasmosis in equines in the Colombian province of Córdoba. **Tropical Animal Health and Production**, v. 20, p. 93-98, 1988.
- THRUSFIELD, M. V. **Veterinary epidemiology**. 2nd. ed. Oxford: Blackwell, 1995. 479p.
- TORRES, A. J.; FINGER, I. S.; FARIAS, N. A. R.; NIZOLI, L. Q. ; SILVA, S. S.; NOGUEIRA, C. E. W. Aspectos epidemiológicos da Theileriose equina e sua relação com o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em duas propriedades na região da campanha

do Rio Grande do Sul - Brasil. **Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitologia**, v. 71, n. 1, p. 70-77, 2012.

UETI, M. W.; MEALEY, R.H.; KAPPMAYER, L.S.; WHITE, S.N.; MCWHIRTER, N.K.; PELZEL, A.M.; GRAUSE, J.F.; BUNN, T.O.; SCHWARTZ, A.; TRAUB-DARGATZ, J.L.; HENDRICKSON, A.; ESPY, B.; GUTHRIE, A.J.; FOWLER, W.K.; KNOWLES, D.P. Re-Emergence of the Apicomplexan *Theileria equi* in the United States: Elimination of Persistent Infection and Transmission Risk. **Plos One**, v. 7, n. 9, 2012.

UETI, M. W.; PALMER, G.H.; KAPPMAYER, 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.

UILENBERG, G. *Babesia* - A historical overview. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 1, p. 3-10, 2006.

URCELAY, S.; CORREA, J.; RUDOLPH, W. Piroplasmose em caballos de carrera: estudio serológico en criaderos de La Provincia de Santiago. **Boletín Chilileno de Parasitología**, v. 28, p. 6-9, 1973.

VASCONCELOS, M. F. **Estudo da infecção por *Babesia* spp. em cães da região periurbana de Brasília, Distrito Federal**. 2010. 85p. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal), Universidade de Brasília, Brasília-DF.

XU, Y; ZHANG, S.; HUANG, X.; BAYING, C.; XUAN, X.; IGARASHI, I; FUJISAKI, K. KABEYA, H.; MARUYAMA, S. MIKAMI, T. Seroepidemiologic studies on *Babesia equi* and *Babesia caballi* infections in horses in Jilin province of China. **Journal Veterinary Medical Science**, v. 65, n. 9, p. 1015–1017, 2003.

XUAN, X.; CHAHAN, B.; HUANG, X.; YOKOYAMA, N.; MAKALA, L.H.; IGARASHI, I.; FUJISAKI, K.; MARUYAMA, S.; SAKAI, T.; MIKAMI, T. Diagnosis of equine piroplasmosis in Xinjiang province of China by the enzyme-linked immunosorbent assays using recombinant antigens. **Veterinary Parasitology**, v. 108, p. 179–182, 2002.

ZOBBA, R.; ARDU, M.; NICCOLINI, S.; CHESSA, B.; MANNA, L.; COCCO, R.; PARPAGL, M.L.P. Clinical and Laboratory Findings in Equine Piroplasmosis. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, n. 5, p. 301-308, 2008.

CAPÍTULO II

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE *Borrelia* spp. EM EQUINOS DE USO MILITAR DO MUNICÍPIO DE RESENDE, ESTADO DO RIO DE JANEIRO E SÃO BORJA, ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

RESUMO

Com o objetivo de avaliar os aspectos epidemiológicos da ocorrência de *Borrelia* spp. em equinos mantidos em unidades militares no Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, foram coletadas amostras de sangue e carrapatos. Nas amostras de soro, verificou-se, por ELISA, a ocorrência de anticorpos anti *Borrelia burgdorferi* cepa G39/40. Foi verificada a ocorrência de *Amblyomma sculptum*, *Dermacentor nitens* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em diferentes níveis de infestação. Em relação aos resultados da sorologia para *Borrelia* spp., observou-se soroprevalência de 39,24% (n=186/474), sendo a frequência maior no rebanho da região Sul, com 44,66% (n=134/300), em comparação com o da região Sudeste (29,88%; n=52/174). As fêmeas (p<0,05; OR=1,96; IC: 1,25 – 3,08) e os animais com menos de 5 anos na propriedade (p<0,05; OR=2,67; IC: 1,14 - 6,26) tendo como origem a Coudelaria do Rincão (p<0,05; OR=2,33; IC: 1,17 – 4,62), associados ao pastejo misto com bovinos e a presença do carrapato *R. microplus* parasitando equinos, foram os fatores mais relacionados com a soropositividade. A evidência de circulação de borrelíias com soroprevalência nos equinos reforça seu papel como sentinelas, sendo fator de alerta para potencial ocorrência de casos humanos. Os resultados obtidos reforçam a importância da vigilância epidemiológica dos carrapatos vetores e sua associação tanto com agentes infecciosos de risco para a saúde do efetivo militar humano, como nos equinos de uso militar nas regiões avaliadas. Isto também realça a necessidade da adoção de medidas de proteção coletivas e individuais visando mitigar o risco de doenças transmitidas por carrapatos em atividades militares.

Palavras-chave: Borrelioses, zoonoses, equinos de uso militar

ABSTRACT

In order to assess the epidemiological aspects of the occurrence of *Borrelia* spp. in horses kept in military units in Rio de Janeiro and Rio Grande do Sul, blood samples and ticks were collected and processed. In the serum samples, it was assessed by ELISA assay, the occurrence of antibodies against *Borrelia burgdorferi* strain G39/40. *Amblyomma sculptum*, *Dermacentor nitens* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* occurrence was assessed at different levels of infestation. Regarding the results of the serology for *Borrelia* spp., there was a prevalence of 39.24% (n = 186/474), with higher frequency in the herd of the South, with 44.66% (n = 134/300), when compared to the Southeast herd (29.88%, n = 52/174). Females (p <0.05; OR = 1.96, CI: 1.25 to 3.08) with less than 5 years on the property (p <0.05; OR = 2.67; CI: 1, 14 to 6.26) originated from the “Coudelaria do Rincão” (p <0.05; OR = 2.33, CI: 1.17 to 4.62) associated with grazing with cattle and the presence of the tick *R. microplus* were the factor most related to seropositivity. Evidence of *Borrelia* circulation with seroprevalence in horses reinforces its role as sentinels, as alert factor for potential occurrence of human cases. These results support the importance of epidemiological surveillance of vector ticks and its association with agents of risk to the health of horses for military use, in the evaluated areas. This also highlights the need to adopt collective and individual protection measures to mitigate the risk of tick-borne diseases in military activities.

Keywords: Borreliosis, zoonosis, horses for military use

1 INTRODUÇÃO

Bactérias espiroquetas do gênero *Borrelia* causam diversos tipos de doenças em humanos, animais domésticos e silvestres em todo o mundo, sendo a mais conhecida delas a Borreliose de Lyme ou Doença de Lyme. A Borreliose de Lyme é uma doença transmitida por carrapatos, de natureza grave e altamente mórbida, causada por bactérias do gênero *Borrelia*, de caráter multissistêmico, sendo um sério problema de saúde pública em muitos países. É endêmica em regiões temperadas como o nordeste dos Estados Unidos, regiões central e oriental da Europa, assim como na Ásia oriental. Nestas regiões, a Doença de Lyme é causada basicamente por borrelíias do grupo *Borrelia burgdorferi* sensu lato (YOSHINARY et al., 2010).

Somente nos Estados Unidos, entre os anos de 2000 a 2010, mais de 250 mil casos humanos de Doença de Lyme foram registrados. No Brasil uma doença similar à Doença de Lyme do hemisfério norte, aparentemente causada por uma forma de borrelíia, tem chamado a atenção desde 1989, sendo atualmente designada de Síndrome de Baggio-Yoshinari (SBY).

Em nosso país a epidemiologia desta doença, devido à característica clínico-epidemiológica diversa, em relação à Doença de Lyme clássica, necessita ser melhor estudada e compreendida. Havendo necessidade de melhor caracterizar seus reais vetores, hospedeiros reservatórios e animais sentinelas, bem como os fatores de risco associados, no intuito de buscar medidas adequadas de prevenção.

A despeito de ser uma doença multissistêmica, de sérios impactos em saúde pública, causando prejuízos psico-sociais e econômicos, ela ainda é tida como doença negligenciada. Além disso, as borrelioses causam prejuízos à saúde animal, sendo causadoras de abortos, osteoartrites, uveítes recorrentes e doenças musculares e neurológicas.

No Brasil, estudos epidemiológicos tem demonstrado soropositividade para *Borrelia* spp. em humanos, assim como em diversos animais silvestres e domésticos, que podem estar funcionando como hospedeiros reservatórios e carreadores de carrapatos infectados. Apesar de se ter evidências epidemiológicas da presença e circulação de borrelíias em humanos e em diversos animais potencialmente envolvidos em sua epidemiologia, seu real agente etiológico ainda está por ser confirmado, isolado e caracterizado.

O papel dos equinos na epidemiologia das borrelioses ainda está por ser mais bem elucidado. Entretanto, estudos tem demonstrado que, em regiões endêmicas de Doença de Lyme na Europa e América do Norte, há altas taxas de soroprevalência em equinos. Isto, aliado ao fato de que se têm encontrado rebanhos de equinos brasileiros com soroprevalências semelhantes às dos de áreas endêmicas para Doença de Lyme em outros países, nos alerta para possibilidade de que tal quadro esteja ocorrendo em nosso país.

Ademais, os carrapatos vetores *Ixodes* spp. que transmitem a Doença de Lyme são bastante inespecíficos e parasitam cavalos e também humanos nestas regiões, havendo relatos de casos da doença relacionados a histórico de contato com equinos. Isto evidencia que os equinos, além de sentinelas, podem ser hospedeiros reservatórios competentes.

No Brasil, o carrapato que comumente acomete equinos, *Amblyomma sculptum* (Complexo *Amblyomma cajennense*), tem sido proposto como possível vetor de *Borrelia* spp. Tal carrapato, à semelhança do *Ixodes* spp., é bastante inespecífico, acometendo seres humanos principalmente na sua fase de ninfa.

O Exército Brasileiro possui, atualmente, um rebanho aproximado de 2000 equinos distribuídos por todo o território nacional, sendo que, o único haras responsável pela reprodução é a Coudelaria do Rincão, localizada no município de São Borja, estado do Rio

Grande do Sul, que distribui os seus produtos para todas as demais unidades militares que possuem efetivo equino no Brasil.

Doenças zoonóticas transmitidas por carrapatos são um sério problema em saúde pública sendo, sob a ótica militar, de grande preocupação considerando a operacionalidade das tropas e, conseqüentemente, a segurança nacional. As Forças Armadas modernas têm centros de pesquisas entomológicas que realizam o monitoramento de vetores, e das doenças transmitidas por estes, dentro de seu território ou em territórios estrangeiros, previamente ao envio de tropas.

As Forças Armadas brasileiras têm atentado para as questões como a biossegurança em operações militares, visando à proteção das tropas, a garantia da saúde dos soldados e a manutenção de sua operacionalidade. Dentro deste contexto, as doenças transmitidas por carrapatos têm ganhado destaque, dado o elevado risco de infestação a que militares ficam expostos quando em operações em áreas de campos e matas.

Os equinos de uso militar, durante sua utilização em operações militares, patrulhamento de fronteiras, ou mesmo instruções militares, são expostos a ambientes e situações que podem aumentar o risco de contraírem doenças zoonóticas transmitidas por carrapatos. Aliado a isto, o íntimo contato dos animais com os militares durante longos períodos no transcorrer de tais exercícios pode favorecer a ocorrência de casos humanos destas doenças. Desta maneira, além de atuarem como sentinelas epidemiológicas, eles podem agir como carreadores de carrapatos infectados e, até mesmo, como hospedeiros reservatórios, aumentando o risco de infecção nos humanos.

Assim, este estudo epidemiológico acerca da soroprevalência para *Borrelia* spp. em rebanhos de equinos de uso militar das regiões Sudeste e Sul do Brasil objetivou verificar a circulação destes agentes nos equinos das regiões estudadas, auxiliar no clareamento da sua real relevância como sentinelas, e revelar os fatores de risco para a soropositividade nos equinos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Sistemática e Características do Gênero *Borrelia*

As borrelíias são microrganismos pertencentes ao domínio *Bacteria*, filo Espiroquetas, ordem *Spirochaetales*, família *Spirochaetaceae*. O filo Espiroquetas possui oito gêneros classificados com base em seu hábitat, incluindo o gênero *Borrelia* (MADIGAN et al., 2008). Dentre estes oito gêneros, três se destacam pela importância médica: *Treponema*, *Leptospira* e *Borrelia* (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Os espiroquetas são bactérias gram-negativas, móveis, helicoidais, muito espiralados, finos e flexíveis. Suas células são constituídas por um cilindro protoplasmático, consistindo em regiões delimitadas pela parede celular e membrana. Sua motilidade é conferida por flagelos (endoflagelos) que emergem de cada pólo e dobram-se sobre o cilindro protoplasmático, sendo, o cilindro e os flagelos, envoltos por membrana flexível de multicamadas (bainha externa), ficando os flagelos no espaço periplasmático. Tais estruturas conferem aos espiroquetas um movimento, em ambiente líquido, espasmódico e irregular, por meio de flexões, movimentos tipo “saca-rolhas” e chicoteios (MADIGAN et al., 2008).

O gênero *Borrelia* compreende espécies que são, em sua maioria, patogênicas aos homens e aos animais, sendo transmitidas por artrópodos, principalmente por picada de carrapatos ou através de piolhos. Elas pertencem a uma linhagem de espiroquetídeos (ordem *Spirochaetales*), e formam um grupo estreitamente relacionado dentro da família *Spirochaetaceae* (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

A morfometria pode ser utilizada para a realização da diferenciação entre as espiroquetas do gênero *Borrelia* e os demais gêneros da família *Spirochaetaceae*, visto que as borrelíias são as maiores delas (BARBOUR; HAYES, 1986). Também, através de microscopia eletrônica, é possível a diferenciação via visualização dos flagelos, com as borrelíias possuindo um maior número de flagelos periplasmáticos, entre 15 a 20, e menor número de espiras (PFISTER et al., 1994). Além disso, podem ser diferenciadas pelo baixo conteúdo de guanina e citosina no seu DNA, além de características ecológicas e bioquímicas (BARBOUR; HAYES, 1986).

As borrelíias medem de 5 a 25 μm de comprimento e de 0,2 a 0,5 μm de diâmetro, possuem de 7 a 20 endoflagelos; são microaerófilas, porém capazes de crescer em condições de anaerobiose, e se reproduzem por fissão binária transversal (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Estas bactérias crescem à temperatura de 33°C em meios artificiais, podendo ser visualizadas à microscopia de campo escuro, contraste de fase e em tecidos por impregnações à base de prata (BARBOUR; HAYES, 1986; QUINN et al., 2002). Destacam-se de outras espiroquetas e de outras bactérias por terem plasmídeo e DNA cromossômico lineares e não circulares (HARVEY et al., 2008). A *Borrelia burgdorferi* tem, em sua membrana externa, uma série de lipoproteínas denominadas Osp (*outer surface protein*), sendo OspA, OspB, OspC e OspD as de maior relevância, e as duas primeiras as mais abundantes (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Os grupos das doenças ocasionadas pelas borrelioses, as espécies de borrelíias que as ocasionam, seus vetores, hospedeiros e sua distribuição são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Grupos das doenças ocasionadas pelas borrelioses, espécies, vetores, hospedeiros e distribuição (FONSECA et al., 2005).

Doenças	Agentes etiológicos	Vetores	Hospedeiro	Distribuição Geográfica
Febre recorrente epidêmica	<i>B. recurrentis</i>	<i>Pediculus humanus</i>	Homem	Cosmopolita
Febre recorrente endêmica	<i>Borrelia</i> spp.*	<i>Ornithodoros</i> sp.	Roedores e homem	Cosmopolita
Borreliose aviária	<i>B. anserina</i>	<i>Argas</i> sp.	Aves e passaros	Cosmopolita
Borreliose bovina	<i>B. theileri</i>	<i>Boophilus</i> sp.	Bovinos, ovinos e equinos	Cosmopolita
Aborto epizootico bovino	<i>B. coriaceae</i>	<i>O. coriaceus.</i>	Bovinos e cervídeos	América do Norte
Borreliose de Lyme	<i>B. burgdorferi</i> <i>B. garinii</i> <i>B. afzelii</i>	<i>Ixodes</i> sp.	Animais silvestres, domésticos e homem	América do Norte e Europa Eurásia Eurásia
Borreliose de Lyme simile na América do Norte	<i>B. andersoni</i> <i>B. bissettii</i> <i>B. lonestari</i> <i>B. barbouri</i>	<i>Ixodes</i> sp. <i>Amblyomma americanum</i>	Animais silvestres, domésticos e homem	América do Norte
Borreliose de Lyme simile na Eurásia	<i>B. valaisiana</i> <i>B. lusitaniae</i> <i>B. turdii</i> <i>B. tanukii</i> <i>B. miyamotoi</i> <i>B. japonica</i>	<i>Ixodes</i> sp.	Animais silvestres, domésticos e homem	Europa Europa Ásia Ásia Ásia Ásia
Borreliose de Lyme simile no Brasil / SBY	<i>Borrelia</i> spp.	<i>Amblyomma sculptum</i> (Complexo <i>Amblyomma cajennense</i>)	Animais silvestres, domésticos e homem	Brasil

* São reconhecidas cerca de 25 espécies do gênero *Borrelia*, ainda nominadas de acordo com a espécie do carrapato do gênero *Ornithodoros* como transmissor.

2.2 Vetores e Transmissão das Borrelioses

As borrelias tem estreita relação com os carrapatos, desenvolvendo-se como simbioses nos artrópodes e atuando como parasitas nos animais e no homem (SOARES et al., 2000). Assim, os principais vetores dos membros do gênero *Borrelia* são os carrapatos, tanto os Ixodídeos (carrapatos duros) quanto os Argasídeos (carrapatos moles). Mas há também algumas borrelioses que são transmitidas por piolhos, a exemplo da *Borrelia recurrentis* que é transmitida por *Pediculus humanus* (MADUREIRA, 2007).

No caso dos carrapatos argasídeos, a transmissão das borrelias não ocorre somente diretamente através da picada. A sucção rápida de sangue que estes carrapatos realizam no hospedeiro ativa seu sistema de eliminação de excesso de água, proveniente do repasto sanguíneo, durante ou logo após a alimentação, que atua através do órgão coxal. Além da eliminação de fluídos pelo órgão coxal, os carrapatos argasídeos também injetam saliva contendo diversas substâncias farmacocinéticas entre enzimas, moduladores da inflamação e anticoagulantes (SONENSHINE, 1991). Desta forma, os argasídeos tem potencial de transmitir quase todos os tipos de borrelias, o que pode ocorrer tanto via salivar como também através dos fluídos do órgão coxal, não necessitando fixar-se por longos períodos para realizar a transmissão através de tais fluídos. Entre os Argasídeos existem diversas espécies do gênero *Ornithodoros* e *Argas* que transmitem espiroquetas aos homens e animais (SOARES et al., 2000).

Já os carrapatos Ixodídeos não possuem órgão coxal, demandando para lidarem com a entrada do grande volume de líquidos proveniente da alimentação de se utilizarem da injeção de saliva hipotônica no hospedeiro para realizar seu balanceamento osmótico quando fixados neste. Desta forma, ao permanecerem durante longos períodos aderidos aos hospedeiros, injetando grandes volumes de saliva, tais carrapatos tornam-se competentes vetores de patógenos, inclusive de borrelias (KAUFMAN, 2009). Dentro da família Ixodidae, os gêneros *Ixodes*, *Amblyomma*, *Rhipicephalus* se destacam como vetores (SOARES et al., 2000).

Na Europa, onde a doença veiculada por artrópode mais prevalente é a Doença de Lyme, assim como na Ásia e na América do Norte, os principais vetores são os carrapatos ixodídeos do complexo *Ixodes ricinus* (BARANDIKA et al., 2008). Sendo a doença causada por *B. burgdorferi* sensu lato, constituída pela *B. burgdorferi* sensu stricto que é encontrada na Europa, Ásia e América do Norte, e pela *B. garinii* e *B. afzelli* na Europa e Ásia (YOSHINARI et al., 2010).

Virtualmente todos os carrapatos presentes no Brasil têm capacidade de serem vetores de doenças, inclusive de borrelioses. Entretanto, dentre as espécies de carrapatos presentes no território nacional, destacam-se os carrapatos dos gêneros *Ixodes* e *Amblyomma*, por serem carrapatos trioxenos (carrapatos de três hospedeiros), possuírem ampla distribuição geográfica, alta capacidade de fixação aos hospedeiros, sendo potenciais vetores de doenças zoonóticas (MASSARD; FONSECA, 2004).

No Brasil, pesquisas de campo realizadas em localidades onde houve ocorrência de casos de Síndrome de Baggio-Yoshinari (SBY), evidenciaram a presença de carrapatos das espécies *A. sculptum* e *Ixodes loricatus* (BARROS-BATESTTI et al. 2000). Ao contrário do que ocorre com a Doença de Lyme clássica nos Estados Unidos e Eurásia, no Brasil não tem sido verificado casos humanos associados com histórico de picadas por carrapatos do complexo *Ixodes ricinus* (GUGLIELMONE et al. 2006).

Certamente os carrapatos *Amblyomma* spp. estão envolvidos na epidemiologia das borrelioses em nosso país, sendo que já houve relato de casos de SBY associados à picada destes carrapatos (MANTOVANI, 2010). No estado do Espírito Santo, houve forte associação entre a ocorrência de casos humanos de SBY e a presença de capivaras, sugerindo que os

carrapatos do gênero *Amblyomma* que as parasitam estejam participando do ciclo da doença (YOSHINARI et al., 2010).

Apesar de estes carrapatos serem os que mais comumente acometem humanos em nosso país, eles não são os únicos. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* também é um potencial vetor, pois tem sido relatada a coexistência de anticorpos para *B. burgdorferi* e *Babesia bovis* em humanos doentes com SBY (YOSHINARI et al. 2003). Além disso, Rezende et al. (2008) visualizaram espiroquetas em cultivo de células embrionárias, assim como na hemolinfa e nos ovos macerados de carrapatos *R. B. microplus* infectados naturalmente, sugerindo tratar-se de *Borrelia* spp..

O modo de transmissão das borrelíias nos seus hospedeiros invertebrados pode ser vertical (transovariano) e/ou horizontal (transtadial). Nas espécies transmitidas pelos argasídeos ocorre primordialmente a forma transovariana, o que é bem caracterizado no gênero *Argas* com *B. anserina*, embora haja também transmissão horizontal, principalmente com as borrelíias do grupo da febre recorrente para *Ornithodoros*. Já em carrapatos Ixodídeos pode ocorrer ambos modos de transmissão (BARBOUR; HAYES, 1986).

No caso dos Ixodídeos, a transmissão da borrelíias ocorre quando o carrapato fixa-se a um hospedeiro por longo período e fica ingurgitado. Assim, as borrelíias que estão presentes no intestino médio do carrapato são ativadas e migram através da parede do intestino e hemocele, atingindo as glândulas salivares. Então, estas são inoculadas com a saliva do carrapato no hospedeiro, o que leva cerca de 48 a 72 horas após o início da fixação (BUTLER et al. 2005). Porém, para os argasídeos, que têm repasto sanguíneo que se dá em poucos minutos, o tempo de fixação não é relevante, pois ocorre transmissão tanto via saliva quanto via líquido coxal, contra a exclusiva via salivar e o repasto lento dos ixodídeos (SONESHINE, 1991).

Com relação à transmissão das borrelíias, dos carrapatos vetores aos hospedeiros, parece haver uma relação entre o meio ambiente do interior do intestino do carrapato e a expressão genética de proteínas de membrana na borrelíia que facilitarão sua ativação e transmissão. Assim como parece haver influência das borrelíias sobre os carrapatos, estimulando a produção de certas substâncias em sua saliva que facilitarão a penetração e infecção no hospedeiro (BUTLER et al. 2005).

As borrelíias que se encontram no intestino médio de carrapatos em jejum são metabolicamente ativas, mas a uma taxa muito baixa, expressando predominantemente a proteína de membrana celular chamada OspA (DE SILVA; FIKRIG, 1995). Quando o carrapato fixa-se ao hospedeiro, assim que o sangue começa a chegar e encher o intestino do carrapato, a transformação das borrelíias é iniciada. A partir daí elas começam a multiplicar-se, aumentando sua motilidade e realizando alterações morfológicas.

Assim, as borrelíias presentes no intestino médio de carrapatos totalmente ingurgitados expressam a proteína de membrana OspC em sua superfície em vez de OspA (TOKARZ et al. 2004). Tal OspC é produzida por borrelíias quando em temperaturas entre 32 a 37 °C, mas não quando a 24 °C. Portanto é sugestivo que tal expressão seja dependente da temperatura e, portanto, do hospedeiro (SCHWAN et al., 1995).

De forma geral, as proteínas de membrana OspA e OspB parecem ser antígenos específicos quando estas estão no carrapato, ao passo que a OspC parece ser expressa apenas em carrapatos em alimentação no hospedeiro vertebrado (DE SILVA; FIKRIG, 1997).

Tem sido demonstrado que o efeito combinado do afluxo sanguíneo, provocado pela alimentação do carrapato e da mudança de temperatura provocada pelo contato com o hospedeiro e ingestão de sangue quente em *B. burgdorferi* levou a uma expressão diferencial de 154 genes. Vários genes de quimiotaxia e de detecção são ativados e tais mudanças podem ser essenciais para as borrelíias em sua transmissão e adaptação ao hospedeiro vertebrado (TOKARZ et al. 2004).

Estudos demonstraram também que a presença de *B. burgdorferi* na glândula salivar do carrapato leva a um aumento da expressão de uma proteína salivar denominada Salp15, o qual interage especificamente com proteína de membrana OspC e parece facilitar a disseminação da borrelia no hospedeiro (RAMAMOORTHI et al. 2005).

2.3 Doença de Lyme

A Doença de Lyme (DL) em humanos é definida como uma zoonose com inúmeras manifestações clínicas sistêmicas, sendo de ocorrência na América do Norte, Europa e Ásia, e causada por borrelias do complexo *B. burgdorferi* sensu lato, tendo como vetores os carrapatos do complexo *I. ricinus*. Nos Estados Unidos e Europa esta enfermidade tem como agente etiológico a *B. burgdorferi* sensu stricto, sendo também observadas a *B. garinii* e *B. afzelii* na Europa e Ásia. Esta diversidade etiológica é responsável pelas diferenças clínicas e laboratoriais regionais, bem como pela maior frequência do “Eritrema Migrans” (EM) e comprometimento articular nos Estados Unidos (STEERE, 2001).

Na região sul dos Estados Unidos há também uma apresentação conhecido como Doença de Masters ou STARI (*Southern Tick Associated Rash Illness*). A sua sintomatologia caracteriza-se pelo desenvolvimento de “rash” cutâneo semelhante ao EM, mas sem sintomatologia sistêmica. Tal doença parece ser causada por borrelia incultivável em meio BSK, conhecida como *Borrelia lonestari*, sendo transmitida pelo *Amblyomma americanum* (MASTERS et al., 1998).

A Doença de Lyme evolui progressivamente, passando por vários estágios. Na fase aguda pode ocorrer sintomas dermatológicos como o EM, sintomas semelhantes à gripes, como febre baixa, mialgias, artralguas, cefaléia e elevação transitória de enzimas hepáticas. Neste estágio, também podem aparecer novas lesões dermatológicas menos expansivas e disseminadas, conhecidas como eritema anular secundário. O estágio secundário surge dias ou meses após o contágio inicial e com o aparecimento de complicações articulares, neurológicas e cardíacas (YOSHINARY et al., 2010).

A síndrome pós-Doença de Lyme ou TAPOS (*Tick Associated Poly-Organic Syndrome*) tem sido uma apresentação controversa e indefinida constatada nos Estados Unidos. Parece ocorrer em pacientes com DL tratados com antibióticos, com melhora transitória mas que, posteriormente, desenvolvem sintomas crônicos de duração superior a seis meses, como mialgia, artralgia, dor radicular, disestesias, sintomas neurocognitivos e intensa fadiga (YOSHINARY et al., 2010). Apesar da controvérsia, há crescente evidência científica de que há Doença de Lyme crônica associada à infecções persistentes de *B. burgdorferi*, a qual estaria relacionada à habilidade da espiroqueta em evadir-se ou suprimir o sistema imune do hospedeiro através de diferentes mecanismos (ȚĂȚULESCU et al., 2010).

2.4 Síndrome de Baggio-Yoshinari (SBY)

No Brasil, em humanos, tem sido observado que a doença causada por *Borrelia* comporta-se de modo diverso ao que se tem observado no hemisfério norte. Após o início das pesquisas sobre a DL em nosso país, com divulgação à classe médica e o estudo dos casos que surgiram, verificaram-se diferenças clínicas, epidemiológicas, etiológicas e laboratoriais entre a DL clássica e a DL que ocorria em nosso território (YOSHINARY et al., 2010). Assim, tal doença foi inicialmente denominada como Doença de Lyme-símile (DLS), Síndrome Infecto-Reacional Lyme-símile (SIRLS) ou Doença de Lyme-símile Brasileira (DLSB).

Com relação às manifestações clínicas, em nosso país, há a ocorrência do clássico EM e complicações sistêmicas habituais encontradas na DL clássica, entretanto verifica-se na enfermidade brasileira seu desenvolvimento com recorrências, especialmente se o tratamento

com antibióticos for introduzido após três meses do início da infecção (YOSHINARY et al., 2010).

A epidemiologia da doença no Brasil parece não envolver carrapatos vetores do complexo *I. ricinus* como no hemisfério norte, visto estes ácaros não terem sido identificado parasitando o homem nas áreas de risco (YOSHINARY et al., 2010). Como vetores destes agentes, os carrapatos do gênero *Amblyomma* tem sido incriminados como principais envolvidos na epidemiologia da SBY em nosso país, com relato de casos associados à picada destes ectoparasitos (MANTOVANI, 2010).

Com relação ao agente etiológico, apesar da existência de sorologia da identificação e visualização de microorganismos similares às espiroquetas em pacientes humanos (MANTOVANI et al., 2007), com 90% dos pacientes com SBY apresentando formas semelhantes a espiroquetas latentes no sangue (YOSHINARY et al., 2010), e em animais (ABEL et al, 2000a), sugerido-se tratar-se de uma borreliose, até o momento não foi possível realizar a cultura e o isolamento de bactérias do complexo *B. burgdorferi* sensu lato de amostras coletadas de pacientes ou de possíveis animais reservatórios no Brasil.

Laboratorialmente a sorologia de anticorpos contra *B. burgdorferi*, baseada em antígenos de cepas de origem americana ou européia, tem revelado títulos baixos e oscilantes, desaparecendo rapidamente no sangue ou líquido cefalorraquidiano. Isto pode ser sugestivo de reações cruzadas para outra espécie de borrelia circulante no Brasil, que não a *B. burgdorferi*. Ademais, os doentes no Brasil também apresentam alta frequência de autoanticorpos dirigidos contra diferentes constituintes celulares (YOSHINARY et al., 2010), podendo acarretar doenças auto imunes.

Pesquisas realizadas no Laboratório de Investigação em Reumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM-17 HCFMUSP) revelaram a existência de microorganismos fastidiosos com estruturas morfológicas semelhantes à *Mycoplasma* spp., *Clamidia* spp. e espiroquetídeos sem flagelos no sangue periférico de pacientes com Síndrome Infecto Reacional Lyme Símile (SIRLS) apresentando a sorologia negativa para *Mycoplasma* spp. e *Clamidia* spp. (MANTOVANI et al., 2007).

Desta forma, é sugestivo que exista uma diferença morfológica entre a *B. burgdorferi* e o microorganismo identificado como possível agente causador da doença em nosso país, sugerindo-se, com bases em informações da literatura médica, que tais diferentes estruturas de morfologia atípica representariam variações morfológicas de espiroquetas latentes (YOSHINARY et al., 2010).

Com isto, surgiu a concepção de uma nova zoonose que imita a DL clássica, mas tipicamente brasileira, que tem como agente etiológico espiroquetas, possivelmente borrelias, que conservam uma forma atípica, tanto nos hospedeiros vertebrados como nos invertebrados. Tal conceito justificaria as diferenças entre a SIRLS e a DL clássica, como a dificuldade de cultivo do agente etiológico em meio Barbour-Stoenner-Kelly (BSK); a ausência de espiroquetas na apresentação espiralada helicoidal típica; a baixa resposta imunológica contra antígenos de cepas de *B. burgdorferi*; e as recorrências clínicas assim como os distúrbios imuno-alérgicos (YOSHINARY et al., 2010).

A biodiversidade brasileira, aparentemente com inúmeros animais reservatórios e carrapatos, e as diferenças climáticas em nossos ecossistemas, foram sugeridas como os fatores implicados no surgimento de espiroquetas latentes, possivelmente borrelias em apresentação cística, muito diferente dos microorganismos espiralados encontrados no hemisfério norte (YOSHINARY et al, 2010).

Por tais motivos, com a finalidade de desvincular esta doença tipicamente brasileira da DL clássica, visando incentivar a pesquisa e difundir o conhecimento desta zoonose emergente à classe médica, propôs-se a nomenclatura de Síndrome de Baggio-Yoshinari (SBY) (YOSHINARY et al., 2010).

Apesar disto, também há evidências sorológicas que suportam a hipótese de que borrelíias do grupo *B. burgdorferi* sensu lato, também possam estar circulando em nosso país na região amazônica, tendo sido constatados pacientes humanos sororeagentes em ELISA e confirmados por *Western Blot*, com IgG específicas para *B. burgdorferi* (SANTOS et al., 2010).

Foi isolada pela primeira vez no Brasil, por Gonçalves et al. (2013), uma cepa de *Borrelia burgdorferi* de carrapatos *Dermacentor nitens* coletados em equinos utilizados como animais de tração de carroças em um município do interior do estado do Paraná.

Barbieri et al. (2013) no Uruguai, isolaram *B. burgdorferi* em carrapatos do complexo *I. ricinus*. Nava et al. (2014) na Argentina, isolaram *B. burgdorferi* em carrapatos *Ixodes parvicinus*.

2.5 Epidemiologia e Saúde Única

Ainda hoje os modelos biológicos são os mais prevalentes paradigmas em epidemiologia, considerando a saúde em função da doença, sendo os fatores biológicos seus mais relevantes determinantes. Entretanto, modelos epidemiológicos mais amplos e holísticos que representem a natureza multicausal dos agravos que, na realidade, são determinados por fatores biopsíquicos, estariam mais de acordo com as definições mais avançadas de saúde (PEREIRA, 2012).

Capra (2002) teoriza que todas as formas de vida, desde as células mais primitivas até as sociedades humanas, organizam-se segundo o mesmo padrão e princípio básico de relações: o padrão em rede ou teia. Assim, ocorre o desenvolvimento sob uma ótica sistêmica e unificada, demonstrando que a vida de todos os seres vivos é interligada por redes complexas, compondo a “teia da vida”.

A epidemiologia das doenças transmitidas por vetores artrópodes claramente demonstra ser influenciada por uma rede de múltiplos fatores e variáveis que interferem de diferentes maneiras em sua teia epidemiológica. Devido aos fenômenos naturais e/ou decorrentes de intervenção humana ou ações antrópicas, as mudanças ambientais e perturbações ecológicas têm exercido e continuam a exercer uma marcada influência na reemergência e emergência de doenças parasitárias zoonóticas (PATZ et al., 2000). Sabe-se que a distribuição e a prevalência das doenças transmitidas por carrapatos dependem primariamente da distribuição geográfica e atividade destes (BARANDIKA et al., 2008), sendo notado uma aparente expansão da distribuição geográfica de algumas espécies de carrapatos vetores de doenças a animais e a humanos. Associada a esta expansão verificamos o aumento da prevalência e dispersão destas doenças em determinadas regiões (DANTAS-TORRES et al., 2012).

A composição e características das comunidades de vertebrados na natureza, como diversidade e riqueza de fauna, é essencial na determinação do risco de doenças, podendo influenciar o risco de transmissão destas, como foi relatado nos Estados Unidos num modelo de transmissão de *B. burgdorferi* por carrapatos *I. scapularis* (KEESING et al., 2010).

Neste país, a incidência e distribuição espacial da DL tem crescido anualmente nos EUA, com a fragmentação das florestas da região nordeste, sendo de ocorrência comum no entorno das cidades, áreas suburbanas e rurais. Tal fragmentação tem determinado um aumento na população dos ratos de pés brancos (*White Footed Mice*), reservatórios da *B. burgdorferi*, infectando carrapatos que neles se alimentam (LEVI et al., 2012).

Foi demonstrado que o aumento da incidência da DL também está associado com a diminuição da população de raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*), as quais se alimentam de ratos de pés brancos nestas áreas de degradação ambiental. Uma menor biodiversidade levaria à baixas chances de predação ocasionando um efeito cascata que aumentaria o risco de

ocorrência de doenças zoonóticas, inclusive da DL. Modelos matemáticos estimaram que uma queda em 20% na predação dos roedores mais que dobraria o número de ninfas de carrapatos infectadas em determinada área (LEVI et al., 2012).

No Brasil, recentemente e pela primeira vez, foi verificado o efeito de diluição com áreas de maior biodiversidade apresentando uma diminuição do risco de transmissão de Febre Maculosa Brasileira (FMB), quando comparado a áreas de maior degradação ambiental. Verificou-se também menor soroprevalência para FMB em cães das áreas de maior biodiversidade e menor ação antrópica (CHAME; LABARTHE, 2013).

Assim, é sugestivo que a degradação ambiental antrópica pode estar contribuindo, em certos casos, para o aumento do risco de zoonoses transmitidas por carrapatos, sendo possível que tal fato também possa estar ocorrendo com a SBY no Brasil, o que justificaria a realização de mais estudos epidemiológicos buscando elucidação de tal possibilidade.

O conceito de Saúde Única, popularizado na segunda metade do século passado pelos médicos veterinários James H. Steele e Calvin W. Schwalbe, preconiza a rede de ligações indissociáveis existente a saúde humana, animal e ambiental (SOARES, 2013). Desta forma, também tem sido enfatizada a importância de uma abordagem epidemiológica multidisciplinar e holística, sob a ótica da Saúde Única, para as doenças transmitidas por carrapatos, unindo esforços entre os médicos veterinários e outros profissionais, visando um manejo mais adequado destas doenças (DANTAS-TORRES et al., 2012). Tal abordagem tem sido utilizada para prever zoonoses emergentes na região amazônica (CHAME; LABARTHE, 2013), como em diversas regiões do mundo, com esforços no sentido de implantação de programas de Saúde Única coordenados por entidades como a Organização Mundial de Saúde (OMS), a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) e a Organização Internacional de Epizootias (OIE) (SOARES, 2013).

No caso da SBY, no Brasil, a rede epidemiológica que envolve a doença parece ser bastante complexa, com a participação de carrapatos *Amblyomma* spp. e, possivelmente, *R. B. microplus* também. Apesar da identificação de microorganismos similares a espiroquetas em alguns animais e humanos doentes, o real agente etiológico ainda está por ser isolado e caracterizado, bem como os animais que atuam como reservatórios competentes estão por ser descobertos. Assim, em nosso território, a epidemiologia da doença ainda está por ser melhor definida, sendo portanto salutar uma abordagem epidemiológica desta sob a ótica da Saúde Única.

2.6 Animais Reservatórios, Sentinelas e Carreadores

Na Europa, tem sido verificado que passeriformes, durante seus processos migratórios, podem contribuir para a disseminação de carrapatos e borrelíias. Três mecanismos podem estar ocorrendo na disseminação de carrapatos e borrelíias. Em primeiro lugar, o transporte passivo de ninfas previamente infectadas e/ou larvas infectadas via transovariana pode ocorrer. Em segundo lugar, as aves migratórias infectadas podem infectar os carrapatos que, posteriormente, são deixados em um novo local. Em terceiro lugar, os carrapatos podem transferir borrelíias entre si por meio de co-alimentação durante o transporte pelas aves (HASLE et al, 2011). Este processo foi observado em aves migratórias marinhas, inclusive com o carregamento de borrelíias e carrapatos entre continentes (HUMAIR, 2002).

Na Eurásia tem sido identificados como reservatórios competentes de *B. burgdorferi* sensu lato pequenos mamíferos (pequenos roedores), mamíferos de médio porte (esquilos, texugos, porcos-espinho, raposas) e 16 espécies de aves, incluindo passeriformes, aves marinhas e faisões. O camundongo (*Mus musculus*) é fortemente suspeito de ter competência como reservatório, bem como muitas outras espécies de pequenos roedores silvestres, especialmente da Europa Oriental e Rússia. Ungulados, inclusive cervídeos, aparentemente

não cumprem papel importante como hospedeiros desses patógenos, embora a transmissão através de co-alimentação possa permitir a infecção dos carrapatos, os quais atuam como amplificadores e carreadores de carrapatos (GERN et al., 1998).

Nos EUA, como comentando anteriormente, o principal reservatório competente de *B. burgdorferi* é um pequeno roedor, o rato de pés brancos (“*White Footed Mice*”), *Peromyscus leucopus*, o qual infecta larvas e ninfas que nele se alimentam. Embora o veado de cauda branca (“*white-tailed deer*”), *Odocoileus virginianus*, não transmita eficazmente espiroquetas aos carrapatos que nele se alimentam, não sendo um reservatório competente, este cervídeo pode atuar como sentinela e também como carreador de carrapatos infectados, contribuindo para a dispersão da doença. Aves também tem um papel na dispersão de larvas e ninfas de carrapatos infectados, parecendo que algumas espécies funcionam como reservatórios competentes de *B. burgdorferi*. É reconhecido que as aves colaboram para o estabelecimento de novos focos de DL, sendo seu papel como reservatório de menor importância se comparado ao pequeno roedor (MAGNARELLI, 2011).

No Brasil, tem sido verificada soropositividade em cães, testados por ELISA, para *B. burgdorferi*, reforçando a importância destes como sentinela. Cordeiro et al. (2012), em estudo na cidade de Seropédica- RJ, encontraram soroprevalência similar às encontradas em pesquisas sorológicas realizadas em cães de áreas endêmicas para DL nos Estados Unidos. Alves et al. (2004) também encontraram resultados similares na região metropolitana do Rio de Janeiro.

Borrelia spp. foi identificada em urina de gambás (*Didelphis aurita*) sadios e naturalmente infectados após imunossupressão com ciclofosfamida, sendo tais espiroquetas infectantes quando inoculadas em camundongos albinos (BARBOZA, 1997). Abel et al. (2000b) identificaram espiroquetemia em 13 de 56 gambás *D. aurita* capturados na natureza e naturalmente infectados, relatando ainda que tais animais estavam parasitados por carrapatos dos gêneros *Amblyomma* e *Ixodes*. Assim é sugestivo que tais marsupiais possam ser reservatórios de borrelíias em nosso país, com participação em sua epidemiologia.

Estudo com roedores e marsupiais capturados em reserva de Mata Atlântica, na região de Cotia – SP, onde casos humanos de SBY e cães sororeativos foram reportados, conseguiu cultivar espiroquetas à partir de amostras de sangue de alguns marsupiais, de sangue e fígado de roedores e de carrapatos *Ixodes* adultos coletados dos animais. Tais dados sugerem que os carrapatos de espécies *Ixodes*, demonstrando que estes roedores e marsupiais podem estar envolvidos no ciclo enzoótico das borrelíias na região (ABEL et al., 2000a).

Da Costa et al. (2002) observaram, à microscopia de campo escuro, espiroquetas em culturas de quatro amostras de baço de roedores silvestres, uma de fígado de roedor silvestre, uma de sangue de marsupial e três de macerados de ninfas de *Amblyomma* provenientes de roedores e marsupiais silvestres, todos coletados em área de reserva de floresta urbana no Estado do Mato Grosso do Sul.

Como exemplos de animais de nossa fauna silvestre que apresentam grandes infestações de carrapatos particularmente do gênero *Amblyomma*, podem ser citados capivaras e gambás (PEREZ et al. 2008), os quais podem estar funcionando como reservatórios de borrelíias. Em alguns municípios do Estado do Espírito Santo tem sido verificado, além de sororeatividade para *B. burgdorferi* em cães, uma associação entre a presença de capivaras e a ocorrência de casos humanos de SBY. Suspeita-se que carrapatos *Amblyomma* que parasitam as capivaras participem da epidemiologia da SBY (SPOLIDORO, 2009). Também é importante salientar que muitos casos de SBY humanos tem histórico de desenvolvimento de sintomas clínicos após contato com animais domésticos como cães, equinos e bovinos (YOSHINARI et al., 2010).

Mesmo com todas estas evidências epidemiológicas, de forma análoga ao que tem ocorrido nos casos humanos de SBY, apesar da identificação e visualização de espiroquetas à partir de amostras de animais silvestres, domésticos e carrapatos no Brasil, não se tem tido

sucesso no seu cultivo em meios de cultura habituais, como o meio BSK. Igualmente não se tem conseguido identificação por técnicas moleculares (PCR) (YOSHINARY et al., 2010).

Muitos aspectos da epidemiologia destas espiroquetas continuam a ser investigados, entretanto, reconhecendo-se que a presença de espiroquetas em carrapatos ou mamíferos, por si só, não prova que estes sejam vetores ou reservatórios competentes. Para os carrapatos, testes de infecção experimental são necessários para avaliar a capacidade destes para manter e transmitir tais espiroquetas a novos hospedeiros, comprovando assim sua competência vetorial. Ademais, a competência dos reservatórios vertebrados deve ser confirmada por testes de xenodiagnóstico (ABEL et al., 2000a).

Portanto, cães (CORDEIRO et al., 2012), equinos (MADUREIRA, 2004; MADUREIRA, 2007), bovinos (ISHIKAWA, 1996) e animais silvestres (ABEL et al., 2000a), têm sido identificados como sororeagentes, evidenciando a circulação de borrelíias nas zonas urbana e rural, bem como em ambientes silvestres em nosso país. É possível que pequenos roedores, marsupiais, capivaras e outros animais silvestres e domésticos participem da epidemiologia da SBY, sendo necessários mais estudos epidemiológicos sob a ótica da Saúde Única para esclarecimento do seu real papel de cada ator nesta rede.

2.7 Borreliose em Equinos

Na América do Norte muito se tem debatido acerca da ocorrência de DL ocasionada por *B. burgdorferi*, suas manifestações clínicas, terapêutica e métodos diagnósticos em equinos. Países da Europa também tem relatado possíveis casos de DL em equinos, entretanto, no Brasil, apesar de estudos revelando sorologia positiva, e variada soroprevalência, em rebanhos de diferentes partes do país, pouco se tem relatado acerca de doença clínica nestes animais. Analogamente às diferenças entre as manifestações clínicas entre a DL clássica de humanos que ocorre no Hemisfério Norte e a SBY, é possível que existam divergências também nas manifestações clínicas entre a DL que acomete equinos nestes países e a(s) borreliose(s) que acomete(m) equinos no Brasil, sendo necessária a realização de mais estudos para elucidar, dentre outras questões, os sintomas clínicos relacionados à manifestação da infecção por borrelíias em equinos em nosso território.

Assim, deve-se atentar para tal possibilidade, incluindo a borreliose em diagnósticos diferenciais de algumas manifestações dermatológicas, neurológicas, oftalmológicas e osteomioligamentosas em equinos, estando especialmente alertas ao potencial de transmissão desta zoonose por carrapatos do gênero *Amblyomma*.

2.7.1 Estudos de soroprevalência de *Borrelia* spp. em equinos

Como em humanos, cães e equinos são tidos como hospedeiros acidentais para a *B. burgdorferi* na América do Norte, em contraste com pequenos roedores e aves que podem atuar como hospedeiros reservatórios e manter o ciclo das borrelíias na natureza. Assim, estudos sobre a soroprevalência e a infecção nestes animais domésticos que vivem em estreita proximidade com os seres humanos tem sido utilizados para a detecção precoce da emergência e na avaliação do risco de transmissão de *B. burgdorferi* para os seres humanos e animais em áreas geográficas definidas, os quais seriam sentinelas para a DL (WAGNER; ERB, 2012).

Wagner; Erb (2012) encontraram prevalência de 8% em amostras de soros equinos de municípios do Estado de Nova York, EUA. No Estado de Minnesota, estudo retrospectivo analisando soros de 1.290 equinos, através de RIFI, encontrou uma soroprevalência de 58,7%, indicando a alta exposição dos animais e sugerindo que a DL deva entrar como diagnóstico diferencial em casos de doenças neurológicas e musculoesqueléticas de equinos desta região

(DURRANI et al., 2011).

Na região Nordeste dos EUA, considerada endêmica para DL humana, foi verificado por ELISA e confirmado por Imuno Blot uma prevalência de 45,1% em 85 amostras de soro equino testadas, sendo esta elevada prevalência atribuída à ampla distribuição geográfica dos carrapatos *Ixodes* e à presença de roedores reservatórios nesta região (MAGNARELLI et al., 2000). Estudos na região Noroeste dos EUA, região não endêmica de DL humana, revelaram menor soroprevalência, 14,8% (METCALF et al., 2008). Tais estudos evidenciam o papel do equino como sentinela para a DL nos EUA.

Na Suíça, amplo estudo em 2.019 amostras de soros equinos de todo o país, revelou soroprevalência de 16,8% para *B. burgdorferi* sensu lato (EGENVALL et al., 2001).

Na Romênia, estudo analisando 260 amostras de soros equinos provenientes de diferentes regiões do país, revelou uma prevalência de 11,92% através de RIFI para *B. burgdorferi* sensu lato (KISS et al., 2011).

No Japão, pesquisa analisando amostras de cavalos Puro Sangue do distrito de Hidaka, encontrou soroprevalência de 97,7% para *B. garinii* através de RIFI (YBAÑEZ et al., 2013).

Na Itália, na região turística de Bellunese, foi encontrada soroprevalência de 25,3%, em equinos, para *B. burgdorferi* sensu lato (COMIN et al., 2007).

Estudo analisando amostras de soros de equinos da França, Guiana Francesa e regiões da África Subsaariana, revelou soropositividade apenas em equinos de regiões metropolitanas da França. A soroprevalência foi de 12% na região sul, 31% na região central e 48% no norte do país (MAURIZI et al., 2010).

No Brasil, o primeiro estudo de soroprevalência para anticorpos da classe IgG, homólogos contra *B. burgdorferi* cepa G39/40 através do ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) indireto, analisando amostras de equinos de diferentes regiões e tipos de manejo no Estado do Rio de Janeiro, indicou uma soroprevalência de 42,9% em equinos de pequenos criadores do município de Seropédica, relacionando este achado a alta infestação por carrapatos nos animais desta área (SALLES et al., 2002).

Na mesoregião metropolitana de Belém, estado do Pará, estudo investigando a frequência de equinos soropositivos para anticorpos da classe IgG, homólogos contra *B. burgdorferi* cepa G39/40 através do ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) indireto, revelou uma soroprevalência de 26,3% entre os 300 equinos amostrados (GALO et al., 2009). Ainda neste estado, em animais provenientes da Ilha de Marajó e do Município de Castanhal, foi verificada uma prevalência de 7,2% nas 208 amostras testadas, sendo que os equinos estavam parasitados, unicamente, pela espécie *Dermacentor nitens* (MADUREIRA et al., 2009).

Da mesma forma, analisando 747 amostras de soros de equinos dos municípios de Três Rios e Vassouras, no estado do Rio de Janeiro, Madureira et al. (2007), verificaram uma prevalência de 28,4% nestes animais. Spolidoro et al. (2010) encontraram soroprevalência de 4,2% em 27 amostras de soro provenientes de equinos da zona rural de seis municípios do estado do Espírito Santo.

Por esses achados, verifica-se que como no Hemisfério Norte, assim também no Brasil os estudos sorológicos para borrelíias em equinos têm revelado prevalências distintas. Certamente, tal diversidade reflete a ampla gama de fatores que influenciam a ocorrência deste potencial agente zoonótico e sua complexa rede epidemiológica, sendo que no Brasil a história natural desta doença ainda está por ser elucidada. É fato que o equino é um animal sentinela para a doença, devendo os estudos serem conduzidos no sentido de monitorar o status sorológico na população destes animais, o que serviria de parâmetro para a detecção da emergência e risco da doença nas diversas regiões do país.

2.7.2 Manifestações clínicas das borrelioses em equinos

A DL é a doença transmitida por carrapatos a equinos mais controversa e frequentemente diagnosticada em cavalos em certas partes dos Estados Unidos. Uma junção de fatores tem levado a isto, dentre os quais ressaltamos o aumento da exposição a carrapatos infectados por borrelíias, a variabilidade e a natureza vaga dos sinais clínicos, a dificuldade para se chegar a um diagnóstico definitivo e as como mudanças e alterações ambientais que influem nas populações de animais selvagens que coabitam ambientes com os equinos (GRENAGER, 2013). De modo geral, verifica-se ainda muita controvérsia acerca dos sinais clínicos das borrelioses nestes animais, verificando-se na América do Norte e Europa descrições semelhantes à de casos humanos, sendo uma doença multissistêmica também nos equinos (DIVERS et al., 2009). Um amplo espectro de sinais clínicos tem sido atribuído às borrelioses em cavalos. Apesar disto, o estabelecimento de causa e efeito tem sido difícil de documentar na maioria dos casos (DIVERS, 2007). Em algumas áreas dos Estados Unidos, devido à alta soroprevalência para DL em equinos, verifica-se uma grande dificuldade em associar os sinais clínicos observados à sorologia positiva, tornando a ocorrência desta doença nestes animais ainda bastante controversa (DIVERS, 2013).

Dentre os sinais clínicos mais comumente atribuídos à DL em cavalos incluem-se febre baixa, rigidez e claudicação em mais de um membro, sensibilidade muscular, hiperestesia, inchaço nas articulações, letargia e alterações comportamentais (MAGNARELLI et al., 2000). Disfunção neurológica e panuveíte foram relatadas em um cavalo e um pônei (BURGESS et al., 1986; HAHN et al., 1996).

Ao contrário da sintomatologia da DL em humanos, em equinos o derrame articular tem sido mínimo na maioria dos casos suspeitos de borreliose equina (DIVERS, 2013). Perda de massa muscular e dor na região toracolombar têm estado presentes em alguns cavalos com altos títulos na sorologia para *B. burgdorferi*, com alguns destes animais apresentando sinais neurológicos (IMAI et al., 2011).

Manion et al. (2001) observaram como principal sinal clínico a claudicação envolvendo múltiplas articulações, seguido por mudanças de comportamento (mais freqüentemente expressa como uma falta de vontade de trabalhar).

Também foram relatados casos de associação entre *Borrelia* e uveíte em equinos, baseado na identificação de espiroquetas no líquido ocular e exame de PCR positivo para *B. burgdorferi*, sugerindo que DL deva entrar no diagnóstico diferencial de uveítes em equinos de áreas endêmicas (PRIEST et al., 2012).

Relato de caso de neuroborreliose em dois cavalos indicou que ambos tinham meningoradiculoneurite necrossupurativa crônica quando da necropsia. Hiperestesia, dor lombar e perda de massa muscular foram os achados clínicos iniciais, sendo seguidos por ataxia de todos os quatro membros, paralisia do nervo facial e, finalmente, tremores de cabeça associados à depressão em um dos cavalos. Na histopatologia foram identificadas espiroquetas em ambos os casos, através da coloração de impregnação pela prata de Bosma Steiner, predominantemente nas regiões da dura-máter afetadas do cérebro e da medula espinhal (IMAI et al., 2011).

Com base em poucos casos, DIVERS et al. (2013) sugerem que a ataxia e perda de massa muscular lombar, causada por meningite linfocítica e radiculoneurite, com fasciculações ocasionais e rigidez do pescoço, são características comuns de neuroborreliose no cavalo. O líquido céfalo-raquidiano provavelmente mostrará pleocitose linfocítica, achado raro em humanos com neuroborreliose, com alguns equinos apresentando o líquido positivo para *B. Burgdorferi* quando testados pela PCR.

Comparando animais infectados com grupo controle em avaliação de infecção experimental por *B. burgdorferi* em pôneis, verificou-se que os sinais clínicos não seriam

óbvios. Após a infecção experimental, através de infestação por carrapatos infectados experimentalmente durante sete dias, seguido de observação por nove meses, organismos do gênero *Borrelia* foram consistentemente encontradas, através de cultura e PCR, em todas as membranas sinoviais, na pele e na fáscia próximas ao local onde os carrapatos anteriormente haviam se afixados, caracterizando aparentemente uma predileção pela persistência da infecção nestes locais (CHANG et al. 2000).

Esta constatação de borrelíias na fáscia de cavalos experimentalmente infectados pode explicar a hiperestesia relatada em muitos casos suspeitos, podendo dar uma pista sobre o movimento e os potenciais locais de persistência das espiroquetas no organismo equino (pele, fáscia, nervos e membranas sinoviais) (DIVERS et al., 2009).

Um primeiro relato de lesões de pele macroscópicas associada à borrelíias descreve o caso de um equino que desenvolveu múltiplas pápulas dérmicas sobre a área do masséter direito três meses após a remoção de um carrapato em tal localização. Tal equino desenvolveu uma forma de pseudolinfoma associada à picada de carrapato. Testes sorológicos positivos e PCR da amostra da biópsia, em conjunto com o teste de imuno-histoquímica da biópsia da pele mais a história clínica e a resposta ao tratamento com doxiciclina, sugeriram fortemente o diagnóstico de pseudolinfoma cutâneo associado à infecção por *B. burgdorferi* (SEARS et al., 2012).

Em estudo sorológico comparativo entre equinos com sinais clínicos de borreliose e equinos sem sintomatologias procedentes de região endêmica para DL, constatou-se que cavalos clinicamente doentes tiveram uma maior prevalência de *immunoblots* positivos para *B. burgdorferi* (77%) quando comparados aos equinos controles saudáveis de região endêmica (29%), assim como tiveram títulos mais elevados de ELISA em relação aos controles. Assim, embora a infecção subclínica com *B. burgdorferi* seja comum, parece haver duas diferenças quantitativas e qualitativas na sorologia entre cavalos clinicamente doentes e saudáveis de áreas endêmicas (MANION et al., 2001).

No Brasil, a SBY em humanos tem sintomatologia e evolução divergente da DL clássica do hemisfério norte e Eurásia. Assim, há de se imaginar que a doença ocasionada por borrelíias em equinos em nosso país também tenha comportamento e sintomatologias diferentes dos encontrados em equinos da América do Norte e Eurásia, sendo que, até o momento, não temos estudos publicados acerca da sintomatologia e terapêutica da borreliose em equinos no Brasil. Entretanto, estudos demonstrando sorologia positiva para *B. burgdorferi* cepa 39/40 tem evidenciado que borrelíias infectam e circulam entre os equinos em nosso país, havendo a possibilidade destes estarem participando da epidemiologia da doença (SALLES et al., 2002; MADUREIRA et al., 2007).

2.7.3 Diagnóstico em equinos

Dado à inespecificidade dos sinais clínicos, a definição do diagnóstico de DL em animais, assim como é preconizado na Medicina Humana, deve associar a clínica, a epidemiologia, a região geográfica, o histórico e a sorologia (YOSHINARY et al., 2010; BATHE; SCHWARTZ, 2011; DIVERS, 2013).

Borrelíias são bactérias de necessidades metabólicas complexas, tendo seu cultivo iniciado-se em peritônio de ratos e ovos embrionados (BARBOUR; HAYES, 1986). Atualmente o meio para cultivo e isolamento de *Borrelia* spp. mais utilizado é o meio BSK, com o crescimento da espiroqueta ocorrendo à temperatura de 33°C em, aproximadamente, sete dias, sendo seu cultivo pode realizado à partir de diferentes amostras como saliva, hemolinfa e tecidos de carrapatos, soro, fluidos corporais e tecidos de animais e do homem (BARBOUR, 1984; DICKINSON & BATTLE, 2000; TEIXEIRA, 2010).

Apesar de factível, o cultivo tem diversas limitações para o uso rotineiro em diagnóstico laboratorial, visto que nem todas as espécies de *Borrelia* são de fácil cultivo ou cultiváveis (TEIXEIRA, 2010). Além disso, este é considerado um processo demorado e oneroso, sendo que no Brasil não se tem tido sucesso no cultivo e isolamento da(s) borrelia(s) circulante(s) em nosso meio (YOSHINARI et al., 2010). Microscopicamente, a visualização das espiroquetas pode ser realizada em campo escuro, de contraste de fase ou em tecidos corados pela coloração de impregnação pela prata de Borma-Steiner (BARBOUR; HAYES, 1986).

Na Eurásia e América do Norte, a confirmação diagnóstica da DL em humanos tem sido basicamente sorológica, visto o cultivo destes organismos ser um procedimento demorado e pouco produtivo, com a PCR ainda pouco empregada, só identificando casos em que borrelias estão circulantes ou depositadas nos tecidos (YOSHINARI et al., 2010).

Da mesma forma, em equinos, o Ensaio Imunoenzimático (ELISA) indireto e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) têm sido os testes mais frequentemente utilizados para verificar a exposição à borrelias no hemisfério norte (DIVERS et al., 2013), sendo o ELISA indireto com antígeno de célula total sonicada o teste inicial mais sensível (BATHE; SCHWARTZ, 2011).

Greene et al. (1991), comparando os testes de ELISA e RIFI em amostras de soro canino para IgG homólogos de *B. burgdorferi*, encontraram concordância entre os testes, variando entre 93,5% a 98%. Magnarelli et al. (2004) demonstraram alta especificidade (97%) do teste de ELISA, com antígeno bruto e com antígeno recombinante, para a confirmação da exposição de bovinos à *B. burgdorferi*, testando 60 soros de animais positivos para *Leptospira interrogans*, *Brucella* spp., *Anaplasma marginale* e *Anaplasma phagocytophilum* para avaliar sua especificidade.

Magnarelli et al. (1984) compararam a concordância dos testes de ELISA e RIFI na detecção de anticorpos para *B. burgdorferi* em soros de humanos, cães e ratos de pés brancos naturalmente infectados, e ratos suíços experimentalmente infectados. Verificou-se que os soros reagiram de maneira similar em ambos os testes, sendo observada uma concordância de 95%.

Em humanos, no Brasil, na falta de um isolado brasileiro de borrelia, tem sido usada *B. burgdorferi* cepa G39/40 de origem americana nos ensaios sorológicos (ELISA e Western-blotting), sendo o ELISA realizado com antígeno total sonicado segundo metodologia adotada nos EUA (YOSHINARI et al., 2010).

Em Medicina Veterinária, ensaios de ELISA indireto para detecção de IgG homólogas anti-*B. burgdorferi*, à partir de antígeno de célula total (cepa americana de *B. burgdorferi* G 39/40) sonicado foram padronizados com resultados satisfatórios para avaliar soros de cães (SOARES, 1999), equinos (SALLES, 2002) e bovinos (ISHIKAWA, 1996), sendo empregados para varreduras de populações em estudos epidemiológicos.

Apesar de haver relatos de reações cruzadas entre *Borrelia* spp. e *Leptospira* spp., tais reações aparentam não serem significativas (WELLS et al., 1993; JOBERT, 1995). No Brasil, nos estudos de soroprevalência realizados em cães (SOARES et al., 1999), bovinos (ISHIKAWA, 2000) e equinos (SALLES et al., 2002), com auxílio do teste ELISA indireto, não foram observadas reações cruzadas entre esses dois gêneros de espiroquetas.

Madureira (2007) caracterizou morfometrica e genotipicamente um isolado de espiroqueta oriunda de equino do estado do Rio de Janeiro, com a análise das sequências do isolado para os genes 16S *rRNA* e *fla* revelando identidade com sequências depositadas no "GeneBank" para *Borrelia theileri*. Em conjunto com a análise morfométrica (17,2 ± 3,6 µm de comprimento; 10 ± 2 espiras), classificou-se este microrganismo como *B. theileri* (MADUREIRA, 2007).

A *B. theileri* é uma espiroqueta transmitida principalmente por carrapatos *R. (B.) microplus* que pode infectar bovinos e equinos (COLLOW, 1967). Devido a possibilidade de ocorrência de reações cruzadas entre *B. burgdorferi* e *B. theileri* em regiões onde ambos os agentes coexistam, poderia existir potencial comprometimento da interpretação dos resultados quando da realização dos estudos soroepidemiológicos (ROGERS et al., 1999). No entanto, estes autores não teriam evidenciado a ocorrência de reações cruzadas entre tais agentes etiológicos quando do teste de ELISA avaliando a especificidade deste ensaio.

O uso de antígenos recombinantes específicos para *B. burgdorferi* tem sido estudado na tentativa de se aumentar a especificidade dos ensaios. Dentre os antígenos, os principais estudados têm sido aqueles derivados das proteínas de superfície da membrana externa (Osp), tais como: as proteínas de superfície OspA (*Outer Surface Protein A*) (31kDa), a OspB (*Outer Surface Protein B*) (34kDa), a OspC (23kDa), a OspE (*Outer Surface Protein E*) (19kDa) e a OspF (*Outer Surface Protein F*) (29kDa). Além destas, a lipoproteína VlsE (*surface-exposed lipoprotein*) e o fragmento central da flagelina p41-G (13kDa), dentre outras proteínas, p22, p35, p37e p39, tem sido avaliadas (GREENE et al., 1988; MAGNARELLI et al., 1997; 2000; 2004; MAGNARELLI; FIKRIG, 2005).

Apesar de considerar-se que o uso de antígenos recombinantes possa aumentar a especificidade dos ensaios, os estudos com tais antígenos também revelaram limitações em seu uso, com a OspC relacionando-se à respostas iniciais da infecção por *B. burgdorferi*, e a OspF à respostas tardias, com as OspA, OspB e OspE aparentemente não serem frequentes em soros de cães, de equinos ou de humanos (MAGNARELLI et al., 1996, 1997).

Desta forma, o ELISA com antígeno de extrato de célula total sonificado foi considerado um método prático e útil na varredura inicial de um grande número de soros e, conseqüentemente, para levantamentos soroepidemiológicos em equinos naturalmente infectados (MAGNARELLI et al., 2005).

As técnicas de imunofluorescência, o *western blotting* e o PCR são há mais de duas décadas utilizadas como suporte no diagnóstico (GRODZICKI; STEERE 1988, LIENBLING et al. 1993). Devido à subjetividade na interpretação dos resultados, especial atenção deve ser dada quando da utilização da RIFI. Devido a alta concordância (MAGNARELLI et al., 2004), o ELISA automatizado é mais ágil, facilitando uma análise objetiva de maior número de amostras, e tem sido o teste até então mais utilizado.

Ensaio como o *western blotting* têm sido empregados, secundariamente, para a confirmação de resultados após a triagem realizada com ELISA, tendo em vista sua maior sensibilidade e especificidade (GRODZICKI; STEERE, 1988). Entretanto, é um ensaio oneroso, sendo difícil a obtenção de um padrão positivo ideal, sendo fundamental estabelecer a qualidade e a quantidade das bandas reativas, de acordo com o antígeno utilizado e região estudada (SOARES et al., 2000).

Já a reação em cadeia de polimerase (PCR), apresenta alta especificidade e maior sensibilidade que o ELISA nos estágios iniciais da infecção, sendo o ELISA mais recomendado para estudos epidemiológicos de varredura inicial nas populações (NIŚCIGORSKA et al., 2003).

2.7.4 Tratamento

No Hemisfério Norte os antibióticos comumente utilizados para o tratamento de DL em equinos são a Doxiciclina e a Oxitetraciclina. A doxiciclina, via oral, na dose de 10mg/kg, a cada 12 horas, durante 30 dias tem sido, empiricamente, o tratamento mais utilizado. Equinos tratados com esta base devem ser monitorados para mudança na consistência das fezes, o que está relacionado à efeitos colaterais provocados por este antibacteriano em longos tratamentos, visto provocar alteração na microbiota nativa do ceco e cólon, com uma pequena

porcentagem dos equinos tratados pode apresentar diarreia (DIVERS et al., 2009).

Oxitetraciclina, na dose de 6,6 a 11 mg/kg, via intravenosa, a cada 24 horas aparentemente é mais eficaz, devido à alta concentração sanguínea e tecidual que atinge, quando comparada à doxiciclina dada por via oral (DIVERS et al., 2009). Este tratamento pode ser usado durante uma semana, sendo depois introduzido o tratamento com doxiciclina via oral, tendo, assim, uma resposta clínica mais rápida (DIVERS, 2002). Esta droga não deve ser administrada em altas doses ou por períodos prolongados se o equino estiver desidratado ou se tiver doença ou disfunção renal, visto que insuficiência renal aguda pode ocorrer nestes casos. Também é recomendado o acompanhamento da função renal em equinos sob longo tratamento (DIVERS, 2013)

Ceftiofur na dose de 2 a 4 mg/kg, via intravenosa ou intramuscular, a cada 12 horas, também tem sido utilizado nos tratamentos (DIVERS, 2002), com a Minociclina podendo substituir a doxiciclina em tratamentos de equinos com DL. Esta base tem melhor biodisponibilidade oral que a doxiciclina em equinos, atingindo maior concentração no líquido cefalorraquidiano, visto ser mais lipofílica e menos ligada às proteínas que a doxiciclina. Assim, eventualmente, a Minociclina na dose de 4 mg/kg, via oral, a cada 12 horas, pode substituir a doxiciclina como o tratamento nos tratamentos de DL em equinos (DIVERS, 2013).

Estudo experimental comparando a ação de três antibacterianos em pôneis após três meses de infecção experimental com *B. burgdorferi*, obteve resultados que indicam para o tratamento com oxitetraciclina como droga de escolha. Os pôneis foram tratados por 28 dias e acompanhados durante seis meses após os tratamentos até a eutanásia, verificando-se que somente a oxitetraciclina (na dose de 5 mg/kg/dia) foi capaz de reduzir os títulos de anticorpos a níveis basais em testes sorológicos. Ademais, todas as amostras teciduais de todos os animais deste grupo de tratamento foram negativos em culturas e exames *post mortem*. Os animais do grupo tratado com doxiciclina (10 mg/kg/dia) e ceftiofur (2,2 mg/kg/dia) apresentaram títulos crescentes quatro meses após os tratamentos, bem como amostras teciduais, retiradas *post mortem* ao final de 12 meses, positivas em cultura e PCR.

2.7.5 Prevenção

Certamente, a melhor forma de prevenção é evitar a exposição a carrapatos vetores e impedir que estes fiquem afixados por longos períodos, permitido assim a transmissão das borrelíias aos animais (DIVERS, 2013).

Foi testada uma vacina baseada em OspA recombinante (gene OspA obtido a partir de cepa *B. burgdorferi* B31) com adjuvante (hidróxido de alumínio), inicialmente desenvolvida para uso em humanos, sendo de uso em cães. Tal vacina demonstrou capacidade de bloquear a infecção, evitando a doença em pôneis desafiados com infecção experimental (CHANG et al., 2000b).

Nos Estados Unidos, onde prevalece a *B. burgdorferi* sensu stricto, é possível que esta vacina seja efetiva. Entretanto, na Eurásia e em outras regiões, as diferentes espécies de *B. burgdorferi* sensu lato, assim como outras espécies de *Borrelia*, verifica-se uma extensa heterogenicidade da proteína OspA, o que tem dificultado o desenvolvimento de uma vacina efetiva (BUTLER et al., 2005).

2.8 A Importância das Borrelioses e Outras Zoonoses Transmitidas por Carrapatos para as Forças Armadas

Além das doenças transmitidas por carrapatos serem um grave problema de saúde pública e de ordem econômica, elas também podem ser consideradas como questão de

segurança nacional.

Nos Estados Unidos, amplo estudo na população de militares da Força Aérea Americana em 30 Estados do país, durante os anos de 1989 a 1992, identificou os 462 carrapatos coletados realizando parasitismo em militares como pertencentes a dez diferentes espécies, sendo todas elas vetores de agentes com potencial zoonótico. Também se observou que a maioria dos militares parasitados tinha idade igual ou menor a 20 anos, indicando que a relação com atividades de treinamento em campos e matas pode associar-se ao maior risco de infestação. Entretanto, pela amplitude da idade dos militares parasitados (até 76 anos), há indicação que todos os grupos etários são vulneráveis ao parasitismo e às doenças transmitidas por carrapatos (CAMPBELL; BOWLES, 1994).

Apesar de não haver um levantamento do tipo nas Forças Armadas do Brasil, aparentemente esta vem sendo uma condição comum que, por desconhecimento e falta de uma doutrina no assunto, muitas vezes tem sido negligenciada quanto à sua real relevância sanitária e seu impacto sobre a higidez das tropas (PRADO, 2013).

Militares estão constantemente sendo submetidos a treinamentos e operações em áreas silvestres, rurais, peri-urbanas e urbanas, onde ficam mais expostos e sujeitos ao parasitismo por carrapatos e, conseqüentemente, à infecção por zoonoses. Além disso, o contato com animais de uso militar, à exemplo dos equinos e caninos, pode aumentar os riscos de infecção, visto que tais animais podem atuar como hospedeiros reservatórios ou carreadores de carrapatos infectados para a proximidade do convívio dos militares (PRADO, 2013).

A constante exposição à riscos de parasitismo por carrapatos em militares, sem as devidas medidas de biossegurança para mitigá-lo ou reduzi-lo, contribui para uma maior incidência de doenças transmitidas por tais parasitas. Tal fato pode gerar convalescência, afastamento das atividades laborais, sequelas e doenças crônicas, elevados gastos com tratamentos de saúde, ou mesmo óbitos de militares (PRADO, 2013).

Conforme Pitrat; Wiggans (2001), os perigos ocupacionais, de saúde ambiental e de doenças endêmicas podem impactar seriamente decisões de comandantes de missões e afetar no curto e longo prazo as atividades militares.

As atividades militares geralmente transcorrem, total ou parcialmente, em ambientes como matas, cerrados, campos, entre outras, propiciando a proximidade com animais domésticos e selvagens (possíveis carreadores, reservatórios ou amplificadores de borrelioses) e, conseqüentemente, aumentando o risco do contato com os carrapatos potencialmente vetores (PRADO, 2013).

Corroborando o risco ocupacional para doenças transmitidas por carrapatos a que militares estão expostos, estudos moleculares tem registrado a presença de carrapatos infectados com *Rickettsia rickettsii* em áreas de instrução da Academia Militar das Agulhas Negras, em Resende, Rio de Janeiro (CAMPOS et al., 2008). Kill-Silveira (2010), também detectou *Rickettsia* spp. em carrapatos coletados em duas áreas de instrução militar, uma do Exército e outra da Marinha, no estado do Rio de Janeiro. Além disso, estudo americano sobre populações militares de seu exército tem documentado casos de impacto da Febre Maculosa causada por riquetsias em operações e treinamentos militares em áreas infestadas por carrapatos (SHANKS et al., 2004).

Visando mitigar os riscos de infestação por carrapatos, e conseqüente infecção por borrelioses, riquetsioses e outras doenças, tem sido preconizada uma Doutrina de Biossegurança em Operações Militares, através de Medidas Operacionais de Proteção Preventiva (MOPP), baseada em Medidas de Proteção Individual (MPI) e Medidas de Proteção Coletiva (MPC) (CAMPOS, et al., 2012).

PRADO (2013) propõe como MPC, entre outras ações, o controle estratégico de carrapatos nos animais de emprego militar que, pelo contato estreito com os militares, podem funcionar como carreadores de carrapatos infectados para junto dos humanos. Além disso,

este autor sugere a realização de pesquisas epidemiológicas visando o reconhecimento e monitoramento de agentes patogênicos transmitidos por carrapatos nas populações de animais de emprego militar, que funcionariam como animais sentinela de tais zoonoses, prevendo a emergência e o risco destas doenças na tropa.

No caso das borrelioses no Brasil é possível que os equinos, incluindo os de uso militar, além de sentinelas e carreadores de carrapatos, possam estar funcionando como hospedeiros reservatórios. Há relatos sugestivos desta possibilidade, inclusive com relatos de casos humanos com relação e história epidemiológica de infecção por *B. burdorferi* à partir da infestação de carrapatos oriundos do contato com equinos doentes (MARCELIS et al., 1987).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição da Área de Estudo

O presente estudo foi realizado em rebanho de equinos de uso militar da Academia Militar das Agulhas Negras (AMAN) e da Coudelaria do Rincão (CR).

3.1.1 Academia Militar das Agulhas Negras

A AMAN é localizada na microrregião do Vale do Paraíba Fluminense, no município de Resende, estado do Rio de Janeiro. O município possui uma área de 1.113,507 km², localiza-se a 22°27' de latitude sul e a 44°28' de longitude oeste, com altitude em relação ao nível do mar de 440 m, possuindo um clima classificado como tropical de altitude (Cwa), segundo a classificação climática de Köppen-Geiger (PIEEL et al., 2007).

Tal clima é caracterizado por apresentar médias de temperatura amenas, entre 18°C e 26°C, e amplitude térmica anual entre 7°C e 9°C. No verão, as temperaturas raramente ultrapassam os 30°C. O inverno é relativamente frio com estação seca, estiagem, neste período.

A AMAN é uma instituição de ensino superior do Exército Brasileiro, contando com um efetivo de aproximadamente cinco mil pessoas. Situada no município de Resende, é a maior escola de formação militar da América Latina, com 67 km² de área total dentro do município de Resende.

Basicamente, a área da AMAN é dividida em área residencial, onde localiza-se a Vila Militar (Bairros Independência, Guararapes e Monte Castelo); Área Acadêmica (Prédios do Conjunto Principal, Alas de alojamentos dos Cadetes, Seção de Educação Física e Hospital Escolar); Área de Parques (onde localizam-se as instalações dos Cursos, entre outras edificações, inclusive o Hospital Veterinário, a Seção de Equitação e o Curso de Cavalaria); e Campo de Instrução, que são as áreas de treinamento de operações militares, composta por áreas rurais, de campos, capoeiras e fragmentos de Mata Atlântica.

A área da AMAN é cortada por diversos córregos e cursos d'água, com destaque ao Rio Alambari, afluente do Paraíba do Sul, que nasce no Parque Nacional do Itatiaia e percorre praticamente toda sua área. A presença abundante de cursos de água, campos e fragmentos de Mata Atlântica proporcionam uma rica fauna de animais silvestres na região, com destaque a alguns que podem ser reservatórios de agentes zoonóticos como: capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*); gambás (*Didelphis aurita*); ouriços (*Coendou villosus*); cutias (*Dasyprocta aguti*); jacus, (*Penelope ochrogaster*); preás (*Cavia aperea*) e tatus (*Dysipus novectus*), entre outros. Além disso, em parte das áreas do Campo de Instrução ainda há a presença de outros tipos de animais domésticos de arrendatários como caninos, bovinos, bubalinos e equinos.

3.1.2 Coudelaria do Rincão

A Coudelaria do Rincão está localizada no município de São Borja, região oeste do estado do Rio Grande do Sul, fronteira com a Argentina, a 55° 35' 00" de latitude sul e a 28° 45' 40" de longitude oeste, com uma altitude em torno de 130m acima do nível do mar. O clima, de acordo com a classificação de Koppen, é subtropical úmido, caracterizado por estações bem definidas, sendo as chuvas bem distribuídas ao longo do ano, com precipitação média anual de 1.350 mm, uma temperatura média anual de 21° C e com umidade relativa do

ar média de 75%, de acordo com os dados da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), estação São Borja, Rio Grande do Sul. A área total da Coudelaria é de 14.936,74 hectares, sendo 1.200 hectares ocupados pelo efetivo equino. O restante da propriedade é utilizada para bovinocultura de corte e leite, formação de pastagens, produção de grãos, manobras e treinamentos militares (OLIVEIRA, 2007).

A Coudelaria se originou da antiga estância de São Gabriel, que pertencia a Companhia de Jesus. Em 1843, foi incorporada aos bens do Estado. Em 1891 foi delegada ao Ministério do Exército, com o nome de Colônia de São Gabriel. Somente em 1922 foi criada a Coudelaria Nacional de Rincão que em 1975 foi extinta, sendo seu acervo encaminhado à Coudelaria de Campinas e utilizada pelo Exército apenas como Campo de Instrução de Rincão. Recriada em 1987, incorporou o plantel da extinta Coudelaria de Campinas, permanecendo até a presente data como Coudelaria e Campo de Instrução de Rincão.

Sua finalidade é a produção de equinos para o Exército Brasileiro, tendo especial atenção as áreas de produção, manejo sanitário e nutricional do plantel. Sua infra estrutura atende às necessidades da atividade a qual se propõe, possui pastagens naturais e artificiais, baias e piquetes para os garanhões, piquete maternidade para fêmeas próximas ao parto, pavilhão de baias para mães com potro ao pé e pavilhão de potros desmamados.

3.2 Inquérito Epidemiológico

3.2.1 Delineamento do estudo e amostragem

Efetou-se um estudo do tipo transversal de uma coorte de equinos de uso militar do município de Resende - RJ, mantidos na área da Academia Militar das Agulhas Negras e do município de São Borja - RS, mantidos na área da Coudelaria do Rincão.

Como não há trabalhos publicados ou estudos acerca da soroprevalência de *Borrelia* spp. em equinos no município de Resende e São Borja, adotou-se a prevalência esperada como sendo 50%, conforme preconizado por Thrusfield (1995).

Assim, obteve-se o número de 384 amostras de soros equinos para a região de Resende, admitindo-se um intervalo de confiança de 95%, uma margem de erro de 5%, e seguindo-se a equação seguinte descrita por Sampaio (2002):

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

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

Entretanto, optou-se pela realização de um censo da população de equinos de uso militar, visto que o tamanho amostral calculado superou o tamanho da população de animais da AMAN, que era de 174 equinos de uso militar. Para a CR decidiu-se pelo número de 300 amostras de soros equinos da propriedade.

Sendo assim, todos os equinos de uso militar presentes nos dois rebanhos no momento do estudo foram submetidos a exame físico visando verificar a infestação de carrapatos, assim como tiveram amostras de sangue coletadas, no período de janeiro de 2013 a março de 2013.

3.2.2 Caracterização dos rebanhos

Por se tratarem de equinos de uso militar, os rebanhos em estudo têm características particulares quanto ao manejo sanitário, zootécnico e quanto ao tipo de utilização.

No momento em que foi realizado o estudo na AMAN, os 174 equinos eram

submetidos a dois tipos de manejo: Regime estabulado e semi-estabulado. No regime estabulado os equinos eram mantidos em baias a maior parte do dia, recebendo feno de alfafa e concentrado (ração balanceada) em horários determinados, sendo ocasionalmente soltos em piquetes, por curtos períodos. No regime semi-estabulado os equinos são mantidos soltos em áreas de pastagem a maior parte do dia, sendo presos em baias para fins de fornecimento de concentrado e para utilização em instruções militares quando necessário.

Com relação ao controle de ectoparasitas, tais equinos têm sido submetidos, desde o ano de 2005, a um controle de carrapatos baseado em pulverização com solução de cipermetrina a 15%, diluída na proporção de 2 ml por litro de solução, sendo aplicados 4 litros de solução por equino. As aplicações são realizadas semanalmente, em todo o plantel, entre os meses de abril a outubro, e mensalmente entre os meses de novembro a março, conforme proposto por Labruna et al. (2004), associada com aplicação de pastas à base de produtos carrapaticidas nos pavilhões auriculares e nos divertículos nasais conforme proposto por Bello et al. (2008), a cada 35 dias, durante todo o ano.

Na Coudelaria do Rincão, os animais são utilizados para reprodução, divididos em diferentes categorias: garanhões, fêmeas prenhas, fêmeas vazias, potros de diferentes idades. O manejo alimentar é o pasto artificial e nativo, com suplementação energética, proteica e mineral. O controle de carrapatos é realizado através de pulverização com produtos carrapaticidas quando é constatada algum tipo de infestação. Os animais são soltos em diversos piquetes de forrageiras nativas e artificiais presentes na propriedade. Como característica marcante no manejo dos equinos, está a utilização de pastagens consorciadas com o rebanho bovino, caracterizando o manejo como "pastejo misto".

3.2.3 Ficha de informação

Cada animal teve seus dados registrados em uma Ficha Individual de Informação de Equino (Anexo A), visando recolher informações inerentes aos equinos (idade, sexo, pelagem, raça), quanto à infestação por carrapatos (presença ou ausência, e gênero de carrapatos que infestavam cada animal no momento da coleta), e quanto às condições de manejo (estabulado ou semi-estabulado, característica do ambiente de pastejo, áreas de criação em que se encontra, entre outras). A coleta de tais informações foi realizada no ato da coleta (cor, sexo, tipo de manejo) e através do Sistema de Controle de Equinos do Exército (Sistema Pégasus), (idade, tempo de criação). Todas as informações adquiridas a partir de tais fichas foram tabuladas a fim de avaliar possíveis fatores associados à sorreatividade dos equinos à *Borrelia* spp..

3.2.4 Coleta de carrapatos e amostras de sangue

Todos os equinos tiveram todo o corpo inspecionado visualmente, com atenção nas regiões mais comumente parasitadas por Ixodídeos como: pavilhão auricular, cabeça, pescoço, peito, axilas, região inguinal e embaixo da cauda. Dos animais parasitados foram coletados todos os carrapatos presentes, armazenados em tubos identificados contendo álcool isopropílico para a posterior identificação das espécies e contagem do número de carrapatos. A presença de infestação de carrapatos foi categorizada considerando-se animais infestados aqueles que apresentavam ao menos um carrapato realizando parasitismo. O grau de infestação de carrapatos foi categorizado em infestação ausente ou leve (animais com até 20 carrapatos) e moderada a pesada (animais com mais de 20 carrapatos).

Uma amostra de 10 mL de sangue periférico foi coletada de cada animal através de punção da veia jugular, colocada em tubo seco (sem anticoagulante), sendo devidamente identificada, acondicionada em recipiente térmico e encaminhada ao Laboratório de Análises

Clínicas do Hospital Veterinário da AMAN (LAC HVet AMAN). Após, as amostras foram centrifugadas a 2500xg por 5 minutos, sendo o soro separado e aliqotado em microtubos de polipropileno de 1,5 mL, identificados e acondicionados a -20°C.

Posteriormente, foram encaminhados, sob-refrigeração, ao Laboratório de Hemoparasitos e Vetores da Estação Experimental de Pesquisa Parasitológica W.O. Neitz (E.E.P.P. W.O. Neitz), na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, e mantidos a -20°C até o momento da realização dos ensaios sorológicos no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Parasitologia Animal.

3.3 Teste Sorológico

3.3.1 Obtenção do antígeno

O meio de Kelly modificado ou meio BSK (Barbour, Stoenner e Kelly), para cultivo de *B. burgdorferi* foi preparado segundo descrição original (BARBOUR, 1984). Na obtenção do antígeno 1,0 ml de cultura de *B. burgdorferi* sensu stricto cepa G39/40 de origem americana foi acrescido a 500 ml do meio BSK, mantendo-o em estufa a 33°C por uma semana.

Centrifugou-se o meio por 12.000xg/20 min. a 4 °C, sendo o sedimento ressuspense em tampão salina fosfatada (PBS) 0,001M MgCl₂.6H₂O, pH 7,4, submetendo-se ao tratamento anterior por duas vezes. O "pellet" formado foi lavado com PBS e finalmente suspenso na mesma solução ao volume de 6,0 ml, sendo a suspensão foi submetida à sonicação (Fisher Sonic Dismembrator, model 300, Dynatech) por três minutos, com intervalos de 15 segundos. Posteriormente filtrada a 0,45µm e aliqotada, obteve-se assim o extrato total de antígeno para uso nos procedimentos de ensaios imunológicos, o qual foi armazenado entre -20 a -70°C até o momento de uso conforme sugere Grodzicki e Steere (1988).

Determinou-se a concentração protéica do extrato total de antígeno por meio da técnica do reagente de Folin, segundo metodologia descrita por Lowry et al. (1951), obtendo-se 1,4 mg/ml de conteúdo protéico.

3.3.2 Obtenção do controle positivo

O soro para o controle positivo foi obtido por Madureira (2007), conforme descrito a seguir. Inoculou-se experimentalmente antígeno inativado em um potro macho, sadio, com três meses e meio de idade, pesando 113 Kg de peso vivo, originário da fazenda da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, localizada no município de Cachoeiras de Macucu, Rio de Janeiro.

Foram realizadas quatro inoculações, com intervalos de 15 dias, de antígeno inativado de *B. burgdorferi* cepa G39/40, com adjuvante (Freünd), por via subcutânea, com agulhas e seringas descartáveis de 10 mL, na dose de 1,0 mg/15 Kg. Obteve-se soro do animal antes do primeiro inóculo (coleta 0) e a cada cinco dias, até completar 125 dias (coleta 25), procedendo-se a obtenção da curva de anticorpos IgG do animal imunizado e selecionou-se o soro da coleta 20 (45 dias pós quarto inóculo) como controle padrão positivo ideal.

3.3.3 Obtenção dos controles negativos

Para obtenção dos controles negativos foram utilizados doze soros de potros da raça puro sangue inglês (PSI), oriundos do Jóquei Clube do Rio de Janeiro, com idades variando

de 12 a 24 meses. Os animais encontravam-se clinicamente sadios, mantidos em baias individuais, recendo alimentação apropriada, sem histórico de contato com carrapatos.

A colheita do sangue foi realizada como descrito anteriormente (item 5.2.4), assim como alíquotagem e o armazenamento.

3.3.4 Ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) indireto

As amostras coletadas foram analisadas através do ELISA indireto, conforme padronizado por SALLES (2001), realizando-se o ensaio para detectar anticorpos da classe IgG homólogos contra *B. burgdorferi* sensu lato utilizando-se o antígeno de *B. burgdorferi* sensu stricto cepa G39/40 diluído a 20 µg/mL em tampão carbonato pH 9,6, sensibilizando-se microplacas de poliestireno com 96 orifícios (Nunclon™ Maxisorp; Nunc, Denmark), incubadas em câmara úmida a 4 °C "overnight".

Após sensibilização, as placas foram lavadas por três vezes com Tampão Salina Fosfato (PBS tween 20 0,05% pH 7,4 - PBST) e bloqueadas com 200 µL de Leite em pó 5% diluído em PBST e incubadas por 90 minutos, em câmara úmida, em estufa bacteriológica a 37° Celsius. Posteriormente, lavaram-se por três vezes as placas conforme descrito anteriormente.

Foram utilizadas 12 amostras negativas de animais previamente testadas e um controle positivo de um equino inoculado com antígeno inativado de *B. burgdorferi* cepa G39/40. Os 12 controles negativos, o controle positivo e os soros testes foram diluídos na concentração de 1:800 em PBST e dispostos 100 µL nas placas, que foram incubadas à 37° Celsius por 90 minutos em câmara úmida e, posteriormente, lavadas como na etapa anterior.

Então, foi disposto 100 µL do conjugado IgG de coelho anti IgG equino ligado a fosfatase alcalina (*antihorse IgG, whole molecule, alkaline phosphatase*, SIGMA®, USA) na diluição de 1:1000 em PBST, sendo as placas incubadas por mais 90 minutos nas mesmas condições anteriores, com posterior lavagem.

Por fim, as placas foram forradas com a solução reveladora composta pelo substrato paranitro fenil-fosfato de sódio (PNPP) (SIGMA®- USA) diluído em tampão dietanolamina pH 10,5 na concentração de 1mg/ml. Estas permaneceram à temperatura ambiente até a revelação e momento de leitura em espectrofotômetro para microplacas de 96 orifícios (Multiskan FC Thermo Science / Uniscience, Modelo 1, Versão 1.00.79, NS 357-00429), utilizando filtro para comprimento de onda de 405nm. Em todas as fases do ensaio utilizou-se 200µL de solução por orifício. O ponto de corte para o ensaio foi determinado segundo a média mais três vezes o desvio padrão dos valores da densidade óptica (DO) dos controles negativos (Frey et al. 1998). O índice de densidade óptica foi calculado com base na fórmula $DO \times 100 / \text{ponto de corte}$. Desta forma, índices de DO com valores acima de 100 foram considerados positivos.

3.4 Avaliação dos Resultados e Análise Estatística

Os resultados dos exames sorológicos (positivos no ELISA, sob a titulação de 1:800) foram comparados e associados às variáveis obtidas através da ficha de exame e informação, através da análise de regressão logarítmica, em nível de 5% de significância. Para as variáveis com significância foram calculadas as *Odds Ratio* (OR) e os respectivos intervalos de confiança (IC). Todas as análises utilizaram o programa R (R Development Core Team 2010).

Para a avaliação dos possíveis fatores associados à soropositividade, as variáveis independentes selecionadas à partir das fichas de exame físico e informação dos equinos, foram analisadas em função da frequência da detecção de anticorpos homólogos anti-*B.*

burgdorferi sensu lato, utilizando o teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de 25% de significância, sendo as variáveis com diferença estatística incluídas no modelo de regressão logística, em nível de 5% de significância, através do programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2010).

4 RESULTADOS

4.1 Infestação por Carrapatos

Neste estudo foi observada a ocorrência de somente duas espécies de carrapatos realizando parasitismo nos equinos na AMAN, a saber: *A. Sculptum* (Complexo *A. cajennense*) e *D. nitens*. Verificou-se que os carrapatos, de acordo com a espécie, estavam em diferentes graus de infestação nos animais, assim como também em diferentes índices médios de infestação por carrapatos dos equinos de uso militar ao se comparar os grupos de manejo em que estavam distribuídos (Tabela 2).

Tabela 2. Presença ou ausência de equinos infestados por carrapatos observadas nos diferentes rebanhos para *Amblyomma sculptum*, *Dermacentor nitens* e *Rhipicephalus microplus* nos equinos de uso militar do município de Resende, Rio de Janeiro e São Borja, Rio Grande do Sul.

Rebanho	<i>Amblyomma sculptum</i>	<i>Dermacentor nitens</i>	<i>Rhipicephalus microplus</i>
Rio de Janeiro	Presença	Presença	Ausência
Rio Grande do Sul	Ausência	Ausência	Presença

4.2 Inquérito Sorológico

A partir das 174 amostras submetidas ao ELISA, foram detectados 52 (prevalência de 29,89%) animais sororreagentes na AMAN e 134 (prevalência de 44,66%) na CR para *Borrelia* spp. Os resultados de sororeatividade e prevalências nos rebanhos são expressos na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados de sororeatividade ao iELISA para *Borrelia* spp., respectivas prevalências nos rebanhos equinos, e resultado do teste de comparação de proporções.

	iELISA		Prevalência	Teste de comparação de proporções <i>p</i> -valor
	Positivos	Negativos		
Rio de Janeiro	52	122	29,88%	0,002
Rio Grande do Sul	134	166	44,66% *	

Rio de Janeiro: 174 equinos da Academia Militar das Agulhas Negras, município de Resende.

Rio Grande do Sul: 300 equinos da Coudelaria do Rincão, município de São Borja.

4.3 Análise Bivariada, Multivariada e Fatores Associados aos Equinos Sororreagentes

Na Tabela 4, observa-se a análise bivariada e multivariada dos fatores associados à soropositividade dos equinos frente à detecção de anticorpos homólogos anti-*B. burgdorferi* cepa G 39/40 através do ELISA indireto. Dentre todas as variáveis independentes, definição racial, tempo de criação na propriedade, grau de infestação por carrapatos, não apresentaram associação estatística ($p > 0,25$) na análise bivariada (Tabela 4). As variáveis gênero, idade,

tipo de emprego, origem do equino e infestação por carrapatos apresentaram significância na análise bivariada ($p < 0,25$) sendo, por este motivo, incluídas na análise multivariada. De todas estas variáveis submetidas à regressão logística, as fêmeas, os com idade inferior a cinco anos e os oriundos da Coudelaria do Rincão foram significativamente influente para a soropositividade dos animais.

Apesar disto, observou-se que fêmeas, animais com idade inferior a seis anos, equinos com raça definida, equinos oriundos da Coudelaria do Rincão, apresentaram maior frequência de soropositividade para *Borrelia* spp..

Tabela 4. Análise bivariada e multivariada da frequência de equinos soropositivos através do ensaio de imunoadsorção enzimático (ELISA) indireto para *Borrelia* sp., em função dos fatores associados como gênero, idade, definição racial, tempo do animal na propriedade, origem dos animais e grau de infestação de carrapatos nos equinos de uso militar dos estados do Rio de Janeiro e do Rio Grande do Sul, 2015.

Características dos animais e manejo	N	(%)	Bivariada		Multivariada		
			χ^2	P	P	OR	IC 95%
Estado							
Rio de Janeiro	174	29,9	10,09	0,00	0,67	*	*
Rio Grande do Sul	300	44,7				-	-
Gênero							
Macho	182	32,4	5,76	0,02	0,03	*	*
Fêmea	292	43,5				1,96	(1,25 – 3,08)
Idade							
≤ 6 anos	161	50,9	14,32	0,00	0,58	-	-
> 6 e ≤ 10 anos	131	34,4			0,59	-	-
> 10 e ≤ 20 anos	167	32,9			0,67	-	-
> 20 anos	15	26,7			*	*	*
Definição racial							
Com raça	238	39,9	0,09	0,76	-	-	-
Sem raça definida	236	38,6			-	-	-
Tempo de criação na propriedade							
≤ 5 anos	249	46,6	11,89	0,00	0,02	2,67	(1,14 – 6,26)
> 5 e ≤ 15 anos	172	31,4			0,81	-	-
> 15 anos	53	30,2			*	*	*
Origem dos equinos							
Coudelaria do Rincão	373	42,9	9,80	0,00	0,01	2,33	(1,17 – 4,62)
Fora da Coudelaria	101	25,7				*	*
Grau de Infestação por carrapatos							
Moderado/alto	33	30,3	1,18	0,36	0,92	-	-
Leve/ausente	441	39,9				*	*

N: Número de amostras de animais; χ^2 : Valor do Qui-quadrado; P: p-valor; OR: *Odds Ratio*; IC: Intervalo de confiança. *Categoria de referência.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo foi observada uma prevalência de 29,89% na AMAN e 45,30% na CR de equinos sororeativos para anticorpos homólogos da classe IgG anti-*B. burgdorferi* sensu lato ao ELISA indireto. Tal fato corrobora a circulação de *Borrelia* spp. no município de Resende e São Borja, fato observado também em outros municípios do Brasil, conforme previamente reportado por Madureira (2004) e Salles et al. (2002).

Este resultado de soroprevalência é bastante similar ao encontrado por Madureira et al. (2007) em equinos dos municípios de Três Rios e Vassouras, estado do Rio de Janeiro, os quais evidenciaram uma soroprevalência de 28,4% também ao ELISA indireto. Também é semelhante ao encontrado por Galo et al. (2009) em equinos dos municípios de Castanhal, Belém, Santa Isabel e Ananindeua, todos do estado do Pará, que apresentaram soroprevalência de 26,7%.

No entanto, a prevalência encontrada nos equinos de uso militar do município de Resende e São Borja, difere da prevalência encontrada em equinos da região insular do estado do Pará, visto que Madureira et al. (2009) encontraram prevalência de 9,5% em equinos da Ilha de Marajó, local em que os equinos estavam parasitados somente pela espécie *D. nitens*, enquanto nos rebanhos militares estudados os equinos eram parasitados também pelo *A. sculptum* e *R. microplus*.

Salles et al. (2002) encontraram soroprevalência de 42,8% em equinos do município de Seropédica criados extensivamente e com altas infestações de carrapatos, compatíveis com os resultados da Coudelaria do Rincão que possuem manejo semelhante. Este estudo também encontrou soroprevalência de 2,9% em equinos de uso militar da Polícia Militar do Rio de Janeiro, e de 0,9% em equinos do Exército Brasileiro utilizados para produção de imunógenos (soro anti-ofídico) no Instituto de Biologia do Exército. Em ambos locais foram evidenciadas baixas infestações de carrapatos. As menores prevalências encontradas por Salles et al. (2002) em equinos militares da Polícia Militar e Instituto de Biologia do Exército, em comparação ao resultado encontrado nos equinos da AMAN e da Coudelaria do Rincão, deve-se provavelmente à maior exposição destes últimos à carrapatos, bem como a características de manejo e pastagens. Equinos estabulados que tem acesso ocasional à pastagens foram evidenciados com maior risco para sororeatividade para *Borrelia* como citado por Engevall et al. (2001).

Os aspectos de biodiversidade de flora e fauna ocorrem nas pastagens frequentadas pelos equinos dos dois rebanhos, inclusive o pastejo misto com bovinos descrito no rebanho do Rio Grande do Sul, possibilitaram a infestação pelos carrapatos *A. sculptum*, *D. nitens* na AMAN e pelo *R. microplus* na Coudelaria do Rincão. O risco de infecção por *Borrelia* spp. está correlacionado com a oportunidade dos animais ou humanos serem picados por carrapatos infectados. Desta forma é dependente, quantitativamente, da densidade de carrapatos vetores nas áreas em que estes tem acesso, bem como também depende, qualitativamente, da proporção destes carrapatos que estão realmente infectados. Ademais, a maioria dos casos de Doença de Lyme (DL), no hemisfério norte, tem sido associados aos estágios de ninfa dos vetores (FRITZ; KJEMTRUP, 2003). Apesar da análise multivariada do rebanho como um todo não ter evidenciado correlação entre a infestação por carrapatos e a soropositividade nos animais, verificou-se que as fêmeas com menos de 5 anos na propriedade e com origem na Coudelaria do Rincão apresentaram associação positiva.

Neste estudo transversal, no rebanho da AMAN e da Coudelaria do Rincão, apesar das infestações por *A. sculptum* ou por *D. nitens* não terem mostrado associação com soropositividade pela análise multivariada, ao analisarmos a infestação por carrapatos *R. microplus* como única espécie parasitando os animais no rebanho do Rio Grande do Sul,

podemos sugerir que a presença desse vetor está associada à soropositividade para *Borrelia* spp., sendo fator de risco significativo corroborando com o relato de Yoshinari et al., (2003) da coexistência de anticorpos para *B. burgdorferi* e *Babesia bovis* em humanos doentes com SBY. Além disso, Rezende et al. (2008) visualizaram espiroquetas em cultivo de células embrionárias, assim como na hemolinfa e nos ovos macerados de carrapatos *R. B. microplus* infectados naturalmente, sugerindo tratar-se de *Borrelia* spp..

Na presença do *R. microplus* parasitando os equinos em consequência de um pastejo misto com bovinos, deverá ser considerada a possibilidade citada por Rogers et al. (1999) da ocorrência de reações cruzadas entre *B. burgdorferi* e *B. theileri*. A *B. theileri* é uma espiroqueta transmitida principalmente por carrapatos *R. microplus* que pode infectar bovinos e equinos (COLLOW, 1967). Madureira (2007) caracterizou morfométrica e genotipicamente um isolado de espiroqueta oriunda de equino do estado do Rio de Janeiro, classificando o microorganismo como *B. theileri*. Entretanto, os próprios autores Rogers et al. (1999) não evidenciaram a ocorrência de reações cruzadas entre essas duas espécies de borrelíias quando realizaram o teste de ELISA na avaliação da especificidade do ensaio.

Os resultados obtidos no presente inquérito também confirmam a hipótese de que os equinos são considerados animais sentinelas epidemiológicos para a *Borrelia* spp., bem como a possibilidade de estarem atuando como carreadores de carrapatos infectados para próximo do convívio do homem. Desta forma, tal fato ocorre não só nos países do hemisfério norte (METCALF et al., 2008), mas também no Brasil, corroborando estudos nacionais já realizados (SALLES et al., 2002; MADUREIRA et al., 2007; GALO et al., 2009; MADUREIRA et al.; 2009).

Madureira et al. (2009) alertaram que a presença de anticorpos contra *B. burgdorferi* em equinos é indicativo da circulação de *Borrelia* spp. no rebanho, sendo necessária atenção para a ocorrência de borreliose em humanos. Assim, considerando a importância desta doença emergente em nosso país, o presente estudo reforça as evidências da circulação de uma *Borrelia* em nosso território ao verificar sororeatividade nos equinos de uso militar.

Campos et al. (2008) e Kill-Silveira (2010) chamaram a atenção para os impactos causados por doenças transmitidas por carrapatos a militares, ao detectarem a presença de *Rickettsia* em carrapatos coletados em áreas militares. Este estudo, ao verificar a circulação de *Borrelia* spp. em equinos de uso militar, corrobora a relevância das doenças transmitidas por carrapatos a militares ao gerar evidência epidemiológica da circulação de *Borrelia* spp. no rebanho equino e, conseqüentemente, na área de instrução militar da AMAN e da Coudelaria do Rincão, possibilitando a transmissão deste agente.

Ademais, o fato dos equinos agirem como sentinelas epidemiológicas e, possivelmente, como carreadores de carrapatos infectados torna imperiosa a necessidade de monitoramento sorológico e do controle de carrapatos em animais de emprego militar, como medidas de proteção coletiva para doenças transmitidas por carrapatos, conforme proposto por Prado (2013), contribuindo para mitigar o risco de transmissão de zoonoses em atividades militares (SOARES, 2013).

6 CONCLUSÕES

O pastejo misto, propiciando proximidade entre equinos e bovinos, na Coudelaria do Rincão, possibilita que carrapatos *R. microplus* realizem parasitismo nos equinos.

A presença de infestação de carrapatos *R. microplus* foi significativamente associada à sororeatividade dos equinos para *Borrelia* spp.

A presença de anticorpos homólogos anti-*Borrelia* spp. em equinos de uso militar no município de Resende, estado do Rio de Janeiro, e São Borja, estado do Rio Grande do Sul, reforça o papel destes animais como sentinelas epidemiológicos, indicando a circulação deste organismo nas regiões estudadas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, I.S.; MARZAGÃO, R.C.; YOSHINARI, N.H., SCHUMAKER, T.T.S. Borrelia-like Spirochetes Recovered from Ticks and Small Mammals Collected in the Atlantic Forest Reserve, Cotia County, State of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 5, p. 621-624, 2000a.
- ABEL, I.S.; ALMEIDA JUNIOR, D.E.; FONSECA, A.H.; SOARES, C.O.; ISHIKAWA, M.M. *Borrelia* sp. in naturally infected *Didelphis aurita* (Wied, 1826) (Marsupialia: Didelphidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, n. 3, 2000b.
- ALVES, A.L.; MADUREIRA, R.C.; SILVA, R.A.; CORRÊA, F.N.; BOTTEON, R.C.C.M. Freqüência de anticorpos contra *Borrelia burgdorferi* em cães na região metropolitana do Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 4, p. 204-205, 2004.
- BARANDIKA, J.F.; HURTADO, A.; GARCÍA-SANMARTÍN, J.; JUSTE, R.A.; ANDA, P.; GRACÍA-PÉREZ, A.L. Prevalence of Tick-borne zoonotic bacteria in questing adult ticks from Northern Spain. **Vector-Borne and Zoonotic Disease**, v.8, n.6, p. 829-835, 2008.
- BARBIERI, A. M.; VENZAL, J. M.; MARCILI, A.; ALMEIDA, A. P.; GONZALEZ, E. M.; LABRUNA, M. B. *Borrelia burgdorferi* sensu lato infecting Ticks of *Ixodes ricinus* Complex in Uruguay: First Report for the Southern Hemisphere. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 13, n. 3, p. 147-153, 2013.
- BARBOUR, A. G. Isoantigen and cultivation of Lyme disease spirochetes. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 57, p. 521-525, 1984.
- BARBOUR, A. G.; HAYES, S. F.. Biology of *Borrelia* species. **Microbiology Reviews**, v. 50, n. 4, p. 381-400, 1986.
- BARBOZA, W.G.A. **Detecção de *Borrelia* sp em gambás (*Didelphis aurita*) imunossuprimidos com ciclofosfamida**. 1997. 43p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 1997.
- BARROS-BATTESTI, D.M.; YOSHINARI, N.H.; BONOLDI, V.L.; DE CASTRO GOMES, A. Parasitism by *Ixodes didelphidis* and *I. loricatus* (Acari: Ixodidae) on small wild mammals from an Atlantic Forest in the State of Sao Paulo, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 37, n. 6, p. 820-827, 2000.
- BATHE, C.; SCHWARTZ, R.A. Lyme Disease. Management and prevention. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.64, n.4, p. 639-653, 2011.
- BELLO, A. C. P. P.; CUNHA, A. P.; LEITE, R. C.; OLIVEIRA, R. R.; RIBEIRO, A. C. C. L.; DOMINGUES, L. N.; FREITAS, C. M. V.; BASTIANETTO, E.; DALLAROSA, R. C. Controle de *Anocentor nitens* (NEUMANN, 1897) (ACARI:IXODIDAE) em equinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, n. 17, Supl 1, p. 59-63, 2008.

BERNARD, W. V.; COHEN, D.; BOSLER, E.; ZAMOS, D. Serologic survey for *Borrelia burgdorferi* antibody in horses referred to a mid-Atlantic Veterinary Teaching Hospital. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 196, n. 8, p. 1255-1258, 1990.

BURGESS, E.C.; GILLETTE, D.; PICKETT, J.P. Arthritis and panuveitis as manifestations of *Borrelia burgdorferi* infection in a Wisconsin pony. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.189, p. 1340-1342, 1986.

BUTLER, C. M.; HOUWERS, D. J.; JONGEJAN, F.; VAN DER KOLK, J. H. *Borrelia burgdorferi* infections with special reference to horses. A review. **Veterinary Quarterly**. n. 27, v. 4, p. 146-156, 2005.

CAPRA, F. **As conexões ocultas: uma ciência para uma vida sustentável**. 4. ed. São Paulo: Editora Pensamento-Cultrix, 296 p., 2002.

CAMPBELL, B.S.; BOWLES, D.E. Human tick bite records in a United States Air Force population, 1989-1992: implications for tick-borne disease risk. **Journal of Wilderness Medicine**, v. 5, p.405-412, 1994.

CAMPOS, C.H.C.; GALLOTTI, A.M.; SOARES, O.A.B.; PRADO, R.F.S.; FERREIRA, B. H.F.F.; PASSOS, M.H.; DUQUE, L.S.; COUTINHO, R.N.; MARQUES, F.S.; PORTO, R.A. N. Medidas de proteção individual contra infestação por carrapatos em área de treinamento militar no Estado do Rio de Janeiro. In: **Anais do 39º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**. Santos. 2012.

CAMPOS, C.H.C.; FONSECA, A.H.; MAFRA, C.L.; OLIVEIRA, K.A.; SILVA, W.G.; MOURÃO, L.C.; STUDART, A.G. *Rickettsia* em carrapatos capturados em área de treinamento militar no estado do Rio de Janeiro. In: **Anais do XV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária**. Curitiba. 2008.

CHAME, M.; LABARTHE, N. **Saúde Silvestre e Humana: experiências e perspectivas**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 108p., 2013.

CHANG, Y.F.; NOVOSOL, V.; McDONOUGH, S.P. Experimental infection of ponies with *Borrelia burgdorferi* by exposure to Ixodid ticks. **Veterinary Pathology**, v.37, p. 68-76, 2000a.

CHANG, Y.F.; NOVOSOL, V.; MCDONOUGH, S.P.; CHANG, C.F. JACOBSON, R.H.; DIVERS, T.J.; QUIMBY, F.W.; SHIN, S.; LEIN, D.H. Vaccination against Lyme Disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface protein A (rOspA) in horses. **Vaccine**, v.18, p. 540-548, 2000b.

COHEN, N.D.; HECK, F.C.; HEIM, B.; FLAD, D.M.; BOSLER, E. M.; COHEN, D. Seroprevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in a population of horses in central Texas. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 201, n. 7, p. 1030-1034, 1992.

COLLOW, L. L. Observations on tick transmitted spirochaetes of cattle in Australia and South Africa. **British Veterinary Journal**, v.123, p.492-497, 1967.

- CORDEIRO, M.D. **Diagnóstico sorológico de *Rickettsia* spp. e *Borrelia* spp. em cães no Município de Seropédica, RJ.** 2012. 60p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal), Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.
- CORDEIRO, M.D.; MEIRELES, G.S.; SILVA, J.B.; SOUZA, M.M.S., FONSECA, A.H. Soroprevalência para *Borrelia* spp. em cães no município de Seropédica, estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.34, n.3, p.251-256, 2012.
- DA COSTA, I.P.; BONOLDI, V.L.N.; YOSHINARI, N.H. Search for *Borrelia* sp. in Ticks Collected from Potential Reservoirs in an Urban Forest Reserve in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil: a Short Report. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n.5, 2002.
- DANTAS-TORRES, F.; CHOMEL, B.B.; OTRANTO, D. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 10, p.437-446, 2012.
- DE SILVA, A.M.; FIKRIG, E. Growth and migration of *Borrelia burgdorferi* in Ixodes ticks during blood feeding. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.53, p. 397-404, 1995.
- DE SILVA, A.M.; FIKRIG, E. Arthropod and host-specific gene expression by *Borrelia burgdorferi*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 99, p. 377-379, 1997.
- DICKINSON, F. O.; BATTLE, M. C. Lyme borreliosis. **The Infections Diseases Review**, v. 2, n. 1, p. 23-26, 2000.
- DIVERS, T.J. Lyme Disease. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 22, n. 9, p. 406-406, 2002.
- DIVERS, T.J. Lyme disease. In: SELTON, D.C; LONG, M.T. **Equine Infectious Diseases**. 2. ed. Saint Louis: W.B. Saunders. p. 311-315, 2007.
- DIVERS, T. J. Equine Lyme Disease. **Journal of Equine Veterinary Science**, n. 33, p. 488-492, 2013.
- DIVERS, T.J.; MAIR, T. S.; CHANG, Y.F. Lyme disease in horses. In: MAIR, T.S.; HUTCHINSON, R.E. **Infectious Diseases of the Horse**. 1. ed. Mereworth: Equine Veterinary Journal Limited, p. 286-292, 2009.
- DURRANI, A.Z.; GOVAL, S.M.; KAMAL, N. Retrospective Study on Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* Antibodies in Horses in Minnesota. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 31, n. 8, p. 427-429, 2011.
- EGENVALL, E.; FRANZÉN, P.; GUNNARSSON, A.; ENGVALL, E.O; VAGSHOLM, I.; WIKSTROM, U.B.; ARTURSSOM, K. Cross-Sectional study of seroprevalence to *Borrelia burgdorferi* sensu lato and granulocytic *Ehrlichia* spp. And demographic, clinical and tick-exposure factor in Swedish Horses. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 49, p. 191-208, 2001.
- ENG, T.R.; WILSON, M.L.; SPIELMAN A. Greater risk of *Borrelia burgdorferi* infection in dogs than in people. **Journal of Infectious Disease**, v.158, p.1410-1411, 1988.

- FREY, A.; DI CANZIO, J.; ZURAKOWSKI, D. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. **Journal of Immunological Methods**, v. 221, p.35-41, 1998.
- FRITZ G.L.; KJEMTRUP A.M. Lyme borreliosis. **Journal of American Medical Association**, v. 223, n. 9, p. 1261-1270, 2003.
- FONSECA, A.H.; SALLES, R.S.; SALLES, S.A. N.; MADUREIRA, R.C.; YOSHINARI, N.H. Borreliose de Lyme *simile*: uma doença emergente e relevante para a dermatologia no Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 2, p. 171-178, 2005.
- GALO, K.R.; FONSECA, A.H.; MADUREIRA, R.C.; BARBOSA NETO, J.D. Frequência de anticorpos homólogos anti-*Borrelia burgdorferi* em equinos na mesorregião metropolitana de Belém, Estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n.3, p.229-232, 2009.
- GERN, L.; AESTRADA-PENA, A.; FRANSEN, E.; GRAY, J. S.; JAENSON, T. G. T.; JONGEJAN, F.; KAHL, O.; KORENBERG, E.; MEHL, R.; NUTTALL, P. A. European Reservoir Hosts of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v. 287, p. 196-204, 1998.
- 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.
- GREENE, R.T.; WALKER, R.L.; NICHOLSON, W.L.; LEVINE, J.F. Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay to an indirect immunofluorescence assay for the detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in the dog. **Veterinary Microbiology**, v.26, p.179-190, 1991.
- GREENE, R. T.; WALKER, R. L.; NICHOLSON, W. L.; HEIDNER, H. W.; LEVINE, J. F.; BURGESS, E. C.; WYAND, M.; BREITSCHWERDT, E. B.; BERKHOFF, H. A. Immunoblot analysis of immunoglobulin G response to the Lyme disease agent (*Borrelia burgdorferi*) in experimental and naturally exposed dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 4, p. 648-653, 1988.
- GRENAGER, N.S. Tick-Borne Diseases - Lyme Disease, Anaplasmosis, Piroplasmosis. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.33, p.487, 2013.
- GRODZICKI, R. L.; STEERE, A. C. Comparison of immunoblotting and indirect enzymelinked immunosorbent assay using different antigen preparations for diagnosing early Lyme Disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 157, n. 4, p. 790-797, 1988.
- GUGLIELMONE, A. A.; BEATI, L.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; NAVA,S.; VENZAL, J. M.; MANGOLD,A. J.; SZABÓ, M. P. J.; MARTINS, J. R.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; ESTRADA-PEÑA,A. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Experimental and Applied Acarology**, v. 40, n. 2, p. 83-100, 2008.
- HARVEY, R.A.; CHAMPE, P.C.; FISHER, B.D.. **Microbiologia ilustrada**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 448 p., 2008.

HAHN, C.N.; MAYHEW, I.G.; WHITWELL, K.E.; SMITH, K.C.; CAREY, D.; CARTER, S.D.; READ, R.A. A possible case of Lyme borreliosis in a horse in the UK. **Equine Veterinary Journal**, n.28, p. 84-88, 1996.

HASLE, G.; BJUNE, G. A.; MIDTHJELL, L.; ROED, K.H., LEINAAS, H.P. Transport of Ixodes ricinus infected with Borrelia species to Norway by northward-migrating passerine birds. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.2, p. 37-43, 2011.

HUMAIR, P. F. Birds and *Borrelia*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 291, n. 33, p. 70-74 , 2002.

IMAI, D.M.; BARR, B.C.; DAFT, B.; BERTONE, J.J.; FENG, S.; HODZIC, E.; JOHNSTON, J.M.; OLSEN, K.J.; BARTHOLD, S.W. Lyme neuroborreliosis in 2 horses. **Veterinary Pathology**, n. 48, v. 6, p. 1151-1157, 2011.

ISHIKAWA, M. M. **Epidemiologia da borreliose de Lyme em bovinos na região sudeste do Brasil e padronização do diagnóstico sorológico**.1996. 51p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

JOPPERT A.M.; HAGIWARA M.K.; YOSHINARI N.H. Antibodies in dogs from Cotia county, São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v.43, n.5, p.251-255, 2001.

KAUFMAN, W.R. Ticks: Physiological aspects with implications for pathogen transmission. **Ticks and Tick-borne Diseases**. n. 1, p. 11-22, 2009.

KEESING, F.; BELDEN, L.K.; DASZK, P.; DOBSON, A.; HARVELL, C.D.; HOLT, R.D.; HUDSON, P.; JOLLES, A.; JONES, K.E.; MITCHELL, C.E. MYERS, S.S.; BOGICH, T.; OSTFELD, R.S., Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. **Nature**, v. 468, p. 647-652, 2010.

KILL-SILVEIRA, A. **Caracterização de ecossistemas com potenciais de risco para a infestação por carrapatos e transmissão de riquetsias para humanos no estado do Rio de Janeiro**. 2010. 50p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

KISS,T.; CADAR,D.; KRUPACI, A. F.; BORDEANU, A.; BRUDASXCA~, G.F.; MIHALCA, A.D.; MIRCEAN, V.; GLIGA,L.; DUMITRACHE, M.O.; SPÎNU, M. Serological Reactivity to Borrelia burgdorferi Sensu Lato in Dogs and Horses from Distinct Areas in Romania. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 9, 2011.

LABRUNA, M.B.; LEITE, R.C.; GOBESSO, A.A.O.; GENNARI, S.M.; KASAI, N. Controle estratégico do carrapato *Amblyomma cajennense* em equinos. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p.195-200, 2004.

LEVI, T.; KILPATRICK, A.M.; MANGEL, M.; WILMERS, C.C. Deer, predators, and the emergence of Lyme disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, p. 10942-10947, 2012.

LIENBLING, M. R.; NISHIO, M. J.; RODRIGUEZ, A.; SIGAL, L. H.; JIN, T.; LOUIE, J. S. The polymerase chain reaction for the detection of *Borrelia burgdorferi* in human body fluids. **The Arthritis Rheumatology**, v. 36, n. 5, p. 665-675, 1993.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biology Chemistry**, v. 19, p. 265-275, 1951.

MADIGAM, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER J. **Microbiologia de Brock**. 10. ed. São Paulo: Prentice Hall, 1160 p., 2008.

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. 40p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

MADUREIRA, R.C; CORRÊA, F.N.; CUNHA, N.C.; GUEDES JÚNIOR, D.S.; FONSECA, A.H. Ocorrência de anticorpos homólogos anti-Borrelia burgdorferi em equinos de propriedades dos municípios de Três Rios e Vassouras, estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 14, n. 1, p. 43-46, 2007.

MADUREIRA, R. C. **Sorologia para Borrelia burgdorferi em equinos do Estado do Pará e caracterização genotípica de isolados de Borrelia spp.** 2007. 37p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal), Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

MADUREIRA, R.C.; RANGEL, C.P.; BARBOSA NETO, J.D.; FONSECA, A.D. Sorologia para *Borrelia burgdorferi* em equinos da ilha de Marajó e município de Castanhal, Pará, Brasil. **Revista de Ciências da Vida**, v. 29, n. 2, p. 09-15, 2009.

MAGNARELLI, L.A.; BUSHMICH, S.L.; SHERMAN, B.A.; FIKRIG, E. A comparison of serologic tests for the detection of serum antibodies to whole-cell and recombinant *Borrelia burgdorferi* antigens in cattle. **The Canadian Veterinary Journal**. v.45, p.667-674, 2004.

MAGNARELLI, L.A. The Role of Vertebrate Hosts in Tick-Borne Infections. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 33, n. 3, 2011.

MAGNARELLI, L. A.; BUSMICH, S. L.; SHERMAN, B. A.; FIKRIG, E. A comparison of serologic test for the detection of serum antibodies to whole-cell and recombinant *Borrelia burgdorferi* antigens in cattle. **Canadian Veterinary Journal**, v. 45, p. 667-674, 2004.

MAGNARELLI, L. A.; FLAVELL, R. A.; PADULA, S. J.; ANDERSON, J. F.; FIKRIG, E. Serologic diagnosis of canine and equine borreliosis: use of recombinant antigens in enzymelinked immunosorbent assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 169-173, 1997.

- MAGNARELLI, L. A.; FLAVELL, R. A.; PADULA, S. J.; ANDERSON, J. F.; FIKRIG, E. Use of recombinant antigens of *Borrelia burgdorferi* in serologic tests for diagnosis of Lyme borreliosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 237-240, 1996.
- MAGNARELLI, L. A.; FIKRIG, E. Detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in naturally infected horses in the USA by enzyme-linked immunosorbent assay using wholecell and recombinant antigens. **Research in Veterinary Science**, v. 79, p. 99-103, 2005.
- MAGNARELLI, L. A.; IJDO, J. W.; PADULA, S. J.; FLAVELL, R. A.; FIKRIG, E. Serologic diagnosis of Lyme borreliosis by using enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant antigens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 1735-1739, 2000a.
- MAGNARELLI, L.A.; IJDO, J.W.; VAN ANDEL, A.E.; WU, C.; PADULA, S.J.; FIKRIG, E. Serologic confirmation of *Ehrlichia equi* and *Borrelia burgdorferi* infections in horses from the northeastern United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.217, p.1045–1050, 2000b.
- MANION, T.B.; BUSHMICH, S.L.; MITTEL, L.; LAURENDEAU, M.; WERNER, H.; REILLY, M. Lyme disease in horses: serological and antigen testing differences. **Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, v.44, p.144-145, 1998.
- MANION, T.B.; BUSHMICH, S.L.; KHAN, M.I.; DINGER, J.; WERNER, H.; MITTEL, L.; LAURENDEAU, M.; REILLY, M. Suspected clinical lyme disease in horses: serological and antigen testing differences between clinically ill and clinically normal horses from an endemic region. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 21, n. 5, p. 231-236, 2001.
- MANTOVANI, Elenice. **Identificação do agente etiológico da Síndrome de Lyme-símile brasileira (Síndrome de Baggio-Yoshinari)**. 2010. 117p. Tese (Doutorado em Ciências), Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2010.
- MANTOVANI E, COSTA IP, GAUDITANO G, BONOLDI VL, HIGUCHI ML, YOSHINARI NH. Description of Lyme disease-like syndrome in Brazil. Is it a new tick borne disease or Lyme disease variation?. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 443-456, 2007.
- MARCELIS, L.; DE MARNEFFE, P.; CHAIDRON, E.; BIGAIGNON, G.; KAGERUKA, P.; GOUBAU, P. Horse reservoir for *Borrelia burgdorferi*?. **The Lancet**, v. 25, 1987.
- MASSARD, C. L., FONSECA, A.H. Carrapatos e doenças transmitidas comuns aos homens e aos animais. **A Hora Veterinária**. v. 135, n. 1, p. 15-23, 2004.
- MASTERS, E.; GRANTER ,S.; DURAY, P.; CORDES, P. Physician-diagnosed erythema migrans and erythema migrans-like rashes following Lone Star tick bites. **Archives of Dermatology**, v.134, p.955-60, 1998.
- MAURIZI, L.; MARIE, J.L.; AOUN, O.; COURTIN, C.; GORSANE, S.; CHAL, D.; DAVOUST, B. Seroprevalence Survey of Equine Lyme Borreliosis in France and in Sub-Saharan Africa. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.10, n.5, 2010.
- METCALF, K.B.; LILLEY, C.S.; REVENAUGH, M.S.; GLASER,A.L.; METCALF, E.S. The Prevalence of Antibodies against *Borrelia burgdorferi* Found in Horses Residing in the

Northwestern United States. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, n.10, p.587-589, 2008.

NAVA, S.; BARBIERI, A. M.; MAYA, L.; COLINA, R.; MANGOLD, A. J.; LABRUNA, M. B.; VENZAL, J. M. *Borrelia* infection in *Ixodes parvicinus* (Acari: Ixodidae) from northwestern Argentina. **Acta Tropica**, v. 139, p. 1-4, 2014.

NIŚCIGORSKA, J.; SKOTARCZAK, B.; WODECKA, B. *Borrelia burgdorferi* infection among forestry workers – assessed with an immunoenzymatic method (ELISA), PCR, and correlated with the clinical state of the patients. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 10, p. 15-19, 2003.

OLIVEIRA, J. E. G. **Planejamento otimizado da alimentação para um sistema de produção de equinos em pastejo**. 2007. 93p. Dissertação (Mestrado em Agronegócios), Universidade de Brasília, Brasília, DF.

PATZ, J.A; GRACZYK, T.K.; GELLER, N.; VITTOR , A.Y. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1-11, 2000.

PEREIRA, M. G. **Epidemiologia: teoria e prática**. 15. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan , 596 p., 2012.

PEREZ, C. A.; ALMEIDA, A.F.; ALMEIDA, A.; CARVALHO, V.B.; BALESTRIN, D.C.; GUIMARÃES, M.S.; COSTA, J.C.; RAMOS, L.A.; ARRUDA-SANTOS, A.D.; MÁXIMO-ESPÍNDOLA, C.P.; BARROS-BATTESTI, D.M. Carrapatos do gênero *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) e suas relações com os hospedeiros em área endêmica para Febre Maculosa no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 4, p.210-217, 2008.

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

PFISTER, H. W.; WILSKE, B.; WEBER, K. Lyme borreliosis: basic science and clinical aspects. **The Lancet**, v.343, p. 1013-1016, 1994.

PITRAT. T, WIGGANS, K. **Guide for Deployed Preventive Medicine Personnel on Health Risk Management**: Technical guide 248. Washington: U.S. Army Center for Health Promotion and Preventive Medicine. 2001. 76 p.

PRADO, R. F. S. **Doenças transmitidas por carrapatos: aspectos acarológicos, epidemiológicos e de biossegurança em atividades militares**. 2013. 48p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Ciências Militares), Escola de Aperfeiçoamento de Oficiais, Rio de Janeiro, RJ.

PRIEST, H.L.; IRBY, N.L.; SCHLAFER, D.H.; DIVERS, T.J.; WAGNER, B.; GLASER,A.L.; CHANG, Y.F.; SMITH, M.C. Diagnosis of *Borrelia*-associated uveitis in two horses. **Veterinary Ophthalmology**, v. 15, n. 6, p.398–405, 2012.

QUINN P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. Espiroquetas. In: **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. 1. ed. Oxford: Art Médica, 2002. p. 179-188.

RAMAMOORTHI, N.; NARASIMHAN, S.; PAL, U.; BAO, F.; YANG, X.F.; FISH, D.; ANGUITA, J.; NORGDARD, M.V.; KANTOR, F.S.; ANDERSON, J.F.; KOSKI, R.A.; FIKRIG, E. The Lyme disease exploits a tick protein to infect the mammalian host. **Nature**, v. 436, p. 573-577, 2005.

R Development Core Team (2010), **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

REZENDE, J.; KESSLER, R.H.; SOARES, C.O.; MARTINS, O.P. Ocorrência de *Borrelia* spp. em cultura de células embrionárias do carrapato *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, n.1, p. 50-52, 2008.

ROGERS, A. B.; SMITH, R. D.; KAKOMA I. Serologic cross-reactivity of antibodies against *Borrelia theileri*, *Borrelia burgdorferi* and *Borrelia coriacea* in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.60, n.6, p.694-697. 1999.

SALLES, R. S. **Borreliose de Lyme em equinos no estado do Rio de Janeiro**. 2001. 104p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

SALLES, R. S.; FONSECA, A. H.; SCOFIELD, A.; MADUREIRA, R. C., YOSHINARI, N.H. Sorologia para *Borrelia burgdorferi* *latu sensu* em equinos no estado do Rio de Janeiro. **A Hora Veterinária**, v. 127, p. 46-49, 2002.

SANTOS, M.; RIBEIRO-RODRIGUES, R.; LOBO, R.; TALHARI, S. Antibody reactivity to *Borrelia burgdorferi sensu stricto* antigens in patients from the Brazilian Amazon region with skin diseases not related to Lyme disease. **International Journal of Dermatology**, v. 49, p. 552-556, 2010.

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

SCHWAN, T.G.; PIESMAN, J.; GOLDE, W.T.; DOLAN, M.C.; ROSA, P.A. Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, p. 2909-2913, 1995.

SEARS, K.P., DIVERS, T.J.; NEFF, R.T., MILLER Jr., W.H.; McDONOUGH, S.P. A case of *Borrelia*-associated cutaneous pseudolymphoma in a horse. **Veterinary Dermatology**, v.23, n. 2, p. 153-156, 2012.

SHANKS, G.D.; KARWACKI, J.J.; KANESA-THASAN, N.; SUN, N. Diseases transmitted primarily by arthropod vectors. In: KELLEY, P.W. **Military preventive medicine: Mobilization and deployment. Text book of military medicine**. 1. ed. Washington: Department of the Army, Office of the Surgeon General. p. 803-935. 2004.

SILVA, C.B. **Diagnóstico sorológico e Aspectos Epidemiológicos da Leishmaniose Canina na Microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro**, 2012. 74p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

SOARES, O.A.B. **Medicina Veterinária Militar – biossegurança e defesa**. São Paulo: Editora Perse, 1ª edição, 224 p., 2013.

SOARES, C. O.; FONSECA, A. H.; ISHIKAWA, M. M.; MANERA, G. B.; SCOFIELD, A.; YOSHINARI, N. H. Sorologia para borreliose em cães procedentes da Baixada Fluminense, estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 21, n. 3, p. 111-114, 1999.

SOARES, C.O.; ISHIKAWA, M.M.; FONSECA, A.H.; YOSHINARI, N.H. Borrelioses, agentes e vetores. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 1-19, 2000.

SONENSHINE, D. E. **Biology of Ticks**. New York: Oxford University Press, 446 p, 1991.

SPOLIDORO, M. G., **Perfil sorológico e molecular de zoonoses transmitidas por carrapatos em humanos e animais de seis municípios do Estado do Espírito Santo**. 2009. 86p. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

SPOLIDORIO, M.G.; LABRUNA, M.B.; MACHADO, R.Z.; MORAES-FILHO, J.; ZAGO, A.M.; DONATELE, D.M.; PINHEIRO, S.R.; SILVEIRA, I.; CALIARI, K.M.; YOSHINARI, N.H. Survey for Tick-Borne Zoonoses in the State of Espírito Santo, Southeastern Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 1, p. 201-206, 2010.

STEERE, A.C. Lyme disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 2, p. 115-125, 2001.

ȚĂȚULESCU, D.; RĂDULESCU, A.; SLAVCOVICI, A.; FLONTA, M.; Diagnosis and treatment in patients with chronic Tick Associated Poly-Organic Syndrome (TAPOS) - a case series. **Science Parasitology**, v.11, n.1, p. 38-43, 2010.

TEGLAS, M.; MATERN, E.; LEIN, S.; FOLEY, P.; MAHAN, S.M.; FOLEY, J. Ticks and tick-borne disease in Guatemalan cattle and horses. **Veterinary Parasitology**, v.131, p.119-127, 2005.

TEIXEIRA, Rafaella Câmara. **Cultivo de Borrelia burgdorferi (Spirochaetales: Spirochaetaceae) em células embrionárias de Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae)**. 2010. 28p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

THRUSFIELD, M. V. **Veterinary epidemiology**. 2ª edição. Oxford: Blackwell, 479 p. 1995.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5ª edição, São Paulo: Ateneu, 760 p., 2008.

TOKARZ, R.; ANDERTON, J.M.; KATONA, L.I.; BENACH, J.L. Combined effects of blood and temperature shift on *Borrelia burgdorferi* gene expression as determined by whole genome DNA array. **Infection and Immunity**, v.72, p. 5419-5432, 2004.

WAGNER, B.; ERB, H.N. Dogs and horses with antibodies to outer-surface protein C as on-time sentinels for ticks infected with *Borrelia burgdorferi* in New York State in 201. **Preventive Veterinary Medicine**, v.107, p.275– 279, 2012.

WELLS, S. J.; TRENT, A. M.; ROBINSON, R. A.; KNUTSON, K. S.; BE, R. F. Association between clinical lameness and *Borrelia burgdorferi* antibody in dairy cows. **The American Journal Veterinary Research**, v. 54, n. 3, p. 398-405, 1993.

YBAÑEZ, A.P.; SATO, F.; NAMBO, Y.; FUKUI, T.; MASUZAWA, T.; OHASHI, N.; MATSUMOTO, K.; KISHIMOTO, T.; INOKUMA, H. Survey on Tick-Borne Pathogens in Thoroughbred Horses in the Hidaka District, Hokkaido, Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 75, n. 1, p. 11-15, 2013.

YOSHINARI, N. H.; ABRÃO, M. G.; BONOLDI, V. L. N.; SOARES, C. O.; MADRUGA, C. R.; SCOFIELD, A.; MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. Coexistence of antibodies to tick-borne agents of babesiosis and Lyme borreliosis in patients from Cotia county, state of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 311-318, 2003.

YOSHINARI, N.H.; MANTOVANI, E.; BONOLDI, V.L.N.; MARANGONI, R.G.; GAUDITANO, G. Doença de Lyme-símile Brasileira ou Síndrome Baggio-Yoshinari: Zoonose exótica e emergente transmitida por carrapatos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 3, p. 363-369, 2010.

8 CONCLUSÕES GERAIS

A alta prevalência de animais positivos ao ELISA para *Theileria equi* indica que as áreas militares da Academia Militar das Agulhas Negras, no município de Resende, estado do Rio de Janeiro e da Coudelaria do Rincão, município de São Borja, estado do Rio Grande do Sul, são endêmicas para esta hemoparasitose, estando os rebanhos equinos em estabilidade enzoótica.

Os resultados obtidos, via PCR, indicam um elevado número de equinos portadores de *T. equi* nos rebanhos da AMAN e da Coudelaria do Rincão, e a alta prevalência de soropositividade e de equinos portadores para *T. equi* na AMAN está relacionada com a origem dos animais na Coudelaria do Rincão.

O pastejo misto, propiciando proximidade entre equinos e bovinos, na Coudelaria do Rincão, possibilita que carrapatos *R. microplus* realizem parasitismo nos equinos. A presença de infestação de carrapatos *R. microplus* foi significativamente associada à sororeatividade dos equinos para *T. equi* e *Borrelia* sp.

Os resultados da PCR associados ao histórico da doença nos plantéis equinos indicam que a *Babesia caballi* apresenta baixa infecção ativa nos rebanhos, apesar de permanecerem com resposta sorológica indicativa de elevada exposição.

A presença de anticorpos homólogos anti-*Borrelia* sp. em equinos de uso militar no município de Resende, estado do Rio de Janeiro, e São Borja, estado do Rio Grande do Sul, reforça o papel destes animais como sentinelas epidemiológicos, indicando a circulação deste organismo nas regiões estudadas.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o intuito de reduzir a incidência de animais positivos para as Piroplasmoses, indica-se intervenção no manejo dos equinos de uso militar da Coudelaria do Rincão, localizada no Rio Grande do Sul, devendo ser evitado o pastejo misto e a proximidade dos equinos com o rebanho bovino.

Deverá ainda ser implementado um controle de ectoparasitas sobre os bovinos existentes na Coudelaria, procurando diminuir a infestação dos carrapatos com consequente redução na contaminação das pastagens. Além disso, deverá ser estabelecido no Calendário de Medidas Profiláticas dos equinos, daquele local, um controle eficiente de ectoparasitas considerando as particularidades da região.

Deve-se visar sempre a saúde e o bem-estar dos equinos, minimizando os riscos para ocorrência de alterações na sua fisiologia, buscando-se evitar que os animais produzidos na Coudelaria do Rincão sejam portadores da *Theileria equi*.

Em um sistema de produção de equinos, deverá haver um equilíbrio de investimentos na genética, alimentação e sanidade. Assim, o aperfeiçoamento das atividades sanitárias deverá ser realizado de maneira rotineira, implementando-se o monitoramento laboratorial, sorológico e molecular para diferentes agentes etiológicos nos equinos criados, produzidos e distribuídos para todos os quartéis do Exército que possuam efetivo hipomóvel.

O estudo dos fatores de risco para as Piroplasmoses nos equinos de uso militar no Exército Brasileiro, por modelo estatístico, é original, podendo ser de grande importância para o avanço da abordagem dos agentes parasitários nas unidades militares que possuem efetivo equino, contribuindo desta forma para o desempenho atlético desses animais.

Faz-se necessária a realização de novos estudos sobre o tema no âmbito do Exército Brasileiro, sobretudo visando a identificação filogenética e os vetores envolvidos com estes hemoparasitos, e a identificação de novas drogas que viabilizem a quimioesterilização de equinos portadores, buscando-se assim minimizar o risco de que animais produzidos e mantidos no Exército sejam portadores dos hemoparasitas e sofram com os prejuízos silenciosos para a sua saúde.

Por fim, considerando-se também o potencial risco de transmissão de agentes zoonóticos, onde os equinos de uso militar podem ser carreadores de carrapatos vetores ou albergarem diferentes patógenos, o trânsito de animais entre regiões deverá ser monitorado, especialmente para aquelas onde existam vetores competentes para transmitir agentes patogênicos para o homem. Por característica, as atividades dos militares em estreito contato com o meio ambiente possibilitam um maior risco de exposição a carrapatos vetores, recomendando-se a implementação de uma mentalidade de biossegurança como cultura operacional, com vigilância ambiental constante, inteligência em saúde, investimentos em educação continuada, pesquisa e aplicação de medidas de proteção individual e coletiva no efetivo militar humano.

ANEXOS

A – Ficha Individual de Informação de Equino

Anexo A

FICHA INDIVIDUAL DE INFORMAÇÃO DE EQUINO

Data: ____/____/____ Nome do equino: _____

Data de nascimento: ____/____/____.

Data de chegada à propriedade: ____/____/____.

Sexo:

M F

Raça:

Mestiço Brasileiro de Hipismo Puro Sangue Inglês Árabe Pônei Bretão

Coloração da pelagem:

Castanho Alazão Tordilho Rosilho Pampa Lobuno

Origem do equino:

Coudelaria do Rincão Comissão de Compra de Animais Outra Organização Militar
 Desconhecido

Local de permanência atual:

AMAN Coudelaria do Rincão

Manejo:

Estabulado Semi-estabulado Extensivo

Contato com bovinos em áreas de pastejo misto:

Sim Não

Presença de carrapatos infestando equino no momento da coleta:

Amblyomma spp.: _____

Dermacentor nitens: _____

Rhipicephalus microplus: _____

Outras observações relevantes:
