

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

**DISSERTAÇÃO**

**Diagnóstico sorológico e aspectos epidemiológicos de *Borrelia*  
*spp.* e *Theileria equi* em equinos de uso militar no município de  
Resende, Rio de Janeiro**

**Rubens Fabiano Soares Prado**

2014



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

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS  
DE *Borrelia* spp. E *Theileria equi* EM EQUINOS DE USO MILITAR NO  
MUNICÍPIO DE RESENDE, RIO DE JANEIRO**

**RUBENS FABIANO SOARES PRADO**

*Sob a orientação do professor*  
**Carlos Luiz Massard**

*e Co-orientação do professor*  
**Huarrisson Azevedo Santos**

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

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2014

636.1089

P896d

T

Prado, Rubens Fabiano Soares, 1980-  
Diagnóstico sorológico e aspectos  
epidemiológicos de *Borrelia* spp. E  
*Theileria* equi em eqüinos de uso militar no  
Município de Resende, Rio de Janeiro/  
Rubens Fabiano Soares Prado. - 2014.  
101 f.: il.

Orientador: Carlos Luiz Massard.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de  
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.  
Bibliografia: f. 79-85.

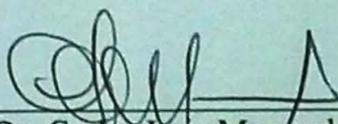
1. Eqüino - Doenças - Teses. 2. *Borrelia*  
- Resende (RJ) - Teses. 3. *Theileria* -  
Resende (RJ) - Teses. 4. Soro - Diagnóstico -  
Teses. 5. *Theileriose* - Diagnóstico -  
Teses. I. Massard, Carlos Luiz, 1947- II.  
Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro. Curso de Pós-Graduação em  
Ciências Veterinárias. III. Título.

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

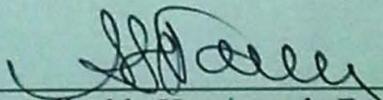
**RUBENS FABIANO SOARES PRADO**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências** no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Sanidade Animal.

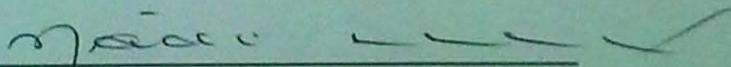
DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 26 A2 2014.



Dr. Carlos Luiz Massard (UFRRJ)  
(Orientador)



Dr. Aivaldo Henrique da Fonseca (UFRRJ)



Dr.<sup>a</sup> Nádya Regina Pereira Almosny (UFF)

## DEDICATÓRIA

*“Aos meus pais e irmãos, por todo apoio, exemplo e estímulo ao longo da caminhada da vida. À minha querida esposa, por todo amor, apoio, compreensão e sacrifício realizado em prol da concretização deste sonho. Às minhas adoradas filhas, por iluminarem e me guiarem sempre adiante.”*

*“Para ser grande, sê inteiro: nada  
Teu exagera ou exclui.  
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és  
No mínimo que fazes.  
Assim em cada lago a lua toda  
Brilha, porque alta vive.”*

*Fernando Pessoa (Ricardo Reis)*

## AGRADECIMENTOS

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 deste aprimoramento, que foi muito além das minhas expectativas.

Ao Professor Carlos Luiz Massard por todo apoio, orientação, ensinamentos, compreensão e compartilhamento de experiências, ao longo destes dois anos, possibilitando um enorme enriquecimento intelectual e cultural durante o transcorrer do curso, passando mais que lições didáticas, mas sim lições de vida.

Ao Professor Huarrisson Azevedo dos Santos pela co-orientação, auxílio e disponibilidade, estando sempre pronto a ajudar em todos os momentos em que o requisiar.

Ao Professor Adivaldo Henrique da Fonseca por todos os ensinamentos, conselhos, e por disponibilizar toda a estrutura do Laboratório de Doenças Parasitárias, viabilizando a execução dos testes de iELISA.

A Professora Cristiane Divan Baldani, bem como às suas orientadas Andresa e Aline, pelo empenho, dedicação, ensinamentos e pela grande contribuição no processamento das amostras, viabilizando os ensaios para diagnóstico sorológico de *Theileria equi*.

À Professora Rosângela Zacarias Machado, do Departamento de Patologia Animal FCAV UNESP Jaboticabal, por ter gentilmente cedido o antígeno de *T. equi*, contribuindo sobremaneira para a realização do iELISA.

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (CPGCV), por todos os conhecimentos, ensinamentos e experiências transmitidas, que muito somou para minha formação.

Ao Diretor do Hospital Veterinário da Academia Militar das Agulhas Negras (AMAN), pela apresentação e recomendação inicial ao Professor Massard, assim como por todo o estímulo rumo ao constante aperfeiçoamento científico. Salve Muniz!

A toda a equipe do Hospital Veterinário da AMAN, que me apoiou e muito me auxiliou nesta jornada. Muito obrigado a todos!

A toda equipe do Laboratório de Hemoparasitoses da estação experimental W.O. Neitz, Marcus Sandes Pires, Maristela Peckle, Cláudia Bezerra da Silva, Gabriele Vivas Vitari, Renata Lins da Costa, enfim, a todos os amigos que sempre estavam dispostos a ajudar e que tanto me auxiliaram na conclusão desta importante etapa.

Ao amigo Matheus Dias Cordeiro, que muito me auxiliou desde a demonstração e treinamento na técnica do iELISA até o processamento final das amostras no Laboratório de Doenças Parasitárias.

Ao secretário administrativo do CPGCV, Arthur S. Júnior que, desde o momento de minha matrícula, sempre esteve prestativo, educado e disposto a ajudar, independente da situação.

A todos meus familiares, que, independente da situação, sempre foram um porto seguro, base sólida, mola propulsora para seguir em frente. Muito obrigado a todos!

## BIOGRAFIA

Rubens Fabiano Soares Prado, filho de Maria Auxiliadora Soares Prado e Rubens Christiano Volpe Prado, nasceu em 8 de março de 1980, na cidade de Alfenas, estado de Minas Gerais. Iniciou o ensino fundamental na Escola Municipal Dirce Moura Leite, localizada em Alfenas, dando continuidade no Colégio Atenas, onde concluiu o Ensino Médio em 1997.

No ano de 1998 ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV), concluindo o curso em março de 2003, recebendo “Votos de Louvor” da Comissão Coordenadora do Curso de Medicina Veterinária, com base no desempenho acadêmico, por ter se destacado entre seus pares no transcorrer do curso.

Durante a graduação realizou estágios na área de Clínica Médica e Cirúrgica no Hospital Veterinário da UFV, assim como no Laboratório Clínico e de Microbiologia no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva.

Ingressou em março de 2003, no Curso de Especialização em Clínica e Cirurgia Veterinárias, pós-graduação *lato sensu*, no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em fevereiro de 2004.

Ainda em 2003 foi aprovado em concurso público para o ingresso, como Oficial Médico Veterinário de Carreira, no Exército Brasileiro. Assim, em março de 2004, ingressou no Curso de Formação de Oficiais (CFO) na atual Escola de Formação Complementar do Exército, em Salvador, estado da Bahia. Em novembro de 2004 concluiu o CFO, sendo promovido ao posto de 1º Tenente. Foi, então, designado para servir no 3º Batalhão de Polícia do Exército (3ºBPE), em Porto Alegre, estado do Rio Grande do Sul.

Entre janeiro de 2005 a janeiro de 2011, serviu no 3ºBPE exercendo as funções de Oficial de Vigilância Sanitária da Organização Militar e Chefe da Seção de Cães de Guerra, entre outras funções.

Em fevereiro de 2011 foi transferido para a Academia Militar das Agulhas Negras (AMAN), sendo designado para a Chefia da Divisão de Clínica e Cirurgia do Hospital Veterinário. Em dezembro de 2011 foi promovido, por antiguidade, ao posto de Capitão.

Em março de 2012 ingressou para o Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, na área de concentração Sanidade Animal, nível Mestrado, da UFRRJ.

De abril de 2013 a novembro de 2013, realizou o Curso de Aperfeiçoamento Militar da Escola de Aperfeiçoamento de Oficiais do Exército Brasileiro, na modalidade ensino à distância, obtendo o título de Especialista em Ciências Militares.

E nesta data, apresenta e defende esta dissertação como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

## RESUMO GERAL

PRADO, Rubens Fabiano Soares. **Diagnóstico sorológico e aspectos epidemiológicos de *Theileria equi* e *Borrelia* spp. em equinos de uso militar, no município de Resende, Rio de Janeiro**, 2014. 88 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

As doenças transmitidas por carrapatos além terem uma ampla distribuição mundial, relacionada à dispersão destes vetores, e uma rede epidemiológica complexa, tornando-as de difícil controle e prevenção, causam grandes impactos na saúde humana e animal. O Brasil, com o terceiro maior rebanho de equídeos do mundo, tem como um dos principais agentes transmitidos por carrapatos aos equídeos *Theileria equi*. Tal agente é considerado endêmico e vem causando entraves à equideocultura nacional. Além disso, alguns aspectos de sua epidemiologia, como o artrópodo vetor da doença no país, ainda não foram elucidados. No que tange às doenças zoonóticas em que os equídeos estão envolvidos, a Síndrome de Baggio-Yoshinari, uma borreliose emergente, tem chamado a atenção, pois têm sido evidenciados equinos soropositivos para *Borrelia* spp. em nosso país, sugerindo o envolvimento destes animais na epidemiologia desta doença. O objetivo deste estudo foi realizar o diagnóstico sorológico e avaliar os fatores de risco associados à soropositividade para *Theileria equi* e para *Borrelia* spp. no rebanho de equinos de uso militar do município de Resende, estado do Rio de Janeiro. Amostras de 174 equinos de uso militar foram testadas através do ensaio de adsorção imunoenzimática indireta iELISA para *Theileria equi* e *Borrelia burgdorferi* cepa G39/40. A variável dependente (sororreatividade) foi testada, através de análise bivariada, quanto à associação às variáveis independentes (gênero, idade, definição racial, grupo de manejo, tempo de criação na AMAN, sistema de criação, origem do equino, presença de infestação por *Dermacentor nitens*, presença de infestação por *Amblyomma cajennense*, grau de infestação por carrapatos, e presença de infestação por carrapatos). As variáveis que apresentaram associação na análise bivariada ( $p < 0,25$ ), foram incluídas no modelo de regressão logística. Verificou-se que a soroprevalência para *Borrelia* spp. foi de 29,89%, e a para *T. equi* de 74,14%. A análise multivariada demonstrou que a presença de infestação de carrapatos está associada ( $p < 0,05$ ) à soropositividade dos equinos para *Borrelia* spp. (OR 3,45; IC 1,2 - 9,7), e que o tempo de criação na AMAN superior à 15 anos está associado à soropositividade para *T. equi* (OR 5,70; IC 1,23 - 22,1). A partir dos resultados obtidos pode-se inferir que os carrapatos estão relacionados na transmissão da *Borrelia* spp. no rebanho estudado, sendo seus prováveis vetores. Além disto, a evidência de circulação de borrelíias nos equinos reforça seu papel como sentinelas, alertando para a ocorrência de casos humanos. Com relação à *Theileria equi*, verificou-se que a área é endêmica para a doença, com alta prevalência de animais portadores assintomáticos, evocando cuidados e medidas preventivas na introdução de equinos, oriundos de áreas de instabilidade enzoótica ou indenes, no rebanho.

**Palavras-chave:** Theileriose, Borreliose, equinos de uso militar.

## GENERAL ABSTRACT

PRADO, Rubens Fabiano Soares. **Serological diagnosis and epidemiological aspects of *Theileria equi* and *Borrelia* spp. in horses for military use in the municipality of Resende, Rio de Janeiro**, 2014. 88 p. Dissertation (Master Science in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

The tick-borne diseases in addition to have a worldwide distribution, related to the dispersion of these vectors, and a complex epidemiologic network, making them difficult to control and prevention, cause major impacts on human and animal health. Brazil, the second largest herd of horses in the world, has the *Theileria equi* as a major hemoparasites transmitted by ticks to such animals, causing serious barriers to equideocultura in the country, which is considered endemic. Moreover, some aspects of its epidemiology, as the real vector of the disease in the country, are still not well understood. Regarding zoonotic diseases that the animals are involved, an emerging borreliosis, the Baggio - Yoshinari Syndrome, has drawn attention because horses seropositive for *Borrelia* spp. has been evidenced in our country, suggesting possible involvement of these animals in its epidemiology. Thus, this study aimed to perform serological diagnosis and assess the risk factors associated with seropositivity for *Theileria equi* and *Borrelia* spp. in the herd of horses for military use in the municipality of Resende, state of Rio de Janeiro. Samples of 174 horses for military use were tested by indirect ELISA immunoassay for *Theileria equi* and *Borrelia burgdorferi* strain G39/40. The dependent variable (seroreactivity) was tested through bivariate analysis for the association as the independent variables (gender, age, racial definition, group management, creation time in AMAN, system creation, origin of the horse, the presence of infestation by *Dermacentor nitens*, by *Amblyomma cajennense*, level of tick infestation and presence of tick infestation). The variables that were associated in bivariate analysis ( $p < 0.25$ ) were included in the logistic regression model for multivariate analysis. It was found that the prevalence *Borrelia* spp. was 29.89%, and the *T. equi* prevalence was 74.14 %. Multivariate analysis demonstrated that the presence of tick infestation is associated ( $p < 0.05$ ) with seropositivity for *Borrelia* spp. in horses (OR 3,45; CI 1,2 – 9,7), and the creation time in AMAN greater than 15 years associated with seropositivity for *T. equi* (OR 5,70; CI 1,23 - 22,1). From the results obtained it can be inferred that ticks are related in the transmission of *Borrelia* spp in the herd studied, with their probable vectors. Further evidence of circulating *Borrelia* spp. in horses reinforces their role as sentinels, warning of the occurrence of human cases. Regarding *Theileria equi*, it was found that the area is endemic for the disease with a high prevalence of asymptomatic carriers, evoking care and preventive measures in the introduction of horses, coming from areas unaffected or enzootic instability, in the herd.

**Key-words:** Theileriosis, borreliosis, horses for military use.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

- Quadro 1.** Grupos das doenças ocasionadas pelas borrelioses, espécies, vetores, hospedeiros e distribuição..... 8
- Tabela 1.** Resultados de sororreatividade ao iELISA para *Borrelia burgdorferi*, respectivas prevalências nos grupos de equinos, e resultado do teste de comparação de proporções..... 33
- Tabela 2.** Porcentagem de equinos infestados e média de contagem de carrapatos por equino (*A. cajennense*, *D. nitens* e total da contagem de carrapatos) observadas nos diferentes grupos de manejo..... 33
- Tabela 3.** Resultado da comparação entre as médias de contagens de carrapatos por equino (*A. cajennense*, *D. nitens* e total de carrapatos) entre os Grupos através do teste de Kruskal-Wallis..... 34
- Tabela 4.** Análise bivariada e multivariada da frequência de equinos soropositivos através do iELISA para anticorpos homólogos da classe IgG anti- *B. burgdorferi*, 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 do município de Resende – RJ..... 35

### CAPÍTULO II

- Tabela 1.** Resultados de sororreatividade ao iELISA para *Theileria equi*, respectivas prevalências nos grupos de equinos, e resultado do teste de comparação de proporções..... 73
- Tabela 2.** Análise bivariada e multivariada da frequência de equinos soropositivos através do iELISA 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 do município de Resende – RJ..... 74

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

- Figura 1.** Localização geográfica do município de Resende, dentro da microrregião do Vale do Paraíba Fluminense, no estado do Rio de Janeiro..... 24
- Figura 2.** Imagem aérea da Academia Militar das Agulhas Negras, localizada no município de Resende – RJ..... 25
- Figura 3.** Imagens dos grupos de equinos na Seção de Equitação 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..... 27
- Figura 4.** a) Imagem do Rio Alambari e região de mata ciliar que transpassa as áreas de pastagens do C Cav e piquetes da Sec Equi; b) Lagoa na área de pastagem do C Cav, notar presença de fezes de capivaras no canto inferior direito da foto; c) Equinos do Grupo 4 pastando próximo à fragmento de mata; d) Equinos do Grupo 1 em piquete da Sec Equi, em contato com mata ciliar..... 28
- Figura 5.** Imagens das coletas de amostras e de carrapatos. a) amostras de sangue coletadas; b) soro alíquotado, identificado e congelado para envio à UFRRJ; c) equino tendo o corpo inspecionado para a coleta de carrapatos; d) contagem e identificação dos carrapatos no LAC HVet AMAN; e) Infestação de *Dermacentor nitens* no pavilhão auricular de equino; f) Fêmea de *Amblyomma cajenense* ingurgitada coletada de equino..... 33

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>CAPITULO I - Aspectos epidemiológicos e soroprevalência para <i>Borrelia</i> spp. em equinos de uso militar do município de Resende, Estado do Rio de Janeiro</b> .....	2
<b>RESUMO</b> .....	3
<b>ABSTRACT</b> .....	4
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	5
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	7
2.1 Sistemática e Características do Gênero <i>Borrelia</i> .....	7
2.2 Vetores e Transmissão das Borrelioses.....	8
2.3 Doença de Lyme e Síndrome de Baggio-Yoshinari (SBY).....	10
2.4 Epidemiologia e Saúde Única.....	12
2.5 Animais Reservatórios, Sentinelas e Carreadores.....	14
2.6 Borreliose em equinos.....	16
2.6.1 Estudos de soroprevalência de <i>Borrelia</i> spp. em equinos.....	16
2.6.2 Manifestações clínicas das borrelioses em equinos.....	17
2.6.3 Diagnóstico em equinos.....	19
2.6.4 Tratamento.....	21
2.6.5 Prevenção.....	21
2.7 A importância das Borrelioses e outras Doenças Transmitidas por carrapatos para as Forças Armadas.....	22
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
3.1 Descrição da Área de Estudo.....	24
3.2 Inquérito Epidemiológico nos equinos de uso militar.....	25
3.2.1 Delineamento do estudo e amostragem.....	25
3.2.2 Caracterização do rebanho de equinos de uso militar da Academia Militar das Agulhas Negras (AMAN).....	26
3.2.3 Ficha de exame físico e informação.....	28
3.2.4 Coleta de carrapatos e amostras de sangue.....	29
3.3 Teste Sorológico.....	31
3.3.1 Obtenção do antígeno bruto de <i>Borrelia burgdorferi</i> .....	31
3.3.2 Obtenção do controle positivo para <i>Borrelia burgdorferi</i> .....	31
3.3.3 Obtenção do controle negativo para <i>Borrelia burgdorferi</i> .....	31
3.3.4 Ensaio de imunoadsorção enzimática indireta (iELISA).....	31
3.4 Análise Estatística.....	32
<b>4 RESULTADOS</b> .....	33
4.1 Inquérito Sorológico para <i>Borrelia</i> spp.....	33
4.2 Infestação por Carrapatos.....	33
4.3 Fatores Associados aos Equinos Sororreagentes para <i>Borrelia burgdorferi</i> .....	34
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	36

<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>40</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>41</b>
<b>CAPITULO II - Aspectos epidemiológicos e soroprevalência para <i>Theileria equi</i> em equinos de uso militar do município de Resende, estado do Rio de Janeiro.....</b>	<b>52</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>53</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>54</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>57</b>
2.1 A Piroplasmose Equina.....	57
2.2 Sistemática.....	58
2.3 Histórico: da descrição do <i>Piroplasma equi</i> à reclassificação como <i>Theileria equi</i> .....	58
2.4 Ciclo Biológico da <i>Theileria equi</i> .....	59
2.5 Vetores e Transmissão.....	60
2.6 Epidemiologia.....	60
2.6.1 Estudos de prevalência de <i>T. equi</i> no exterior.....	62
2.6.2 Estudos de prevalência de <i>T. equi</i> no Brasil.....	63
2.7 Manifestações Clínicas, Laboratoriais e Anatomopatológicas.....	64
2.8 Diagnóstico.....	66
2.8.1 Parasitológico.....	66
2.8.2 Sorológico.....	66
2.8.3 Molecular.....	67
2.9 Tratamento.....	68
2.10 Prevenção e Métodos de Controle.....	68
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>70</b>
3.1 Descrição da Área de Estudo.....	70
3.2 Inquérito Epidemiológico nos equinos de uso militar.....	70
3.2.1 Delineamento do estudo e amostragem.....	70
3.2.2 Caracterização do rebanho de equinos de uso militar da Academia Militar das Agulhas Negras (AMAN).....	70
3.2.3 Ficha de exame físico e informação.....	70
3.2.4 Coleta de carrapatos e amostras de sangue.....	71
3.3 Teste Sorológico.....	71
3.3.1 Obtenção do antígeno bruto de <i>Theileria equi</i> .....	71
3.3.2 Obtenção do controle positivo para <i>Theileria equi</i> .....	71
3.3.3 Obtenção dos controles negativos. para <i>Theileria equi</i> .....	71
3.3.4 Ensaio de imunoadsorção enzimática indireta (iELISA).....	71
3.4 Análise Estatística.....	72
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>73</b>
4.1 Inquérito Sorológico para <i>Theileria equi</i> .....	73
4.2 Fatores Associados aos Equinos sororreagentes para <i>Theileria equi</i> .....	73
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>78</b>

<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>79</b>
<b>8 CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>86</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>87</b>
<b>Anexo I – Ficha individual de exame físico e informação de equino.....</b>	<b>88</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

Os carrapatos são artrópodos parasitas pertencentes à classe Arachnida de ampla distribuição mundial, sendo encontrados em regiões tropicais, subtropicais e temperadas. Exercem hematofagia e parasitam uma série de animais vertebrados terrestres como anfíbios, répteis, aves e mamíferos, inclusive o homem.

Destacam-se entre os artrópodes que mais transmitem doenças ao homem, ficando atrás somente dos mosquitos Culicídeos (MASSARD; FONSECA, 2004). 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 (SONENSHINE, 1991).

As doenças transmitidas por carrapatos são influenciadas por uma série de fatores como presença de hospedeiros susceptíveis, de hospedeiros amplificadores, de reservatórios naturais, das condições climáticas, da região fisiográfica, dentre outros, numa teia de relações que tornam sua epidemiologia bastante diversa. Assim, o controle e a prevenção destas doenças tornam-se muito difíceis, pois exigem a interrupção de uma cadeia de transmissão complexa, envolvendo hospedeiros vertebrados e carrapatos, que interagem em um ambiente em constante mudança (DANTAS-TORRES et al., 2012).

O Brasil tem o terceiro maior rebanho de equídeos do mundo. Além do crescente aumento dos negócios, com importação e exportação de equídeos, a proximidade de grandes eventos, a exemplo das Olimpíadas de 2016, abarca consigo a intensificação trânsito internacional de equinos para nosso país. E, dentro do contexto das doenças transmitidas por carrapatos relacionadas aos equinos, dois agentes em especial chamam nossa atenção, a *Borrellia* spp. e a *Theileria equi*.

As *Borrellia* spp. podem causar doenças zoonóticas de grande impacto na saúde humana e animal, destacando-se a Doença de Lyme. O papel dos equinos na epidemiologia da doença ainda é desconhecido, mas eles têm sido considerados animais sentinelas e carreadores de carrapatos infectados. Logo, vale destacar que o trânsito internacional de equinos, principalmente oriundos de áreas endêmicas como Europa e Estados Unidos, pode acarretar a introdução de animais e carrapatos infectados por borrelíias indenes em nosso país.

A Piroplasmose equina causada pela *Theileria equi* causa grande impacto e prejuízos econômicos no mercado equestre nacional e internacional. Tal agente promove desde infecções subclínicas, com queda de desempenho em equinos atletas, até baixa taxa de fertilidade em éguas reprodutoras, abortos, e também doença clínica aguda ou crônica que pode levar à óbitos. Outra preocupação diz respeito ao comércio e trânsito internacional de equídeos, visto que países livres ou com programa de controle da doença exigem sorologia negativa para o ingresso no país.

Isto posto, o estudo epidemiológico sobre *Borrellia* spp. e *Theileria equi* em rebanho de equinos de uso militar, 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.

Assim, um estudo epidemiológico transversal foi realizado em uma coorte de equinos de uso militar da Microrregião do Vale do Paraíba Fluminense, visando verificar a prevalência de animais positivos para *Borrellia* spp. e *Theileria equi*, através de pesquisa sorológica pela técnica de ensaio de adsorção imunoenzimática indireta iELISA, bem como relacionar os possíveis fatores associados à soropositividade dos animais à estes agentes.

## **CAPÍTULO I**

### **Aspectos epidemiológicos e soroprevalência para *Borrelia* spp. em equinos de uso militar do município de Resende, Estado do Rio de Janeiro**

## RESUMO

As borrelíias são bactérias que promovem uma série de doenças zoonóticas, sendo transmitidas por carrapatos. No Brasil, casos de borreliose são descritos como uma enfermidade similar a Doença de Lyme, que ocorre no hemisfério Norte, mas com aspectos clínico-epidemiológicos diferenciados, denominada Síndrome de Baggio-Yoshinari. Animais silvestres e domésticos parecem estar envolvidos na cadeia de transmissão desta doença, que ainda não foi completamente elucidada. Seu agente etiológico também ainda está por ser isolado e caracterizado. Entretanto, estudos sorológicos tem demonstrado que *Borrelia* spp. circula entre equinos em diferentes regiões do país. No hemisfério norte, equinos são considerados sentinelas para a Doença de Lyme, encontrando-se altas prevalências nesses animais em áreas endêmicas da doença. Assim, estudos soropidemiológicos no Brasil podem auxiliar na elucidação do ciclo da borreliose brasileira e alertar sobre o risco da doença em humanos. Particularmente, em relação aos Militares, devido à características da profissão, estão sob constante risco de infestação por carrapatos e infecção pelas doenças transmitidas por estes, incluindo as borrelioses. Desta forma, este estudo teve por objetivo realizar o diagnóstico sorológico de *Borrelia* spp. em equinos de uso militar e avaliar os fatores de risco associados à soropositividade nos animais, localizados no município de Resende, estado do Rio de Janeiro. Amostras de 174 equinos de uso militar foram testadas através do ensaio de adsorção imunoenzimática indireta iELISA para *Borrelia burgdorferi* cepa G39/40. A variável dependente (sororeatividade) foi testada, através de análise bivariada, quanto à associação às variáveis independentes (gênero, idade, definição racial, grupo de manejo, tempo de criação na AMAN, sistema de criação, origem do equino, presença de infestação por *Dermacentor*, presença de infestação por *Amblyomma*, grau de infestação por carrapatos, e presença de infestação por carrapatos). As variáveis que apresentaram associação na análise bivariada ( $p < 0,25$ ) foram incluídas no modelo de regressão logística para análise multivariada. Verificou-se uma soroprevalência de 29,89% para *Borrelia* spp. nos equinos estudados. A análise multivariada demonstrou que a presença de infestação de carrapatos foi a variável mais associada ( $p < 0,05$ ) à soropositividade para *Borrelia* spp. nos equinos (OR: 3,45; IC: 1,2 - 9,7). Os resultados obtidos reforçam a participação de carrapatos na transmissão de *Borrelia* spp. aos equinos. Além disso, a evidência sorológica de borrelíias nos animais demonstra o importante papel epidemiológico que estes possuem em serem utilizados como sentinelas da circulação do agente. 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:** Doença de Lyme, borreliose equina, doenças transmitidas por carrapatos.

## ABSTRACT

*Borrelia* is a bacterium that promoting a number of zoonotic diseases, being transmitted by ticks. In Brazil, cases of borreliosis are described as a disease similar to Lyme disease, which occurs in the northern hemisphere, but with different clinical-epidemiological aspects, named Baggio-Yoshinari Syndrome. Wild and domestic animals seem to be involved in the chain of transmission of this disease, which has not been fully elucidated. The etiologic agent is also yet to be isolated and characterized. However, serological studies have shown that *Borrelia* spp. circulates between horses in different regions of the country. In the northern hemisphere, horses are considered sentinels for Lyme disease, finding high prevalence in these animals in endemic areas of the disease. Thus, seroepidemiological studies in Brazil may help to elucidate the Brazilian borreliosis cycle and warn about the risk of disease in humans. Particularly in relation to the military, due to the characteristics of the profession, they are under constant risk of tick infestation and infection by diseases, including borreliosis. Therefore, this study aimed to perform the serological diagnosis of *Borrelia* spp. in horses for military use and evaluate the risk factors associated with seropositivity in animals, located in the Resende municipality, state of Rio de Janeiro. Samples of 174 horses for military use were tested by enzyme immunoassay indirect ELISA for *Borrelia burgdorferi* strain G39/40. The dependent variable (seroreactivity) was tested through bivariate analysis, in relation to association to the independent variables (gender, age, racial definition, group management, creation time in AMAN, system creation, origin of the horse, the presence of *Dermacentor* infestation, presence of *Amblyomma* infestation, level of tick infestation and presence of tick infestation). The variables that were associated in bivariate analysis ( $p < 0.25$ ) were included in the logistic regression model for multivariate analysis. There was a prevalence of 29.89% for *Borrelia* spp. in horses studied. Multivariate analysis demonstrated that the presence of tick infestation was the variable most associated ( $p < 0.05$ ) with seropositivity for *Borrelia* spp. in horses (OR: 3.45, CI: 1.2 - 9.7). The obtained results support the involvement of ticks in the transmission of *Borrelia* spp. to horses. Furthermore, the serological evidence of *Borrelia* in animals demonstrates the important epidemiological role that these have as sentinels of circulation of the agent. This also highlights the need to adopt measures for individual and collective protection to mitigate the risk of tick-borne diseases in military activities.

**Keywords:** Lyme disease, equine borreliosis, tick-borne diseases.

# 1 INTRODUÇÃO

Bactérias espiroquetas do gênero *Borrelia* causam diversos tipos de doenças em humanos, animais domésticos e silvêstres 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, de caráter multissistêmico, sendo um sério problema de saúde pública em muitos países. A doença é endêmica em regiões temperadas como o nordeste dos Estados Unidos, a região central e oriental da Europa, assim como a 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 1992 e 2006, cerca de 250 mil casos humanos de Doença de Lyme foram registrados (SANTOS et al., 2010). 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) (YOSHINARY et al., 2010).

Em nosso país a epidemiologia desta doença, devido às características clínico-epidemiológicas diversas em relação à Doença de Lyme clássica, necessita ser melhor estudada e compreendida. Há a 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 (YOSHINARI et al, 2010). Além disso, as borrelioses causam prejuízos à saúde animal, sendo causadoras de abortos, osteoartrites, uveítes recorrentes e doenças musculares e neurológicas (BUTLER, 2005).

No Brasil, estudos epidemiológicos tem demonstrado soropositividade para *Borrelia* spp. em humanos (SPOLIDORO et al., 2010), assim como em diversos animais silvêstres e domésticos (ABEL et al, 2000a; SALLES et al., 2002; CORDEIRO et al., 2013), que podem estar funcionando como sentinelas epidemiológicos, 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, 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 América do Norte, há altas taxas de soroprevalência em equinos (MAGNARELLI et al., 2000a). Tal fato pode estar atrelado à ocorrência de carrapatos vetores *Ixodes* spp., que transmitem da Doença de Lyme nestas áreas. Tais carrapatos são bastante inespecíficos e parasitam cavalos e também humanos nestas regiões, havendo relatos de casos da doença relacionados ao histórico de contato com equinos (MARCELIS et al., 1987). Isto evidencia que os equinos, além de sentinelas, podem ser hospedeiros reservatórios competentes.

No Brasil o carrapato que comumente acomete equinos, *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. Isto, aliado ao fato de que se têm encontrado rebanhos de equinos brasileiros com soroprevalências para *B. burgdorferi* semelhantes às de áreas endêmicas para Doença de Lyme em outros países, nos alerta para possibilidade de que tal quadro também esteja ocorrendo em nosso país.

Doenças zoonóticas transmitidas por carrapatos são um sério problema em Saúde Pública, mas, sob a ótica militar, também são consideradas uma grande preocupação relacionada à manutenção da operacionalidade das tropas e, conseqüentemente, de Segurança Nacional. Forças armadas modernas têm centros de pesquisas entomológicas que realizam o monitoramento de vetores, e das doenças transmitidas por estes, dentro de sua Pátria ou em territórios estrangeiros, previamente ao envio de tropas.

As Forças Armadas brasileiras tem 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 tem ganhado destaque, dado o elevado risco de infestação a que militares ficam expostos quando em operações em áreas de campos e matas.

Em certas situações particulares de guerra irregular e terrenos acidentados, muitos exércitos ainda se utilizam equinos e muares para locomoção de parte de suas tropas, ou mesmo para instrução militar.

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 destes 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 carreadores de carrapatos infectados e, até mesmo, como hospedeiros reservatórios, aumentando o risco de infecção nos humanos.

Assim, este estudo teve o objetivo de verificar a circulação de *Borrelia* spp. nos equinos de uso militar, através de ensaio sorológico, assim como avaliar os possíveis fatores associados a soropositividade dos animais presentes neste plantel militar.

## 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).

As espiroquetas são bactérias gram-negativas, móveis, helicoidais, muito espiraladas, finas e flexíveis. Suas células são constituídas por um cilindro protoplasmático, consistindo em regiões delimitadas pela parede celular e membrana. A 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 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).

Através de alguns aspectos morfológicos, como o tamanho das bactérias, é possível diferenciar as espiroquetas do gênero *Borrelia*, dos demais gêneros da família *Spirochaetaceae* (BARBOUR; HAYES, 1986). Também, através de microscopia eletrônica, é possível a diferenciação via visualização dos flagelos. As borrelíias possuem 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, 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). Elas crescem à temperatura de 33°C em meios artificiais e podem 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). *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 relacionadas às espécies de *Borrelia* sp. borrelioses, seus vetores, hospedeiros e sua distribuição são apresentados no Quadro 1.

**Quadro 1.** Grupos das doenças relacionadas a espécies de *Borrelia* sp., 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>Ixodes</i> sp	Animais silvestres, domésticos e homem	América do Norte e Europa
	<i>B. garinii</i>			Eurásia
	<i>B. afzelii</i>			Eurásia
Borreliose de Lyme simile na América do Norte	<i>B. andersoni</i>	<i>Ixodes</i> sp	Animais silvestres, domésticos e homem	América do Norte
	<i>B. bissettii</i>			
	<i>B. lonestari</i>	<i>Amblyomma americanum</i>		
	<i>B. barburii</i>			
Borreliose de Lyme simile na Eurásia	<i>B. valaisiana</i>	<i>Ixodes</i> sp	Animais silvestres, domésticos e homem	Europa
	<i>B. lusitaniae</i>			Europa
	<i>B. turdii</i>			Ásia
	<i>B. tanukii</i>			Ásia
	<i>B. miyamotoi</i>			Ásia
	<i>B. japonica</i>			Ásia
Borreliose de Lyme simile no Brasil / SBY	<i>Borrelia</i> spp.	<i>Amblyomma cajennense</i>	Animais silvestres, domésticos e homem	Brasil

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

## 2.2 Vetores e Transmissão das Borrelioses

As borrelíias possuem 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 da família Ixodidae (carrapatos duros) quanto os da família Argasidae (carrapatos moles). Mas há também algumas borrelioses que são transmitidas por piolhos, a exemplo de *Borrelia recurrentis* que é transmitida por *Pediculus humanus* (MADUREIRA, 2007).

No caso dos carrapatos argasídeos, a transmissão das borrelíias não ocorre somente diretamente através da hematofagia. Devido à sucção rápida de sangue que estes carrapatos realizam no hospedeiro, eles ativam seu sistema de eliminação do excesso de água, através do

órgão coxal, podendo infectar o hospedeiro com borrelíias eliminadas por esta via. 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 borrelíias, tanto via salivar como pelos fluidos do órgão coxal, não necessitando fixar-se por longos períodos para realizar a transmissão através de tais fluidos. 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 e, para lidarem com a entrada do grande volume de líquidos proveniente da alimentação, utilizam-se da injeção de saliva hipotônica no hospedeiro para realizarem 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 borrelíias (KAUFMAN, 2009). Dentro da família Ixodidae, os gêneros *Ixodes*, *Amblyomma*, *Rhipicephalus* se destacam como vetores (SOARES et al., 2000).

Na Europa, Ásia e América do Norte, os principais vetores são os carrapatos ixodídeos do complexo *Ixodes ricinus* (BARANDIKA et al., 2008), sendo a doença causada por *Borrelia burgdorferi* sensu lato, constituída pela *B. burgdorferi* sensu stricto encontrada na Europa, Ásia e América do Norte, e *B. garinii* e *B. afzelli* na Europa e Ásia (YOSHINARI et al., 2010).

Dentre as 61 espécies de carrapatos presentes no território nacional, destacam-se como vetores de zoonoses 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 *Amblyomma cajennense* 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. 2008).

Provavelmente carrapatos do gênero *Amblyomma* spp. possam estar envolvidos na epidemiologia das borrelioses no país, conforme apontam os estudos de Mantovani (2010) que demonstraram a associação de casos da SBY, com infestação por estes carrapatos. 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. 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 (transestadial). 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 podem ocorrer ambos os modos de transmissão (BARBOUR; HAYES, 1986).

No caso dos Ixodídeos, a transmissão 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 por via salivar quanto por via do 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 e multiplicar-se, aumentam a motilidade, e também ocorrem alterações morfológicas.

Assim, as borrelíias presentes no intestino médio de carrapatos 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 as borrelíias 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, que interage especificamente com proteína de membrana OspC e parece facilitar a disseminação da borrelíia no hospedeiro (RAMAMOORTHY et al. 2005).

### **2.3 Doença de Lyme e Síndrome de Baggio-Yoshinari (SBY)**

A Doença de Lyme (DL) em humanos é definida como zoonose, de inúmeras manifestações clínicas sistêmicas, com ocorrência na América do Norte, Europa e Ásia, causada por borrelíias do complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato, tendo como vetores os carrapatos do complexo *Ixodes ricinus* (YOSHINARI et al, 2010). Nos Estados Unidos e Europa tem como agente etiológico *B. burgdorferi* sensu stricto, sendo que a *B. garinii* e *B.*

*afzelli* também são observadas na Europa e Ásia. Esta diversidade etiológica é responsável pelas diferenças clínicas e laboratoriais regionais, como a maior frequência do “Eritema Migrans” (EM) e comprometimento articular nos Estados Unidos (STEERE, 2001).

Na região sul dos Estados Unidos há também uma apresentação conhecida 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 DL 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*, relacionadas à habilidade da espiroqueta em evadir-se ou suprimir o sistema imune do hospedeiro através de diferentes mecanismos (ȚĂȚULESCU et al., 2010).

No Brasil, em humanos, tem sido observado que a doença comporta-se de modo diverso ao que se tem observado no hemisfério norte. Após o início das pesquisas sobre a DL em nosso país, divulgação à classe médica, e o estudo dos casos que surgiram, verificou-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 a enfermidade brasileira cursa 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 *Ixodes ricinus* como no hemisfério norte, pois não se tem identificado tais carrapatos parasitando o homem nas áreas de risco (YOSHINARY et al., 2010). Os carrapatos *Amblyomma* spp. são incriminados como principais envolvidos na epidemiologia da SBY em nosso país, sendo que já houve relato de casos associados ao parasitismo destes carrapatos (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, não foi possível até o momento a cultura e o isolamento de bactérias do complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato de amostras coletadas de pacientes ou de possíveis animais reservatórios.

Laboratorialmente a sorologia de anticorpos contra *Borrelia burgdorferi*, baseada em antígenos de cepas de origem americana ou européia, tem revelado títulos baixos e oscilantes, desaparecendo rapidamente no sangue ou líquido cefalorraquidiano. O que pode ser sugestivo de reações cruzadas para outra espécie de *Borrelia* circulante no Brasil, diferente de *B. burgdorferi*. Ademais, os doentes no Brasil também apresentam alta frequência de autoanticorpos dirigidos contra diferentes constituintes celulares (YOSHINARY et al., 2010), que podem 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 com estruturas morfológicas semelhantes à *Mycoplasma* spp., *Clamidia* spp. e espiroquetídeos sem flagelos no sangue periférico de pacientes com SIRLS. Entretanto, em tais pacientes foi constatada sorologia negativa para *Mycoplasma* spp., *Clamidia* spp. (MANTOVANI et al., 2007).

Desta forma, é sugestivo que há uma diferença morfológica entre a *B. burgdorferi* e o microorganismo identificado como possível agente causador da doença em nosso país. Sendo assim, foi sugerido, com bases em informações da literatura médica, que tais diferentes estruturas de morfologia atípica representariam variações morfológicas de espiroquetas latentes (YOSHINARI 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 *Borrelia 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, assim como diferenças climáticas, 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 (YOSHINARI et al., 2010).

Por tais motivos, com a finalidade de desvincular esta doença tipicamente brasileira da Doença de Lyme 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) (YOSHINARI et al., 2010).

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

## **2.4 Epidemiologia e Saúde Única**

Ainda hoje os modelos biológicos são os mais prevalentes paradigmas em epidemiologia, e consideram a saúde em função da doença, sendo os fatores biológicos seus mais relevantes fatores determinantes. Entretanto, modelos epidemiológicos mais amplos e holísticos, que representem a natureza multicausal dos agravos que, na realidade, são determinados por fatores biopsicosociais, estão 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, desenvolve uma compreensão sistêmica e unificada, demonstrando que a vida de todos os seres vivos é interligada por redes complexas: 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. Mudanças ambientais e perturbações ecológicas, devido aos fenômenos naturais e/ou intervenção humana, têm exercido e continuam a exercer uma marcada influência na reemergência e emergência de doenças parasitárias zoonóticas (PATZ et al., 2000).

A distribuição e a prevalência das doenças transmitidas por carrapatos dependente primariamente da distribuição geográfica e atividade destes (BARANDIKA et al., 2008). Tem sido notado uma aparente expansão da distribuição geográfica de algumas espécies de carrapatos vetores de doenças a animais e a humanos. Juntamente, houve também 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, e podem influenciar o risco de transmissão destas, como foi relatado nos Estados Unidos num modelo de transmissão de *Borrelia burgdorferi* por carrapatos *Ixodes scapularis* (KEESING et al., 2010).

Neste país, a incidência e distribuição espacial da DL tem crescido anualmente. A fragmentação das florestas do nordeste dos Estados Unidos tem sido algo 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*), que são reservatórios de *Borrelia burgdorferi* e infectam carrapatos que neles se alimentam (LEVI et al., 2012).

Foi demonstrado que o aumento da incidência da Doença de Lyme também está associado com a diminuição da população de raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*), que se alimentam de ratos de pés brancos nestas áreas de degradação ambiental. A menor biodiversidade levaria à baixas chances de predação, que ocasionaria um efeito cascata aumentando o risco de ocorrência de doenças zoonóticas, inclusive a 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, foi verificado o “efeito de diluição”, ou seja, o impacto negativo sobre o risco de transmissão de Febre Maculosa Brasileira (FMB), que áreas de maior biodiversidade apresentam, 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, sendo necessários mais estudos epidemiológicos para melhor 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), sendo feitos esforços para a implantação de programas de Saúde Única, em diversas regiões do mundo, 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).

Tem sido verificada associação entre soropositividade em equinos e a infestação por carrapatos. Egenvall et al. (2001), em estudo longitudinal realizado na Suíça, observaram que houve associação entre a soropositividade à *Borrelia burgdorferi* e o período de julho à setembro, que é o período de maior atividade de carrapatos naquele país. Também verificaram que o acesso à pastagens também esteve associado à soropositividade. No Brasil, Salles et al. (2002) observaram maior soroprevalência de *Borrelia* spp. em equinos com alto grau de infestação quando comparados à equinos com rígido controle de carrapatos.

No Brasil, a rede epidemiológica que envolve a SBY parece ser bastante complexa, com a participação de carrapatos *Amblyomma* spp. e, possivelmente, *R. 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 interessante que se tenha uma abordagem epidemiológica desta zoonose sob a ótica da Saúde Única.

## 2.5 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 transmissão transovariana. 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). Em aves migratórias marinhas também foi observado tal possibilidade, inclusive de carregando borrelíias e carrapatos até mesmo entre continentes (HUMAIR, 2002).

Na Eurásia tem sido identificados como reservatórios competentes de *Borrelia 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 e muitas outras espécies de pequenos roedores, especialmente da Europa Oriental e Rússia. Ungulados, inclusive cervídeos, aparentemente não cumprem papel importante como hospedeiros, embora a transmissão através de co-alimentação pode permitir infecção dos carrapatos e, desta forma, tais animais atuarem como amplificadores e carreadores de carrapatos ( GERN et al., 1998).

Nos EUA o principal reservatório competente de *B. burgdorferi* é um pequeno roedor, o rato de pés brancos (“*White Footed Mice*”), *Peromyscus leucopus*, que 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, ele atua 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, e parece que algumas espécies funcionam como reservatórios competentes de *B. burgdorferi*. É reconhecido que as aves colaboram para o estabelecimento de novos focos de DL, mas seu papel como reservatório tem menor importância se comparado ao pequeno roedor (MAGNARELLI, 2011).

No Brasil, tem sido verificado soropositividade em cães, testados por ELISA, para *B. burgdorferi*, reforçando a importância destes como sentinela para a presença de *Borrelia* spp.. 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.

Foi identificado *Borrelia* spp. em urina de gambás (*Didelphis aurita*), sadios e naturalmente infectados, após imunossupressão com ciclofosfamida. Tais espiroquetas foram infectantes quando inoculadas em camundongos albinos (BARBOZA, 1997). Abel et al, (2000b) identificaram espiroquetemia em 13 de 56 gambás (*Didelphis aurita*), capturados na natureza, 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 em roedores e marsupiais capturados em reserva de Mata Atlântica, na região de Cotia – SP, onde casos humanos de SBY e cães sororreativos foram reportados, conseguiu cultivar espiroquetas de amostras de sangue de alguns marsupiais, do fígado de roedores, e de carrapatos *Ixodes* adultos coletados dos animais. Tais dados sugerem que os carrapatos de espécies *Ixodes*, 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 amostras de baço de roedores silvestres, de fígado, 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.

Capivaras e gambás são animais de nossa fauna silvestre que apresentam grandes infestações de carrapatos, particularmente do gênero *Amblyomma* (PEREZ et al. 2008), podendo estar funcionando como reservatórios de borrelíias. Em municípios do estado do Espírito Santo tem sido verificado, além de sororreatividade para *Borrelia 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 em muitos casos de SBY em humanos existem relações com histórico de contato com animais domésticos como cães, equinos e bovinos (YOSHINARY et al., 2010).

Mesmo com todas estas evidências epidemiológicas, em nosso país, de forma análoga ao que tem ocorrido nos casos humanos de SBY, apesar da identificação e visualização de espiroquetas a partir de amostras de animais silvestres, domésticos e carrapatos, não se tem tido sucesso no seu cultivo em meios de cultura habituais, como meio BSK. Igualmente, não se tem conseguido a identificação destes agentes por técnicas moleculares (PCR) (YOSHINARY et al., 2010).

Muitos aspectos da epidemiologia destas espiroquetas continuam a ser investigados, entretanto, 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 sua competência vetorial. Ademais, a competência do reservatório vertebrado também deve ser confirmada (ABEL et al., 2000a).

Enfim, no Brasil, cães (CORDEIRO et al., 2012), equinos (MADUREIRA, 2004; MADUREIRA, 2007), bovinos (ISHIKAWA, 1996), e animais silvestres (ABEL et al., 2000a) têm sido identificados sororreagentes, evidenciando a circulação de *Borrelia* spp. em zonas urbanas, rurais e em ambientes silvestres. É possível que pequenos roedores, marsupiais, capivaras e outros animais silvestres e domésticos participem da epidemiologia da SBY, sendo necessários mais estudos epidemiológicos para um melhor esclarecimento da cadeia de transmissão desta enfermidade no país.

## 2.6 Borreliose em Equinos

Na América do Norte muito se tem debatido acerca da ocorrência de Doença de Lyme, ocasionada por *Borrelia burgdorferi*, suas manifestações clínicas, terapêutica e métodos diagnósticos em equinos. Países da Europa também tem relatado possíveis casos de DL em equinos (HAHN et al., 1996), 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 e a SBY, é possível que existam divergências também nas manifestações clínicas entre a DL que acomete equinos nestes países e a borreliose que acomete equinos no Brasil. Estudos ainda são necessários para elucidar os sintomas clínicos que estão relacionados à manifestação da infecção por borrelíias em equinos presentes no território nacional.

Logo, os profissionais devem atentar-se para tal possibilidade, incluindo a borreliose em diagnósticos diferenciais de algumas manifestações dermatológicas, neurológicas, oftalmológicas e osteomioligamentosas. Mas, principalmente, devem estar alertas ao potencial de transmissão desta zoonose por carrapatos do gênero *Amblyomma* carreados por equinos.

### 2.6.1 Estudos de soroprevalência de *Borrelia* spp. em equinos

Assim 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 agir como hospedeiros reservatórios e manter o ciclo das borrelíias. Apesar disto, estudos sobre a soroprevalência e a infecção nestes animais domésticos são utilizados na avaliação do risco de transmissão de *B. burgdorferi* para os seres humanos em áreas geográficas definidas, agindo como sentinelas para a DL (WAGNER; ERB, 2012).

Wagner e 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 sugeriu que a DL deva entrar como diagnóstico diferencial em casos de doenças neurológicas e musculoesqueléticas de equinos desta região (DURRANI et al., 2011).

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

Na Suíça, amplo estudo envolvendo a utilização de 2.019 amostras de soros de equinos de todas as regiões do país, revelou soroprevalência de 16,8% para *Borrelia*

*burgdorferi* sensu lato (EGENVALL et al., 2001).

Na Romênia estudo analisando 260 amostras de soro equino provenientes de diferentes regiões do país, revelou prevalência de 11,92% através de RIFI para *Borrelia 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 *Borrelia 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 *Borrelia burgdorferi* cepa G39/40 através de iELISA, analisando amostras de equinos de diferentes regiões e tipos de manejo no estado do Rio de Janeiro, verificou soroprevalência de 42,9% em equinos de pequenos criadores do município de Seropédica, relacionando a alta prevalência nestes equinos à maior 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 *Borrelia burgdorferi* cepa G39/40 através do iELISA, revelou soroprevalência de 26,3% entre os 300 equinos amostrados (GALO et al., 2009). Na ilha de Marajó e município de Castanhal, estado do Pará, foi verificada uma prevalência de 7,2% em 208 amostras coletadas (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), verificou prevalência de 28,4%. 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.

### **2.6.2 Manifestações clínicas das borrelioses em equinos**

A doença de Lyme é a doença transmitida por carrapatos a equinos mais controversa e frequentemente diagnosticada em certas partes dos Estados Unidos. Uma junção de fatores tem levado a isto: o aumento da exposição a carrapatos infectados borrelíias; a variabilidade e a natureza vaga dos sinais clínicos; a dificuldade para se chegar a um diagnóstico definitivo; bem como mudanças e alterações ambientais que influem nas populações de animais selvagens que coabitam ambientes com os equinos (GRENAGER, 2013).

Há muita controvérsia acerca da sintomatologia das borrelioses em equinos. Nos países da América do Norte e Europa tem sido descritas sintomatologia semelhantes à de casos humanos, sendo uma doença de sintomatologia multissistêmica também nos equinos (DIVERS et al., 2009). Um amplo espectro de sinais clínicos tem sido atribuído às borrelioses em cavalos, entretanto o estabelecimento de causa e efeito tem sido difícil de documentar na maioria dos casos (DIVERS, 2007). Em áreas dos Estados Unidos, devido à alta soroprevalência para DL em equinos, há grande dificuldade em associar os sinais clínicos à sorologia positiva, tornando a doença bastante controversa (DIVERS, 2013).

Os sinais clínicos mais comumente atribuídos à doença de Lyme em cavalos incluem febre baixa, rigidez e claudicação em mais de um membro, sensibilidade muscular, hiperestesia, inchaço nas articulações, letargia e alterações comportamentais (MAGNARELLI

et al., 2000a). 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 Doença de Lyme 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*, e alguns destes cavalos apresentam 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 (queda de desempenho na atividade exercida na criação), em animais considerados com clínica de DL e soropositivos.

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 *Borrelia burgdorferi*, sugerindo que DL deva entrar no diagnóstico diferencial de uveítes em equinos de áreas endêmicas (PRIEST et al., 2012).

Relato de caso de cavalos com quadros neurológicos por borreliose foram observados por Imai et al. (2011), demonstrando que os animais apresentavam meningoradiculoneurite necrossuprativa crônica no exame de 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) sugere que a ataxia e a 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 e, embora raro em humanos com neuroborreliose, alguns cavalos terão o líquido positivo em PCR para *B. burgdorferi*.

Infecções experimentais de *B. burgdorferi* em pôneis foi possível verificar que os sinais clínicos não foram específicos, comparando animais infectados com grupo controle (CHANG et al. 2000a). Após a infecção experimental, através de infestação de carrapatos infectados, borrelias foram detectadas, 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. Aparentemente, houve uma predileção pela persistência da infecção nestes locais (CHANG et al. 2000a).

A constatação de borrelias na fáscia de cavalos infectados experimentalmente pode explicar a hiperestesia relatada em muitos casos suspeitos e pode 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 borrelias 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 (SEARS et al., 2012).

Em estudo sorológico comparativo entre equinos com sinais clínicos e equinos sem sintomatologias, de áreas endêmicas de DL, constatou-se maior prevalência para *B. burgdorferi* (77%), em equinos com sintomatologia, em relação aos equinos saudáveis (29%), além de apresentarem títulos mais elevados ao ELISA (MANION et al.,2001).

Não há estudos acerca da sintomatologia da borreliose em equinos no Brasil. Entretanto, estudos demonstram a circulação de *Borrelia* spp. nestes animais através de

ensaios sorológicos, evidenciando que borrelíias infectam os equinos e que estes podem estar relacionados à epidemiologia da doença no território nacional (SALLES et al., 2002; MADUREIRA et al., 2007).

### 2.6.3 Diagnóstico em equinos

Dado à inespecificidade da sintomatologia clínica, assim como é preconizado em Medicina, para a definição do diagnóstico de DL em animais, deve-se associar a clínica, a epidemiologia, a região geográfica, o histórico e o exame sorológico (YOSHINARY et al., 2010; BATHE; SCHWARTZ, 2011; DIVERS, 2013).

Borrelíias são bactérias de necessidades metabólicas complexas, e seu cultivo iniciou-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, obtendo-se crescimento da espiroqueta à temperatura de 33°C em, aproximadamente, sete dias. Seu cultivo pode ser realizado a 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 facilmente cultiváveis (TEIXEIRA, 2010). Além disso, é um processo demorado e oneroso, sendo que, no Brasil, não se tem tido sucesso no cultivo e no isolamento da borrelíia circulante. (YOSHINARI et al., 2010).

A visualização das espiroquetas pode ser realizada em microscopia de 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 Doença de Lyme em humanos tem sido basicamente sorológica, pois a cultura é um procedimento demorado e pouco produtivo e a PCR é pouco empregada, visto que só identifica casos em que borrelíias estão circulantes ou depositadas em tecidos (YOSHINARY et al., 2010).

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

Greene et al. (1991) encontraram concordância entre os testes ELISA e RIFI, para detecção de antígenos homólogos de *B. burgdorferi* em cães. Magnarelli et al. (2004) demonstraram alta especificidade (97%) do teste de ELISA, com antígeno bruto e com antígeno recombinante.

Magnarelli et al. (1984) realizaram testes comparativos (ELISA e RIFI) para a detecção de anticorpos para *B. burgdorferi* em soros de humanos, cães e ratos de pés brancos naturalmente infectados. Os soros reagiram de maneira similar em ambos os testes, e a concordância observada entre eles foi de 95%.

Em humanos, no Brasil, na falta de um isolado de borrelíia brasileiro, tem sido usado a *Borrelia burgdorferi* cepa G39/40 de origem americana nos ensaios sorológicos (ELISA e Western-blotting). O ELISA é realizado com antígeno total sonicado desta cepa de origem americana e segue metodologia adotada nos EUA (YOSHINARY et al., 2010).

Em Medicina Veterinária, ensaios de iELISA para detecção de IgG homólogas anti - *B. burgdorferi*, a 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; JOPPERT, 2001). No Brasil, nos estudos de soroprevalência realizados em cães (SOARES et al., 1999), bovinos (ISHIKAWA, 1996) e equinos (SALLES et al., 2002), com auxílio do teste iELISA, não foram observadas reações cruzadas entre esses dois gêneros de espiroquetas.

Madureira (2007) caracterizou morfometricamente e genotipicamente um isolado de espiroqueta oriunda de equino do estado do Rio de Janeiro. A análise das seqüências do isolado para os genes 16S *rRNA* e *fla*, revelaram 99% (609/611) e 98% (222/226) de identidade com seqüências depositadas no “GeneBank” para *Borrelia theileri*, respectivamente. O quê, em conjunto com a análise morfométrica ( $17,2 \pm 3,6$  µm de comprimento;  $10 \pm 2$  espiras), revelou ser o microrganismo em questão, *B. theileri* (MADUREIRA, 2007).

*Borrelia theileri* é outra espiroqueta, transmitida principalmente por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* que pode infectar bovinos e equinos (COLLOW, 1967). A probabilidade da ocorrência de reações cruzadas entre *B. burgdorferi* e *B. theileri* em regiões onde os agentes coexistam, comprometendo os estudos soroepidemiológicos, foi alertada por Rogers et al. (1999). Entretanto, este mesmo estudo, avaliou a especificidade do ensaio e não verificou reações cruzadas entre tais agentes etiológicos através do ELISA.

O uso de antígenos recombinantes específicos para *B. burgdorferi*, tem sido estudado, na tentativa de aumentar a especificidade dos ensaios. Os principais antígenos estudados têm sido os 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), o fragmento central da flagelina p41-G (13kDa) entre 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, tais antígenos apresentam limitações em seu uso: OspC relaciona-se à respostas iniciais da infecção por *B. burgdorferi*; OspF à respostas tardias, já os OspA, OspB e OspE parecem 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 também podem ser utilizadas como suporte no diagnóstico (GRODZICKI; STEERE 1988, LIENBLING et al. 1993). A RIFI, entretanto, exige mais experiência dado à maior subjetividade na interpretação dos resultados. Ademais, estudos têm revelado alta concordância com o teste de ELISA (MAGNARELLI et al., 2004).

Ensaio como o *western blotting* têm sido empregados, secundariamente, para a confirmação de resultados após a triagem realizada com ELISA, posto que este possui maior sensibilidade e especificidade o ELISA (GRODZICKI; STEERE, 1988). Entretanto, é um ensaio oneroso e há dificuldade na obtenção do 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), apesar da alta especificidade e maior sensibilidade que o ELISA nos estágios iniciais da infecção, tem como desvantagens ser mais trabalhosa e onerosa que este, sendo o ELISA mais recomendado para estudos epidemiológicos de varredura inicial nas populações (NIŚCIGORSKA et al., 2003).

#### 2.6.4 Tratamento

No Hemisfério Norte os dois 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 doxiciclina devem ser monitorados para mudança na consistência das fezes, relacionada à efeitos colaterais provocados por este antibiótico em longos tratamentos, provocando alteração na microbiota nativa do ceco e cólon. Assim uma pequena porcentagem dos equinos tratados pode apresentar diarreia (DIVERS et al., 2009).

Oxitetraciclina, na dose de 6,6 a 11 mg/kg, via endovenosa, 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). A Oxitetraciclina não deve ser administrada em altas doses ou por períodos prolongados se o equino estiver desidratado ou se tiver doença ou disfunção renal, pois insuficiência renal aguda pode ocorrer nestes casos. Também é recomendado o acompanhamento da função renal em equinos sob longo tratamento com a droga (DIVERS, 2013)

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

Estudo experimental comparando a ação de três antibióticos em pôneis após três meses de infecção experimental com *Borrelia burgdorferi*, obteve resultados que indicam o tratamento com oxitetraciclina. Os pôneis foram tratados por 28 dias e acompanhados durante seis meses após os tratamentos até a eutanásia. Verificou-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*. Já os animais do grupo tratado com doxiciclina (10 mg/kg/dia) e ceftiofur (2,2 mg/kg/dia), apresentaram títulos crescente quatro meses após os tratamentos, bem como amostras teciduais, retiradas *post mortem* ao final de 12 meses, positivas em cultura e PCR (CHANG et al., 2005).

#### 2.6.5 Prevenção

Certamente, a melhor forma de prevenção é evitar a exposição a carrapatos vetores e impedir que estes fiquem fixados por longos períodos no animal, permitindo a transmissão das borrelíias (DIVERS, 2013).

Tem sido testada uma vacina baseada em OspA recombinante (gene OspA obtido a partir de cepa *B. burgdorferi* B31) com adjuvante (hidróxido de alumínio), desenvolvida para uso em humanos, mas que também tem sido usada em cães e equinos. Particularmente em

equinos, tal vacina tem demonstrando capacidade de bloquear a infecção, evitando a doença em infecção experimental (CHANG et al., 2000b).

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

## **2.7 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, observou que os 462 carrapatos coletados realizando parasitismo em militares pertenciam a dez diferentes espécies, sendo todas elas vetores de doenças zoonóticas. Também 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. Mas a amplitude da idade dos militares parasitados (até 76 anos), claramente indica 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 contanto com animais de uso militar, a 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 a 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 e Wiggans (2001), os perigos ocupacionais, de saúde ambiental e de doença 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 de risco como matas, cerrados, campos, entre outras, propiciando a proximidade com animais domésticos e selvagens (possíveis carreadores, reservatórios ou amplificadores de borrelioses), bem como o contato com os carrapatos potencialmente vetores (PRADO, 2013).

Corroborando o risco ocupacional para doenças transmitidas por carrapatos a que militares estão expostos, há estudos moleculares registrando a presença de carrapatos infectados com *Rickettsia rickettsii* em áreas de instrução da Academia Militar das Agulhas Negras, em Resende - RJ (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 rickettsias em operações e treinamentos militares em áreas infestadas por carrapatos (SHANKS et al., 2004).

Visando mitigar os riscos de infestação por carrapatos, e consequente 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, o 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 até mesmo como hospedeiros reservatórios. Há relatos sugestivos desta possibilidade, inclusive há casos humanos que tem relação e histórico epidemiológico de infecção por *Borrelia burdorferi* a 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), 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 km<sup>2</sup>, 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 do município de Resende, dentro da microrregião do Vale do Paraíba Fluminense, no estado do Rio de Janeiro. Fonte: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:RioDeJaneiro\\_Municip\\_Resende.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:RioDeJaneiro_Municip_Resende.svg).

A Academia Militar das Agulhas Negras (AMAN) é uma instituição de ensino superior do Exército Brasileiro e conta com um efetivo de aproximadamente cinco mil homens. Está situada no município de Resende, sendo a maior escola de formação militar da América Latina, com 67 km<sup>2</sup> 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 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 a área da AMAN. 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*); preás (*Cavia aperea*); tatus (*Dysipus novectus*); jacus, (*Penelope ochrogaster*), 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 – RJ. Fonte: <http://www.turmafloriano.com.br/aman.htm>

## 3.2 Inquérito Epidemiológico nos Equinos de Uso Militar

### 3.2.1 Delineamento do estudo e amostragem

Efetuiu-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.

Como não há trabalhos publicados ou estudos acerca da soroprevalência de *Borrelia* spp. em equinos no município de Resende, 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 estudada, 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;  $P_{\text{esp}}$  = prevalência esperada;  $d^2$  = precisão absoluta desejada.

Entretanto, como a amostra calculada extrapolou a população do rebanho de equinos de uso militar mantidos na área, optou-se pela realização de um censo da população de equinos de uso militar, que era de 174 equinos à época do estudo. Sendo assim, todos os equinos de uso militar presentes no rebanho da AMAN no momento do estudo foram submetidos a exame físico visando verificar a infestação de carrapatos, assim como tiveram amostras de sangue coletadas, no período compreendido entre os meses de fevereiro a março de 2013.

### **3.2.2 Caracterização do rebanho de equinos de uso militar da AMAN**

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.

Com relação ao controle de ectoparasitas, tais equinos têm sido submetidos, desde o ano de 2005, a um controle estratégico de carrapatos baseado em banhos com solução de cipermetrina a 15%, diluída na proporção de 2 ml por litro de solução, sendo aplicados 4 litros de solução por equino através de aspersão. Os banhos são realizados 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).

No momento em que foi realizado o estudo na AMAN os 174 equinos do rebanho estavam divididos em duas áreas onde foram mantidos: a Seção de Equitação (Sec Equi) com 137 equinos, e o Curso de Cavalaria (C Cav) com 37 equinos.

Em tais áreas os equinos foram submetidos a dois tipos de manejo: Regime estabulado e semi-estabulado. No regime estabulado os equinos foram 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 foram 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.

Na Sec Equi os equinos mantidos sob regime estabulado foram mantidos no pavilhão de baias denominado “Odim”, enquanto que os equinos em regime semi-estabulado foram mantidos nos pavilhões “Box” e “Geral”. Estes são soltos em área de pastagem da Sec Equi.

No C Cav os equinos foram mantidos todos no mesmo pavilhão de baias, sendo que os animais em regime semi-estabulado foram soltos em área de pastagem do C Cav, enquanto os estabulados permanecem nas baias, sendo ocasionalmente soltos em pequenos piquetes por curtos períodos.

Nas áreas de pastagem onde os equinos do C Cav, assim como nos piquetes onde os equinos estabulados da Sec Equi foram ocasionalmente soltos, havia a presença de mata ciliar, capoeiras e fragmentos de mata atlântica, tornando tais áreas coabitadas por animais silvestres. Tal fato não ocorria com a área de pastagem onde os equinos de regime semi-estabulado da Sec Equi foram soltos, pois era composta basicamente por forrageiras.

Desta forma, dentro das duas áreas de criação de equinos na AMAN (Sec Equi e C Cav) os 174 equinos de uso militar estiveram subdivididos em quatro grupos de manejo: Equinos da Sec Equi, estabulados no pavilhão Odim (Grupo 1), com um total de 37 equinos; equinos da Sec Equi, semi-estabulados do pavilhão Box (Grupo 2), com 40 equinos; equinos da Sec Equi, semi-estabulados do pavilhão Geral (Grupo 3) com 60 equinos; e equinos semi-estabulados do C Cav (Grupo 4), com 37 equinos.



**Figura 3.** Imagens dos grupos de equinos na Seção de Equitação 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.



**Figura 4.** a) Imagem do Rio Alambari e região de mata ciliar que transpassa as áreas de pastagens do C Cav e piquetes da Sec Equi; b) Lagoa na área de pastagem do C Cav, notar presença de fezes de capivaras no canto inferior direito da foto (seta indicando); c) Equinos do Grupo 4 pastando próximo à fragmento de mata; d) Equinos do Grupo 1 em piquete da Sec Equi, em contato com mata ciliar.

### 3.2.3 Ficha de exame físico e informação

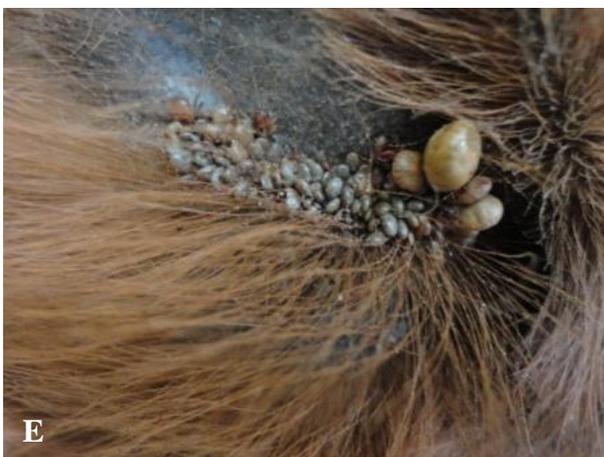
Cada animal teve seus dados registrados em uma Ficha Individual de Exame Físico e Informação de Equino (Anexo 1), visando recolher informações inerentes aos equinos (idade, sexo, pelagem, raça), quanto à infestação por carrapatos (número e gênero de carrapatos que infestavam cada animal no momento da coleta), e quanto às condições de manejo (estabulado ou semi-estabulado, característica do ambiente de pastejo, áreas de criação em que se encontra na AMAN, entre outras). Algumas informações (p.ex.: cor, sexo, tipo de manejo) foram coletadas no ato da coleta das amostras de sangue, outras foram coletadas através do Sistema de Controle de Equinos do Exército (Sistema Pégasus) (p. ex.; idade, tempo de criação na AMAN). Todas as informações adquiridas a partir de tais fichas foram tabuladas numa planilha do Microsoft Excell a fim de avaliar possíveis fatores associados à sororreatividade dos equinos à *Borrelia* spp..

### **3.2.4 Coleta de carrapatos e de 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)(LABRUNA et al., 2001).

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 aliquoteado 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.



**Figura 5.** Imagens das coletas de amostras e de carrapatos. a) Amostras de sangue coletadas; b) Soro aliquotado, identificado e congelado para envio à UFRRJ; c) Equino tendo o corpo inspecionado para a coleta de carrapatos; d) Contagem e identificação dos carrapatos no LAC HVet AMAN; e) Infestação de *Dermacentor nitens* no pavilhão auricular de equino; f) Fêmea de *Amblyomma cajenense* ingurgitada coletada de equino.

### 3.3 Teste Sorológico

#### 3.3.1 Obtenção do antígeno bruto de *Borrelia burgdorferi*

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 (12.000xg/20 min. a 4 °C) e o sedimento foi ressuspenso em tampão salino fosfatado (PBS) 0,001M MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O pH 7,4 e submetido 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. A suspensão foi submetida à sonicação (Fisher Sonic Dismembrator, model 300, Dynatech) por três minutos, com intervalos de 15 segundos. Posteriormente, foi filtrada a 0,45µm e aliqüotada, obtendo-se assim, o extrato total de antígeno para uso nos procedimentos de ensaios imunológicos, o qual foi armazenado entre a - 70°C, até o momento (GRODZICKI; STEERE, 1988).

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

#### 3.3.2 Obtenção de soro controle positivo para *Borrelia burgdorferi*

O soro para o controle positivo foi obtido por Madureira (2007).

#### 3.3.3 Obtenção do soro controle negativo para *Borrelia burgdorferi*

O soro para o controle negativo foi obtido por Madureira (2007).

#### 3.3.4 Ensaio de imunoadsorção enzimática indireta (iELISA)

As amostras coletadas foram analisadas através do iELISA, conforme padronizado por SALLES (2001). Realizou-se o ensaio para detectar anticorpos da classe IgG homólogos contra *B. burgdorferi* sensu lato, utilizando 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<sup>TM</sup> Maxisorp; Nunc,Denmark), incubadas em câmara úmida a 4 °C "overnight".

Após sensibilização, as placas foram lavadas por três vezes com Tampão salino fosfato acrescido de 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 (SIGMA®) na diluição de 1:1000 em PBST. As placas foram incubadas por mais 90 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) 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 (*cutoff*) 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  $DO \times 100 / \text{“cutoff”}$ . Desta forma, índices de DO com valores acima de 100 foram considerados positivos.

### 3.4 Análise Estatística

Para a descrição da prevalência de animais positivos no rebanho, assim como nos respectivos grupos, foram calculadas as taxas de prevalência dividindo o número de equinos positivos no rebanho, ou no grupo, pelo efetivo do rebanho, ou grupo em questão, multiplicando-se pela constante (100), conforme Pereira (2012).

Para a descrição do quantitativo de carrapatos entre os grupos estudados, foram realizadas algumas análises exploratórias dos dados através de gráficos boxplots, cálculos do número médio de carrapatos por equino e cálculos do percentual de equinos com presença de infestação.

Para a comparação da prevalência de animais positivos entre grupos utilizou-se o teste de comparação de proporções em nível de significância de 5 %.

Para a comparação das contagens de carrapatos entre os grupos, utilizou-se testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis, pois houve presença de não normalidade nos dados de contagem verificados através do teste de Shapiro-Wilk, ambos em nível de 5% de significância.

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 anticorpos homólogos anti-*Borrelia 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. Para as variáveis com significância foram calculadas as *Odds Ratio* (OR) e os respectivos intervalos de confiança (IC). Todas as análises estatísticas foram realizadas através do pacote estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2010).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Inquérito Sorológico para *Borrelia* spp.

A partir das 174 amostras submetidas ao iELISA, foram detectados 52 (29,89%) animais sororreagentes para *Borrelia* spp.. Destes, 13 animais pertenciam ao Grupo 1; 11 animais ao Grupo 2; 16 animais ao Grupo 3; e 12 animais ao Grupo 4. Os resultados de sororreatividade e respectivas prevalências dos grupos e rebanho como um todo são expressos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Resultados de sororreatividade ao iELISA para *Borrelia burgdorferi*, respectivas prevalências nos grupos de equinos, e resultado do teste de comparação de proporções.

	iELISA		Prevalência	Teste de comparação de proporções <i>p</i> -valor
	Positivos	Negativos		
Grupo 1	13	24	35,14%	0,80
Grupo 2	11	29	27,50%	
Grupo 3	16	44	26,67%	
Grupo 4	12	25	32,43%	

Grupo 1: equinos da Sec Equi, estabulados no pavilhão Odim (37 equinos); Grupo 2: equinos da Sec Equi, semi-estabulados do pavilhão Box (40 equinos); Grupo 3: equinos da Sec Equi, semi-estabulados do pavilhão Geral (60 equinos); Grupo 4: equinos semi-estabulados do C Cav (37 equinos).

### 4.2 Infestação por Carrapatos

Neste estudo foi observada a ocorrência de somente duas espécies de carrapatos realizando parasitismo nos equinos, a saber: *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 houve diferença significativa ( $p < 0,001$ ) entre as médias de infestação por espécies de carrapatos observadas, nos equinos de uso militar ao se comparar os grupos de manejo em que estavam distribuídos (Tabelas 2 e 3).

**Tabela 2.** Porcentagem de equinos infestados e média de contagem de carrapatos por equino (*A. cajennense*, *D. nitens* e total da contagem de carrapatos) observadas nos diferentes grupos de manejo.

Grupos de manejo	<i>A. cajennense</i>		<i>D. nitens</i>		Carrapatos	
	% equinos infestados	Média de contagem	% equinos infestados	Média de contagem	% equinos infestados	Média de contagem
Grupo 1	18,9	0,6	16,2	2	32,4	2,6
Grupo 2	85	2,4	80	28,7	97,5	31,1
Grupo 3	58,3	1,6	50	14	70	15,6
Grupo 4	83,8	9,3	2,7	0,03	83,9	9,33
Rebanho	61,5	3,2	39,6	11,9	71,3	15,1

**Tabela 3.** Resultado da comparação entre as médias de contagens de carrapatos por equino (*A. cajennense*, *D. nitens* e total de carrapatos) entre os grupos, através do teste de Kruskal-Wallis.

	<b>Médias de contagens de carrapatos por equino</b>				<b>Teste Kruskal-Wallis</b>
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	<i>p</i> -valor
<i>A. cajennense</i>	0,6	2,4	1,6	9,3	<0,001
<i>D. nitens</i>	2	28,7	14	0,03	<0,001
Carrapatos	2,6	31,1	15,6	9,33	<0,001

### 4.3 Fatores Associados aos Equinos Sororreagentes à *Borrelia burgdorferi*

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 iELISA. Dentre todas as variáveis independentes, definição racial, grupo de manejo, sistema de criação, tempo de criação na AMAN, grau de infestação por carrapatos, infestação por *D. nitens* e infestação por *A. cajennense* não apresentaram associação estatística ( $p > 0,25$ ) a partir da análise bivariada (Tabela 4). As variáveis gênero, idade, tipo de emprego, origem do equino e infestação por carrapatos apresentaram significância na análise bivariada ( $p < 0,25$ ) e, assim, foram incluídas na análise multivariada. De todas estas variáveis, quando submetidas à regressão logística, apenas a presença de infestação por carrapatos influenciou significativamente na soropositividade dos animais.

Apesar disto, observou-se que fêmeas, animais com idade superior a seis anos e menor ou igual a dez anos, equinos com raça definida, equinos manejados no Grupo 1, equinos empregados para esporte, equinos do sistema de criação estabulado, equinos oriundos da Coudelaria do Rincão, assim como equinos com infestação por *D. nitens* e com infestação por *A. cajennense* apresentaram maior frequência de soropositividade para *Borrelia* spp..

**Tabela 4.** Análise bivariada e multivariada da frequência de equinos soropositivos através do iELISA para anticorpos homólogos da classe IgG anti- *B. burgdorferi*, em função das variáveis: gênero, idade, definição racial, grupo de manejo, tempo de criação, origem, emprego sistema de criação e presença de infestação por carrapatos nos equinos de uso militar do município de Resende – RJ.

Características dos animais e manejo	N	(% )	Bivariada		Multivariada		
			$\chi^2$	P	P	OR	IC 95%
<b>Gênero</b>							
Fêmea	77	37,7	3,98	0,06	0,06	-	(0,97 - 4,15)
Macho	97	23,7				*	-
<b>Idade</b>							
≤ 6 anos	10	40	6,47	0,09	0,51	-	(0,32 - 9,33)
> 6 e ≤ 10 anos	62	40,3			0,96	-	(0,18 - 6,05)
> 10 e ≤ 20 anos	87	21,8			-	*	-
> 20 anos	15	26,7			0,48	-	(0,22 - 26,35)
<b>Definição racial</b>							
Com raça	42	33,3	0,31	0,72	-	-	-
Sem raça definida	132	28,8			-	-	-
<b>Grupo de manejo</b>							
Grupo 1	37	35,1	1,0	0,80	-	-	-
Grupo 2	40	27,5			-	-	-
Grupo 3	60	26,7			-	-	-
Grupo 4	37	32,4			-	-	-
<b>Tempo de criação na AMAN</b>							
≤ 5 anos	82	36,8	1,31	0,52	-	-	-
> 5 e ≤ 15 anos	64	38,9			-	-	-
> 15 anos	28	17,9			-	-	-
<b>Emprego do equino</b>							
Esporte	42	38,1	1,78	0,25	0,25	-	(0,61 - 6,33)
Instrução	132	27,3			-	*	-
<b>Sistema de criação</b>							
Semi-estabulado	134	28,4	0,65	0,54	-	-	-
Estabulado	40	35			-	-	-
<b>Origem dos equinos</b>							
Coudelaria do Rincão	90	35,6	22,32	0,23	0,06	-	(0,11 - 1,06)
Rio Grande do Sul	61	23,0			-	*	-
Desconhecida	23	26,1			0,25	-	(0,16 - 1,62)
<b>Infestação por <i>Dermacentor</i></b>							
Não	105	28,6	0,22	0,77	-	-	-
Sim	69	31,9			-	-	-
<b>Infestação por <i>Amblyomma</i></b>							
Não	67	26,9	0,47	0,60	-	-	-
Sim	107	31,8			-	-	-
<b>Grau de infestação por carrapatos</b>							
Ausente/leve	140	30,0	0,005	0,89	-	-	-
Moderado/alta	34	29,4			-	-	-
<b>Infestação por carrapatos</b>							
Não	50	20	3,27	0,10	-	*	-
Sim	124	34			0,02	3,45	(1,2 - 9,7)

N: Número de amostras de animais;  $\chi^2$ : Valor do Qui-quadrado; \*\*Teste Exato de Fisher; P: p-valor; OR: *Odds Ratio*; IC: Intervalo de confiança. \*Categoria de referência.

## 5 DISCUSSÃO

O resultado de soroprevalência encontrado por este estudo é similar ao reportado por Madureira et al. (2007) em equinos dos municípios de Três Rios e Vassouras, estado do Rio de Janeiro, que observou soroprevalência de 28,4% também ao iELISA. 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%.

Entretanto a prevalência observada nos equinos de uso militar do município de Resende, difere da prevalência observada em equinos da região insular do estado do Pará, visto que Madureira et al. (2009) reportaram prevalência de 9,5% em equinos da Ilha de Marajó.

Salles et al.(2002) evidenciou soroprevalência de 42,8% em equinos do município de Seropédica criados extensivamente e com altas infestações de carrapatos. 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, comparados ao resultado encontrado nos equinos da AMAN, é provável que seja conseqüente à maior exposição destes últimos à carrapatos, assim como características de manejo e pastagens.

Os equinos da AMAN tiveram média de contagem de carrapatos de 15,1 carrapatos por equino, sendo considerada um grau de infestação leve (TEGLAS et al., 2005). Considerando-se somente a espécie *A. cajennense*, a média de contagem por equino foi de 3,2 carrapatos por equino. Tal contagem é muito baixa comparada à encontrada em animais criados à pasto sem controle estratégico de carrapatos. Labruna et al. (2004), na mesma época do ano em que foi realizado este estudo, encontrou uma contagem média que variou de 560,7 a 763,6 carrapatos *A. cajennense* por equino.

Entretanto, no presente estudo houve uma grande amplitude em relação a contagem de carrapatos nos equinos, havendo animais que não apresentavam nenhum carrapato, e um animal com até 289 carrapatos. Os equinos, em sua maioria (137/174), são criados em regime semi-estabulado e, mesmo os considerados como estabulados, tem acesso esporádico à piquetes onde ficam expostos à carrapatos.

A amplitude na contagem de carrapatos certamente também é influenciada pelos diferentes tipos de toalete (incluindo inspeção, limpeza, escovação e aparação de crinas) e manejo a que os animais são submetidos nos grupos dentro da AMAN, justificando a diferença significativa observada na Tabela 3. Isto também fica evidenciado pela infestação de *D. nitens* que acomete, de forma diferente, aos animais dos Grupos 2 e 3, apesar destes frequentarem a mesma área de pastagem. Observou-se, durante a coleta das amostras, que os animais do Grupo 3 têm a crina toda aparada de forma rente, dificultando o abrigo de *D. nitens* nesta localização e facilitando a ação de acaricidas aplicados, bem como a remoção mecânica por tratadores. Já os equinos do Grupo 2 são mantidos com a crina aparada, mas permanecem com a porção distal da crina (“topete”) sem aparação, local onde foi verificado intensa infestação por *D. nitens*. O “topete” característico dos equinos do Grupo 2 parece fornecer abrigo aos carrapatos, protegendo-os da insolação, da ação de acaricidas que são aplicados por aspersão, e da remoção mecânica.

É provável que as diferentes pastagens a que os animais têm acesso tenham graus variados de infestação entre as diferentes espécies de carrapatos. Os animais do Grupo 4, sob

regime semi-estabulado, apresentaram uma média de infestação por *Amblyomma cajennense* maior que os Grupos 2 e 3, também semi-estabulados, mas que frequentam área de pastagem diferente. Isto pode ser explicado pela presença de áreas de mata ciliar e fragmentos de mata atlântica, assim como um rio e uma lagoa, presentes na área de pastagem frequentada pelos equinos do Grupo 4. Corroborando Labruna et al. (2001), que observaram forte associação epidemiológica entre pastagens de cobertura desuniforme, contendo diversas espécies de árvores e arbustos interpostos por gramíneas, e a presença de carrapatos *A. cajennense* assim como alto grau de infestação nos equinos que as frequentavam. Este tipo de pastagem parece favorecer um microclima de solo mais adequado ao desenvolvimento e proliferação de *A. cajennense* (LABRUNA et al., 2001).

Tais ambientes também favorecem a presença de animais silvestres coabitando as pastagens, entre eles capivaras e gambás, incriminados como possíveis reservatórios de *Borrelia* (ABEL et al. 2000a; SPOLIDORO et al., 2010) e que apresentam altas infestações por carrapatos do gênero *Amblyomma* (PEREZ et al., 2008), favorecendo a disseminação destes carrapatos nas áreas frequentadas por tais equinos e, possivelmente, a sua infecção por *Borrelia* spp.. Tal observação também é relatada por Eng et al. (1988), que verificaram que cães e equinos que têm acesso à áreas de vegetação densa, à áreas peri-domiciliares, ou acesso a matas tem risco igual ou maior de tornarem-se infectados por *B. burgdorferi* quando comparados à humanos.

A biodiversidade de flora e fauna não ocorrem nas pastagens frequentadas pelos equinos dos Grupos 2 e 3. No entanto, os equinos do Grupo 1, apesar de passarem a maior parte do tempo estabulados, tem acesso esporádico à piquetes em área contígua à frequentada pelos equinos do Grupo 4. Assim, ficando sujeitos à condições de pastagens similares às dos animais do Grupo 4, com presença de matas coabitadas por animais silvestres.

Desta forma, tais condições de pastagens estariam influenciando não somente na infestação de carrapatos sobre os equinos, mas também na soroprevalência para *Borrelia* spp., que apresentou-se mais elevada nos equinos dos Grupos 1 e 4, respectivamente de 35,14% e 32,43%, quando comparados aos equinos dos Grupos 2 e 3, que apresentaram soroprevalências de 27,5% e 26,67%, apesar da diferença não ser significativa ao teste de comparação de proporções, conforme Tabela 1.

O risco de infecção por *B. burgdorferi* 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 têm acesso. Mas também depende, qualitativamente, da proporção destes carrapatos, presentes em determinada área, que estão realmente infectados. Ademais, a maioria dos casos de Doença de Lyme 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 *A. cajennense* e a soropositividade nos animais, verificou-se que os equinos do Grupo 4 foram os mais intensamente parasitados por tal carrapato e tiveram prevalência de 32,43%, maior que as observadas nos grupos 2 e 3.

A menor média de contagem de carrapatos observada nos equinos do Grupo 1 está ligada ao tipo de emprego e aos maiores cuidados de toailete que tal grupo recebe. Os animais de tal grupo pertencem ao pavilhão Odim, onde ficam alojados os equinos utilizados para esporte (Hipismo e Concurso Completo de Equitação), sendo utilizados mais intensamente em provas e treinamentos.

Desta forma, este grupo detêm os animais que tem a maior frequência de toaletes e escovações entre os grupos de equinos da AMAN, o que contribui para a remoção mecânica da maioria dos carrapatos, ocasionando a baixa contagem verificada em tal grupo. Entretanto a presença de carrapatos evidencia que há contato com tais vetores e, embora aparente ser

quantitativamente menor que em outros grupos, a alta soroprevalência em tal grupo sugere uma questão qualitativa envolvida na infecção dos animais, sendo provável que tais equinos tenham contato com áreas que possuem uma alta proporção de carrapatos infectados em atividade. Fato similar foi observado por Egenvall et al. (2001), que verificou maior risco para soropositividade para *Borrelia burgdorferi* em equinos estabulados com acesso ocasional às pastagens, pois os equinos tinham acesso à pastagens em momentos de alta atividade dos carrapatos vetores.

O resultado do presente estudo revela prevalência semelhante às de áreas endêmicas para DL em países do hemisfério norte, onde tem sido observadas prevalências entre 10 a 60% (COHEN et al., 1992; BERNARD et al., 1990). Nos Estados Unidos a soroprevalência para DL em equinos varia de acordo com a área de estudo, sendo maior em regiões onde a DL é endêmica em humanos (MAGNARELLI et al., 2000b). Wagner; Erb (2012) reportaram 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 (DURRANI et al., 2011). Na região nordeste dos EUA, região endêmica para DL humana, foi verificada prevalência de 45,1% em 85 amostras de soro equino estudadas, sendo a alta prevalência atribuída à ampla distribuição geográfica dos carrapatos *Ixodes* e à presença de roedores reservatórios nesta região (MAGNARELLI et al., 2000b). Já estudos na região Noroeste dos EUA, região não endêmica de DL humana, revelaram menor soroprevalência, de 14,8% (METCALF et al., 2008). Tais estudos evidenciam o papel do equino como sentinela para a DL nos EUA.

Neste estudo transversal, apesar das infestações por *Amblyomma* ou por *Dermacentor*, separadamente, não terem mostrado associação com soropositividade pela análise multivariada, ao analisarmos a infestação por carrapatos como um todo foi verificado que esta variável estava associada à soropositividade para *Borrelia* spp., sendo fator de risco significativo (OR 3,45; IC 1,2-9,7). Desta forma, fica evidenciado o papel dos carrapatos como prováveis vetores da *Borrelia* spp. que circula neste rebanho. Tal fato também corrobora o verificado por Egenvall et al. (2001), que observou que a soroprevalência aumentou com o aumento da exposição aos carrapatos. Salles et al. (2002), em estudo de soroprevalência de *Borrelia* spp. em equinos no estado do Rio de Janeiro, também notou maior prevalência em equinos com maior infestação por carrapatos.

Os resultados obtidos no presente inquérito também confirmam a hipótese de que os equinos são considerados animais sentinela para a *Borrelia* spp., havendo 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).

A presença de equinos sororreativos corrobora a circulação de *Borrelia* spp. no município de Resende, fato observado também em outros municípios do estado do Rio de Janeiro conforme Madureira (2004) e Salles et al. (2002).

Madureira et al. (2009) alertaram que a presença de anticorpos contra *Borrelia burgdorferi* em equinos é indicativo da circulação de *Borrelia* spp. no rebanho, sendo necessário 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 sororreatividade 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 à 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 à militares ao gerar evidência epidemiológica da circulação de *Borrelia* spp. no rebanho equino e, conseqüentemente, na área de instrução militar da AMAN, possibilitando a transmissão deste agente à militares.

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

## 6 CONCLUSÕES

A presença de anticorpos IgG homólogos anti-*Borrelia burdorferi* em equinos de uso militar da AMAN é indicativo da circulação de *Borrelia* spp. na área militar e alerta para a possibilidade de ocorrência de casos de borrelioses em militares, reforçando a importância de medidas de proteção coletiva e individual para mitigar os riscos de doenças transmitidas por carrapatos em atividades militares.

Existe uma associação direta entre a infestação por carrapatos e a soropositividade para *Borrelia* spp. nos equinos, evidenciando o papel destes ectoparasitas como prováveis vetores no rebanho de equinos de uso militar da AMAN.

## 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. Frequência 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.

BARBOUR, A. G. Isolation 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. **Deteção 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.

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.; KU, Y.W.; CHANG, C.F.; CHANG, C.D.; MCDONOUGH, S.P.; DIVERS, T.J.; POUGH, M.; TORRES, A. Antibiotic treatment of experimentally *Borrelia burgdorferi*-infected ponies. **Veterinary Microbiology**, v.107, p.285–294, 2005.

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.

COMIN, D.; VIEL, L.; FERRO MILONE, M.; BENEDETTI, G.; SOMMAVILLA, G.; CAPELLI, G. Popolazioni animali domestiche e selvatiche sentinelle della diffusione di *Borrelia burgdorferi* sensu lato e TBE vírus nel territorio bellunese. **Large Animal Review**, v.13, p. 217-220, 2007.

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.; FRANDBSEN, 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.

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**. Tese de Mestrado, (Mestrado em Medicina Veterinária, Parasitologia Veterinária) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 1996. 51p.

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, Departamento de Parasitologia 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.; KERBER, C.E.; FERREIRA, F.; FACCINI, J.L.H.; DE WAAL, D.T.; GENNARI, S.M. Risk factors to tick infestation and their occurrence on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.97, 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.

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 eqüinos dos municípios de Três Rios, Vassouras e Valença, estado do Rio de Janeiro**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro. 40 p., 2004.

MADUREIRA, R.C; CORRÊA, F.N.; CUNHA, N.C.; GUEDES JÚNIOR, D.S.; FONSECA, A.H. Ocorrência de anticorpos homólogos anti-Borrelia burgdorferi em eqüinos 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 eqüinos do Estado do Pará e caracterização genotípica de isolados de Borrelia spp.** 2007. 37p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

MADUREIRA, R.C.; RANGEL, C.P.; BARBOSA NETO, J.D.; FONSECA, A.D. Sorologia para *Borrelia burgdorferi* em eqüinos 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. 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**, 79: 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.

MAGNARELLI, L.A.; MEEGAN, J.M.; ANDERSON, J.F.; CHAPPELL, W.A. Comparison of an indirect fluorescent-antibody test with an enzyme-linked immunosorbent assay for serological studies of Lyme disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v.20, p. 181-184, 1984.

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.

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.

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. 48 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Ciências Militares). Escola de Aperfeiçoamento de Oficiais, Rio de Janeiro, RJ, 2013.

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 Infeciosas**. 1. ed. Oxford: Art Médica, 2002. p. 179-188.

RAMAMOORTHY, N.; NARASIMHAN, S.; PAL, U.; BAO, F.; YANG, X.F.; FISH, D.; ANGUITA, J.; NORGARD, 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 coriaceae* 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, 2001.

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.

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., Tese. Faculdade de medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2009.

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, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

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.

## **CAPÍTULO II**

### **Aspectos epidemiológicos e soroprevalência para *Theileria equi* em equinos de uso militar do município de Resende, estado do Rio de Janeiro**

## RESUMO

A piroplasmose equina é uma doença causada por *Babesia caballi* e/ou *Theileria equi* de ampla distribuição, causando doença hiperaguda, aguda, subclínica ou crônica. Os prejuízos vão desde gastos com tratamento, passando por queda de desempenho, aborto, problemas reprodutivos, até surtos com alta mortalidade. O Brasil, com o terceiro maior rebanho de equídeos do mundo, tem o protozoário *T. equi* como um dos principais agentes transmitidos por carrapatos aos equídeos, agente este endêmico em todo território nacional. A theileriose equina causa sérios entraves à equideocultura no país, pois países livres restringem o trânsito de equinos, impedindo os animais de participarem de provas internacionais ou impossibilitando o comércio de animais soropositivos para o agente. A doença foi motivo de grande preocupação das autoridades sanitárias brasileiras por ocasião dos jogos panamericanos realizados em 2007, e também será nos grandes eventos equestres que ocorrerão no Brasil nas Olimpíadas de 2016. Ademais, alguns aspectos de sua epidemiologia, como o vetor responsável pela doença no país, ainda não foram totalmente elucidados. Desta forma, este estudo teve por objetivo realizar o diagnóstico sorológico e avaliar os fatores de risco associados à soropositividade para *T. equi* nos equinos de uso militar do rebanho da Academia Militar das Agulhas Negras, município de Resende, estado do Rio de Janeiro. Amostras de 174 equinos de uso militar foram testadas através do ensaio de adsorção imunoenzimática indireta (iELISA) utilizando antígeno bruto de *T. equi*. A variável dependente (sororeatividade) foi testada, através de análise bivariada, quanto à associação às variáveis independentes (gênero, idade, definição racial, grupo de manejo, tempo de criação na AMAN, sistema de criação, origem do equino, presença e grau de infestação por carrapatos). As variáveis que apresentaram associação na análise bivariada ( $p < 0,25$ ) foram incluídas no modelo de regressão logística para análise multivariada. Verificou-se que a soroprevalência para *T. equi* foi de 74,14%. A análise multivariada demonstrou que o tempo de criação na AMAN superior à 15 anos está associado à soropositividade para *T. equi* (OR: 5,70; IC: 1,23 - 22,1). Não houve associação entre a infestação por nenhuma das espécies de carrapatos, sugerindo que esta variável não foi a que melhor influenciou na epidemiologia da doença dentre as variáveis analisadas. A partir dos resultados obtidos pode-se inferir que a área é endêmica para a doença, com alta prevalência de portadores assintomáticos, estando em estabilidade enzoótica. Isto evoca cuidados e medidas preventivas na introdução de equinos, oriundos de áreas de instabilidade enzoótica ou indenes, no rebanho.

**Palavras-chave:** Theileriose, babesiose, ELISA.

## ABSTRACT

The equine piroplasmiasis or babesiosis is a disease caused by *Babesia caballi* and/or *Theileria equi*, with a wide distribution, causing hyperacute, acute, subclinical or chronic disease. Losses ranging from treatment costs, low performance, abortion, reproductive problems, until to outbreaks with high mortality. Brazil, with the third largest equine herd in the world, has *Theileria equi* as main agents transmitted by ticks to horses and is considered endemic in throughout national territory. The equine Theileriosis causes serious obstacles to creation of equines in the country, because free countries restrict the transit of horses, blocking the animals to participate in international events or hindering trade of seropositive animals for the agent. The disease was of great concern for the Brazilian health authorities during the Pan American Games held in 2007, and will also be in equestrian events that will occur in the country in the 2016 Olympic Games. Moreover, some aspects of its epidemiology, as the real vector of the disease in the country, are still not well elucidated. Thus, this study aimed to perform serological diagnosis and assess the risk factors associated with seropositivity for *T. equi* in horses of military use of the Military Academy of Agulhas Negras, located in Resende, Rio de Janeiro state. Samples of 174 horses for military use were tested by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using crude antigen of *T. equi*. The dependent variable (seroreactivity) was tested, through bivariate analysis, with the independent variables (gender, age, racial definition, group management, breeding time in AMAN, breeding system, origin of the horse, the presence and level of tick infestation). The variables that were associated in bivariate analysis ( $p < 0.25$ ) were included in the logistic regression model for multivariate analysis. It was found that the seroprevalence of *T. equi* was 74.14 %. Multivariate analysis showed that the time of breeding in AMAN higher than 15 years was associated with seropositivity for *T. equi* (OR: 5.70, CI: 1.23 - 22.1). There was no association between the infestation by any of the ticks' species with the seropositivity, suggesting that this variable was not the most influential in the epidemiology of the disease among the analyzed variables. From the obtained results it can be inferred that the area is endemic for the disease with a high prevalence of asymptomatic carriers, being in enzootic stability. This evokes care and preventive measures in the introduction of horses, coming from areas unaffected or of enzootic instability, in the herd.

**Keywords:** Theileriosis, babesiosis, ELISA.

# 1 INTRODUÇÃO

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). Assim, nosso país possui o terceiro maior rebanho equídeo do mundo.

O chamado Complexo do Agronegócio Cavalos, em nosso país, é responsável pela geração de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos, e movimenta cerca de R\$ 7,3 bilhões, somente com a produção de cavalos. A expansão da exportação de equinos vivos pelo Brasil cresceu 524% entre os anos de 1997 e 2009, 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).

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 destaca-se a *Theileriose equina*.

A Babesiose ou Piroplasmose equina é uma doença transmitida por carrapatos causada pelo hemoparasita *Theileria equi* (Laveran, 1901; Mehlhorn; Schein, 1998) e/ou *Babesia caballi* (Nuttall; Strickland, 1912). A doença pode ser aguda, subaguda ou crônica e tem sintomatologia caracterizada por perda de apetite, decréscimo na capacidade de trabalho, febre, que pode ser intermitente, hemólise intravascular, icterícia, anemia, hemoglobinúria, bilirrubinúria, esplenomegalia, depressão e pode levar animais a óbito (DE WALL, 1992).

Esta séria doença acomete, além de equídeos domésticos, também equídeos selvagens como as zebras e os cavalos Przewalski. Inclusive ela tem sido relatada como um óbice na preservação de equídeos selvagens, causando mortalidade em cavalos Przewalski reintroduzidos na natureza em seu habitat natural na Mongólia, comprometendo a viabilidade de programas de preservação desta espécie de equídeo ameaçada de extinção (RÜEGG et al., 2006).

Em equídeos domésticos tal doença toma relevância pois, além de causar doença com sintomatologia que vai desde queda de desempenho até óbitos, ainda é fator de restrição de trânsito de equídeos (SEVINC et al., 2008). Tal fato interfere diretamente no negócio equestre, ao comprometer o comércio e o trânsito internacional de equídeos, visto que países livres ou com programa de controle rígido da doença exigem sorologia negativa para a entrada de equídeos em seus territórios.

Recentemente, países considerados livres pela Organização Internacional de Epizootias (OIE), inclusive alguns que investiram milhões de dólares na erradicação desta hemoparasitose, tem relatado casos de sorologia positiva em seus rebanhos. Os Estados Unidos, maior rebanho equino do mundo, tem experimentado surtos da doença, sendo esta já considerada uma doença reemergente naquele país (UETI et al., 2012).

A epidemiologia da *Theileriose equina* no Brasil ainda tem lacunas a serem esclarecidas. Talvez a maior delas diga respeito ao real vetor da doença. Apesar de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) e *Dermacentor (Anocentor) nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae) serem os principais carrapatos que afetam equídeos em nosso país, nenhum deles se mostrou vetor competente em pesquisas realizadas até o momento (RIBEIRO et al., 2011; DENNING F., 1988, apud PFEIFER BARBOSA et al., 1995).

Algumas pesquisas sugerem que o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* possa ser um vetor da hemoparasitose (GUIMARÃES et al., 1997; GUIMARÃES et al., 1998; UETI et al.,

2005). Entretanto, por tratar-se de um carrapato monóxeno, seu real papel na epidemiologia da doença a campo permanece incerto e sua importância epidemiológica como vetor sob discussão, especialmente em áreas altamente endêmicas, visto que admite-se que não há transmissão transovariana em *T. equi* (KERBER et al., 2009). Ademais, os recentes surtos ocorridos nos Estados Unidos têm sido associados aos carrapatos do gênero *Amblyomma* (SCOLES et al., 2011).

Estudos de soroprevalência para *T. equi* demonstram resultados diversos de acordo com o rebanho, tipo de manejo, região fisiográfica e microclima (GOLYNSKI et al., 2008; KERBER et al., 2009; BALDANI et al., 2010; SANTOS et al., 2011). Uma série de fatores pode influenciar 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 experimentais e epidemiológicos são necessários para o esclarecimento dos vetores biológicos envolvidos na transmissão e manutenção de *T. equi* em no território brasileiro. Uma abordagem de análise multivariável pode auxiliar na identificação de fatores de risco envolvidos na ocorrência da doença, fornecendo evidências epidemiológicas para melhor entendimento de seu ciclo biológico distribuição geográfica e mecanismos de disseminação nos rebanhos equídeos de nosso país, direcionando medidas futuras de controle e profilaxia.

Assim, o objetivo deste estudo foi verificar a prevalência de animais sorologicamente positivos para *T. equi* em uma população de equinos de uso militar da Microrregião do Vale do Paraíba Fluminense, por meio da técnica de ensaio de imunoabsorção enzimática indireta (iELISA), além de identificar os fatores de risco associados com a soropositividade dos animais através de análise multivariada.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A Piroplasmose Equina

A piroplasmose ou babesiose equina é uma doença transmitida por carrapatos causada por parasitas intraeritrocitários *Theileria equi* (Laveran, 1901; Mehlhorn; Schein, 1998) e/ou *Babesia caballi* (Nuttal; Strickland, 1912) que acometem equídeos. A doença pode ser hiperaguda, aguda, subaguda ou crônica (DE WAAL et al., 1992) e a sintomatologia é caracterizada por perda de apetite, decréscimo na capacidade de trabalho (MACHADO et al., 2012), febre, 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 *Theileria equi*, a grande maioria dos animais tornam-se portadores assintomáticos, 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, podem manifestar queda de desempenho atlético (BOTTEON et al., 2005).

A *Theileria equi* é mundialmente distribuída, sendo 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 dos equinos para tal hemoparasita. Sendo assim, a doença, além de importância econômica, tem relevância quanto ao trânsito de animais (SCOLES et al., 2011).

Há registros da introdução da piroplasmose equina em países não endêmicos, como as notificações feitas 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 dos Estados Unidos serem considerados livres desde 1988, resultado de 12 milhões de dólares e 25 anos de campanha de erradicação, iniciada em 1962, o país tem sofrido surtos da doença desde 2008 nos estados da Califórnia, Colorado, Flórida, Geórgia, Oklahoma e Texas (UETI et al., 2012).

O surto no Texas provocou alarde, pois cavalos positivos de 16 Estados Americanos foram rastreados a 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). Com mais de 9,2 milhões de cavalos nos EUA, uma epidemia de Theileriose equina poderia provocar um dano financeiro na ordem de 39 bilhões de dólares na indústria equina (AMERICAN HORSE COUNCIL, 2013).

Assim, as movimentações de equinos durante leilões, exposições e operações militares podem contribuir para a disseminação da doença às áreas livres, que podem não estar livres dos carrapatos vetores (FRIEDHOFF et al., 1990). A movimentação de equinos portadores para áreas livres é preocupante, pois leva à introdução do parasita em área indene com possibilidade de tornar-se endêmica. Além disso, a introdução de equinos negativos em áreas endêmicas predispõe tais animais à infecção pelo agente e a ocorrência de doença clínica nestes animais.

Portanto, a Theileriose equina tem 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, principalmente com relação a eventos equestres de projeção mundial que ocorrerão no país nos próximos anos, a exemplo das Olimpíadas de 2016.

Além dos impactos econômicos causado pela restrição na 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).

## 2.2 Sistemática

Reino: Protista;

Sub-reino: Protozoa Goldfuss, 1818;

Filo: Apicomplexa Levine, 1970;

Classe: Sporozoea Leuckart, 1879;

Sub-classe: Piroplasmae Levine, 1961;

Ordem: Piroplasmida Wenyon, 1926;

Família: Theileriidae Du Toit, 1918;

Gênero: *Theileria* Bettencourt, 1907;

Espécie: *Theileria equi* (LAVERAN, 1901) Mehlhorn e Schein, 1998.

## 2.3 Histórico: da Descrição do *Piroplasma equi* à Reclassificação como *Theileria equi*

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 hemoglobinúria 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.

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. Estes autores nomearam tal agente etiológico como *Piroplasma equi*. O nome piroplasma advém do formato similar à pêra que tais protozoários adquirem no interior do eritrócito, após seu processo de multiplicação.

Posteriormente, Nutall e Strickland (1910) verificaram que as características morfológicas do *Piroplasma equi* diferiam de outras espécies deste gênero, e propuseram a nomenclatura de *Nuttalia equi* para tal agente. Futuramente, estudos de sistemática classificaram 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.

O principal achado em *Babesia equi*, que justificou tal questionamento sobre sua diferença em relação às demais espécies do gênero *Babesia*, foi o fato deste hemoparasito realizar esquizogonia em linfócitos (SCHEIN et al., 1981). Além disso, era comprovado que tal parasita realizava transmissão transtádial nos vetores, mas sua transmissão transovariana

era incerta (SIGRIST, 1983). Outra divergência foi a sugestão de que tal protozoário teria um metabolismo diferente de outros hematozoários do gênero *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, reclassificaram *Babesia equi* para *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).

## 2.4 Ciclo Biológico de *Theileria equi*

Ao contrário das babesias que, ao serem injetadas pelo carrapato no hospedeiro, invadem diretamente eritrócitos, os esporozoítos de *Theileria* inicialmente penetram em linfócitos, desenvolvendo-se em esquizontes (UILENBERG, 2006). Assim, originam macro e micro-esquizontes (esquizogonia) que originarão 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, que 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 contendo 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, dentre eles glândulas salivares e os ovários nas fêmeas. Desta maneira, ocorre a transmissão transovariana que garante que a infecção por *Babesia* sp. esteja na próxima geração do Ixodídeo. A esporogonia é um processo que ocorre de forma assexuada nas glândulas salivares, e culmina com a produção de milhares de esporozoítos que serão inoculados no próximo hospedeiro vertebrado via saliva (UILENBERG, 2006; O'DWYER, 2010).

Já no caso da *T. equi*, os zigotos móveis (oocinetos) formados nas células intestinais, não se multiplicam formando esporocinetos (vermículos), invadindo direto a hemolinfa. Em seguida, vão somente para as glândulas salivares, e não para diversos órgãos como é o caso do gênero *Babesia* não havendo portanto transmissão transovariana. Nas células da glândula salivar ocorre reprodução assexuada (esporogonia) gerando esporozoítos, que se mantêm nos diferentes estágios do carrapato vetor, garantido a transmissão transtestadial. Assim, quando o carrapato se fixa no hospedeiro vertebrado, ele injeta esporozoítos de *Theileria* neste através da saliva (UILENBERG, 2006).

## 2.5 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 *R. microplus*, através de evidências epidemiológicas relacionando a presença deste vetor com a infecção dos equinos (HEUCHERT et al., 1999; DE SOUZA et al., 2000; DOS SANTOS et al., 2011). Além disso, tal transmissão tem sido comprovada experimentalmente, indicando ser este um possível vetor (GUIMARÃES et al., 1997; GUIMARÃES et al., 1998; UETI et al., 2005).

O *A. cajennense* e *D. nitens* são os carrapatos que mais comumente parasitam os equinos, mas estudos experimentais tentando comprovar a transmissão de *T. equi* por tais carrapatos não tiveram sucesso em evidenciar tal fato, permanecendo incertos seus papéis como vetores (DENNING F., 1988, apud PFEIFER BARBOSA et al., 1995). Um 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).

Apesar do *R. microplus* ter evidências de ser um possível vetor, tem sido detectadas infecções em rebanhos equinos, aparentemente, sem contato com tal vetor (KERBER et al., 2009). Kerber et al. (2009) associou a presença da infestação por *A. cajennense* com a soropositividade dos equinos para *T. equi*.

Ademais, recentemente, foi relatado um surto de theileriose em equinos, iniciado no estado do Texas, que envolveu mais de 290 equinos, ocasionando incidência da doença em 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* epidemiologicamente relacionada a este carrapato (SCOLES et al., 2011; UETI et al., 2012). Um estudo epidemiológico de *T. equi* baseado em técnicas moleculares para detecção do hemoparasita também associou a presença de infestação de *A. cajennense* nos equinos com positividade nos equinos (PECKLE et al., 2013). Assim, ainda não estão bem elucidados os mecanismos e os vetores envolvidos na transmissão da *T. equi* e sua manutenção em rebanhos do continente americano.

Além da transmissão através de carrapatos, outras formas de transmissão da theileriose equina também têm sido observadas. A transmissão transplacentária, por exemplo, foi verificada em diversos estudos, onde observaram-se potros recém-natos positivos nascidos de éguas positivas (ALLSOPP et al., 2007; GEORGES et al., 2011; RONCATI, 2006; SANTOS et al., 2008). Possivelmente, *T. equi* infecta os potros pela passagem de eritrócitos infectados da mãe através da barreira placentária. Nem todo potro de égua positiva nasce infectado, 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 é a transmissão 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 babesiose equina, ocorrido em 2008, no estado da Flórida, Estados Unidos (GEORGES et al., 2011).

## 2.6 Epidemiologia

A *Theileria equi* tem distribuição mundial (DE WALL, 1992), sendo endêmica em muitas regiões tropicais, subtropicais e com dispersão que se prolonga até a região 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). Países considerados não endêmicos incluem os Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, países do Norte da Europa, Irlanda, Singapura, Japão, Nova Zelândia e Austrália (ROTHSCHILD, 2013). 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 que passaram por doença clínica recuperam-se e tornam-se portadores assintomáticos de *T. equi* por, provavelmente, toda sua vida (DE WALL, 1992; ZOBBA et al., 2008). No caso da *B. caballi*, os cavalos infectados podem, de maneira espontânea, debelarem a infecção após 12 a 42 meses do contato inicial. Os equinos cronicamente infectados por *T. equi* possuem um delicado equilíbrio entre a imunidade do hospedeiro e o parasita. Uma quebra nesta relação, advinda de imunossupressões geradas por estresses, exercícios e fadiga extremas, pode causar 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 em áreas não endêmicas ou consideradas livres da theileriose equina (ZOBBA et al., 2008).

Por ser transmitida principalmente por carrapatos, sua ocorrência e prevalência estão diretamente ligadas à presença e à distribuição geográfica dos 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 resultados discrepantes, visto que as doenças transmitidas por carrapatos tem uma rede epidemiológica complexa, envolvendo o hospedeiro vertebrado e o invertebrado num meio ambiente diverso e em constante mudança. Tal fato, além de tornar difícil o controle do artrópode vetor, aparentemente ainda tem facilitado a expansão destas doenças nos últimos anos (DANTAS-TORRES, 2012).

Na Mongólia, Rüegg et al. (2007) encontraram associação entre soropositividade para *T. equi* e a idade do equino. Também verificaram incremento não linear da prevalência de equinos soropositivos para *T. equi* com a idade, sugerindo infecção persistente da doença.

Na Itália, Moretti et al. (2010), encontraram maior prevalência (50,5%) para *T. equi* em regiões de planície do norte do país, enquanto Grandi et al. (2011) estudando equinos que habitavam terrenos montanhosos mais elevados do norte da Itália encontraram prevalência de 8,2%. Fato que sugeriu a influência da altitude e clima na distribuição dos vetores e prevalência da doença no país (GRANDI et al., 2011).

No Brasil, estudo conduzido na Região Serrana e Microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro, observou que o aumento da altitude diminuiu a probabilidade de infecção nos equinos, possivelmente pela influência climática no ciclo dos vetores (SANTOS et al., 2011). Também verificou associação entre a Microrregião de Itaguaí, altitudes menores que 500 m, animais nascidos no local e condições pobres de criação com soropositividade para *T. equi* (SANTOS et al., 2011).

No estado do Rio Grande do Sul tem sido verificado soroprevalências mais baixas. Golynski et al. (2008) encontraram prevalência de 31,6% para *T. equi* através de ELISA. Sugerindo que tal diferença se deva a influências climáticas que ocasionam menor dispersão de carrapatos vetores em tal região do país (GOLYNSKI et al., 2008).

Heuchert et al. (1999) verificaram que tipo de manejo em fazendas parece ser importante fator a influir na soroprevalência de *T. equi*, posto que encontraram baixas prevalências em fazendas de criação profissionais. Além disso, tal estudo encontrou correlação positiva entre a prevalência de *T. equi* e o contato dos equinos com bovinos.

Kerber et al. (2009), em estudo conduzido em 40 fazendas no estado de São Paulo, verificaram associação entre altos níveis de infestação por *A. cajennense* com a

soropositividade para *T. equi*, por RIFI e ELISA competitivo, em mais de 30% dos animais da fazenda. Tal fato também foi observado por Peckle et al. (2013) utilizando técnicas moleculares de diagnóstico. Tal estudo constatou associação entre a positividade dos equinos e a presença de infestação por carrapatos *A. cajennense*.

### 2.6.1 Estudos de prevalência de *Theileria equi* 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 *Theileria equi* e *Babesia caballi* na mortalidade de Cavalos Przewalski reintroduzidos na natureza, oriundos de regiões indenes de babesiose equina, verificou 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).

Em equinos da Turquia, uma pesquisa realizada com a utilização do ELISA competitivo revelou soroprevalência de 16,2%. Além disso, verificou soroprevalência significativamente maior em equinos que participam de circuitos de corridas, demonstrando a relevância da doença no trânsito de equinos em competições internacionais (SEVINC et al., 2008).

Em Omã Donnelly et al. (1988) verificaram alta prevalência de *T. equi*, através da RIFI, em pesquisas com intervalos de dois anos, sendo 94,6% a sororeatividade no primeiro ano e 97,7% no segundo.

No Sudão, um estudo sorológico baseado em ELISA avaliando a prevalência de *T. equi* em diferentes regiões e climas do país, concluiu que esta hemoparasitose é endêmica. O estudo encontrou prevalências 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 detectada 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, um 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 prevalência de 5,35% para *T. equi* (SOULE et al., 1990).

Na Suíça, em estudo sobre a soroprevalência da piroplasmose equina no rebanho do país, analisaram um total de 689 animais. Foi possível observar uma prevalência de 7,3% para os agentes da piroplasmose equina, sendo 50 animais (4,4%) positivos para *T. equi*, e trinta (1,5%) para *B. caballi*, além de trinta equinos (1,5%) positivos para ambas as espécies (SIGG et al., 2010).

Na Itália, 412 amostras de soros equinos do centro e norte do país foram testados pela RIFI, revelando que 68,4% dos equinos testados foram positivos para os agentes da piroplasmose equina, sendo que 50,5% dos equinos foram positivos para *T. equi*. Ainda na Itália, Moretti et al. (2010) observaram 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. Grandi et al. (2011), no norte da Itália, observaram prevalência de 8,2% de animais positivos pela RIFI para *T. equi*.

Na República da Coreia, em 184 amostras de soro de equinos observou-se uma prevalência de 1,1% para *T. equi*, através de ELISA competitivo (SEO et al., 2011).

No Japão, em um estudo sorológico pelo ELISA realizado com 2.019 amostras coletadas provenientes de todas as áreas do país detectou-se 2,2% dos animais soropositivos para *T. equi*. Tal estudo sugeriu a existência de babesiose equina no Japão, visto que o país tem carrapatos que são vetores competentes dos dois hemoparasitas (IKADAI et al., 2002).

Na China, 70 amostras de soro equino, oriundos da Província de Xinjiang, foram testadas pelo ELISA obtendo-se uma sororeatividade de 40% das amostras para *T. equi*, o que demonstra que tal hemoparasita está distribuído amplamente nesta região (XUAN et al., 2002).

No Estado de Lara, região centro-ocidental da Venezuela, foi observado 70,6% de soroprevalência (n=254/360) para *B. caballi*, 50,3% (n=181/360) para *T. equi*, e 35,56% (n=128/360) para ambos parasitas, sendo esta uma região enzoótica para a piroplasmose equina (MUJICA et al., 2011).

Em Trinidad, um estudo baseado em RIFI observou soropositividade para piroplasmose equina em 82,8% dos animais testados, sendo 33,3% para *T. equi*, 68,8% para *B. caballi*, e 19,4% soropositivos para ambos parasitas (ASGARALI et al., 2007).

Na Colômbia, na Província de Córdoba, foi observada prevalência de 94% para *T. equi* em 83 dos equídeos testados pela FC (TENTER et al., 1988).

No Chile, um estudo que avaliou 912 amostras de soros de cavalos de corrida da Província de Santiago, através do Teste de Reação de Fixação do Complemento (RFC), obteve soropositividade em 48 equinos, resultando em uma prevalência de 5,3% (URCELAY et al., 1973).

## 2.6.2 Estudos de prevalência para *Theileria equi* 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 varia de acordo com a localização geográfica, clima e manejo dos equídeos, visto que tais fatores influem no ciclo e distribuição dos vetores.

De um modo geral, é possível observar um declínio da soroprevalência de *B. caballi* de norte para o sul do Brasil, 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. Já a *T. equi*, que tem sua transmissão associada ao carrapato *R. microplus*, tem soroprevalência de distribuição mais errática em todos o país (HEUCHERT et al., 1999).

Em um estudo realizado por Santos et al. (2011) observaram uma soroprevalência para *T. equi* significativamente maior na microrregião de Itaguaí (85,43%) em relação à microrregião 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).

Heim et al. (2007) coletaram 487 amostras de soro de equinos de diferentes origens em um abatedouro localizado em Araguari, estado de Minas Gerais, e verificou sororeatividade de 91% nas amostras para *T. equi* através da RIFI. Os equinos amostrados originavam-se de diferentes municípios dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Bahia, demonstrando a grande dispersão do agente no Brasil.

Estudo de soroprevalência no estado de São Paulo demonstraram taxas de 49,2% para *T. equi* em éguas, e 36% para potros aos 10 meses de idade (HEUCHERT et al., 1999). Na cidade de Jaboticabal, estado de São Paulo, um estudo com 170 amostras verificou 100% de sororeatividade através da RIFI para *T. equi*, com títulos variando de 1:80 à 1:5120, indicando que esta hemoparasitose está amplamente distribuída na região (BALDANI et al., 2010).

Kerber et al. (2009), após analisarem 582 amostras de soro de equinos provenientes de 40 diferentes fazendas de criação do estado de São Paulo, observaram soropositividade de 26,6% para *T. equi* pelo método de ELISA competitivo.

Em uma pesquisa de soroprevalência, baseada na Reação de Fixação do Complemento (RFC), conduzida em 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, foi demonstrada 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 uma média de soroprevalência de 21% para *T. equi*, baseado na RFC (DA COSTA PEREIRA et al., 2005). No município de Nova Friburgo, baseado em RFC, foi encontrada prevalência média de 5,5%, variando de zero a 20% nos diferentes estabelecimentos equestres (DA COSTA PEREIRA et al., 2007).

Em um estudo conduzido em 180 animais PSI do Jockey Clube de São Paulo relatou soroprevalência de 6,66% para *T. equi*, 22,3% para *B. caballi*, e 6,66% para ambos os hemoparasitos, totalizando 35,5% de soroprevalência para a piroplasmose equina. Esse estudo observou que a maioria dos animais positivos tinha entre dois e três anos de idade e tinha chegado recentemente no Jockey Clube (PIOTTO, 2009).

Em Santa Catarina, na região do planalto catarinense, foi observada soroprevalência de 50,38% para *T. equi*. Além disso, o único Ixodídeo detectado parasitando os equinos naquela região foi o *R. microplus*, sugerindo que tal carrapato está envolvido na epidemiologia e transmissão da theileriose equina na região (DE SOUZA et al., 2000).

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

Conforme exposto, tanto no mundo como em nosso país, a soroprevalência para *T. equi* apresenta prevalência bastante variável. Diversos fatores podem influenciar na epidemiologia desta hemoparasitose, dentre eles a presença de carrapatos, grau de infestação e dispersão geográfica dos vetores, clima, altitude, condições de manejo e tipo de criação, entre outros. Além disso, os diferentes testes utilizados nos estudos soroepidemiológicos (RFC, RIFI e ELISA) também podem influenciar nas diferentes soroprevalências encontradas. Assim, é relevante o estudo dos fatores que podem estar associados à sororeatividade de *T. equi* para uma melhor compreensão de seu comportamento, distribuição geográfica e mecanismos de disseminação nos rebanhos equídeos do Brasil, no intuito de direcionar esforços para medidas racionais e efetivas de controle.

## **2.7 Manifestações Clínicas, Laboratoriais e Anatomopatológicas**

As manifestações clínicas em animais afetados por *T. equi* podem variar de acordo com a cepa do hemoparasita e a susceptibilidade do animal. Além disso, a sintomatologia pode ser inespecífica dificultando o diagnóstico clínico. Deve ser levado em consideração o histórico do equino, 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). A doença pode ser hiperaguda, aguda, subaguda ou crônica. Em geral é caracterizada por febre de natureza intermitente, anemia, icterícia, hepato e esplenomegalia. Bilirubinúria e hemoglobinúria podem estar presentes durante os estágios mais tardios da doença. A infecção intrauterina de fetos é uma séria complicação causada pela *T. equi*, podendo levar a abortos (DE WALL, 1992).

A maioria dos animais soropositivos são portadores assintomáticos e a baixa parasitemia faz com que não manifestem sintomas evidentes (ROTHSCHILD, 2013). No entanto, tais equinos quando submetidos a treinamentos atléticos ou trabalhos pesados podem demonstrar queda de desempenho e baixo rendimento (BOTTEON et al., 2005; DA COSTA PEREIRA et al., 2007).

A doença na forma hiperaguda pode ocorrer 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 como exercícios físicos intensos (HAILAT et al., 1997).

Durante a infecção hiperaguda de *T. equi* há intensa replicação dos merozoítos e lise dos eritrócitos, o que pode levar os animais à óbito por anemia. A letalidade da doença em equinos adultos de regiões indenes, sem imunidade, introduzidos em regiões endêmicas pode chegar a mais de 50% (ROTHSCHILD, 2013).

Potros que nascem infectados podem apresentar anemia, icterícia, febre, petéquias nas mucosas e hemoglobinúria, além de letargia que pode evoluir para incapacidade em ficar de pé e mamar. Alguns potros podem parecer normais ao nascer e desenvolverem doença após 2 a 3 dias (DE WALL, 1992). Em um relato de caso realizado por Georges et al. (2011) de potro recém-nato e infectado por *T. equi* observou-se como principais sinais clínicos uma severa anemia e icterícia, sinais estes que podem ser confundidos com isoeritrólise em recém-nascidos. Laboratorialmente os mesmos autores observaram hemoglobinúria, hiperbilirrubinemia, bilirrubinúria, baixa contagem de eritrócitos e hematócrito, trombocitopenia, linfopenia e alta parasitemia ao exame de esfregaço sanguíneo (63% das hemácias parasitadas).

A doença aguda é caracterizada nos animais 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, além de anemia e, em casos severos, hemoglobinúria e bilirrubinúria, podendo evoluir ao óbito (DE WALL, 1992; ROTHSCHILD, 2013). Pneumonia pode ser uma complicação advinda do edema e inflamação pulmonar. Envolvimento do trato digestivo pode ocorrer em casos terminais, com sinais de cólica, devido à deposição de bilirrubina nas serosas e peritônio, podendo haver 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 associados à 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 à amarela brilhante, sendo possível observar petéquias ou equimoses em alguns casos. Casos negligenciados tornam-se severamente anêmicos e os animais podem vir a 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 histórico de sinais clínicos muito inespecíficos como inapetência, baixo desempenho atlético, perda de peso, baixo escore corporal, sendo que a anemia é branda (DE WALL, 1992). Garanhões podem ter perda parcial ou completa da fertilidade, e éguas prenhes podem 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).

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).

Rubino et al. (2006) avaliou parâmetros de hematológicos e bioquímicos em um rebanho equino, comparando três grupos: animais sem sinais clínicos e sem detecção de *T. equi* ou *B. caballi* em seus esfregaços sanguíneos; animais sem sinais clínicos, mas com detecção de hemoparasitas em esfregaço sanguíneo; e animais com sintomatologia clínica e esfregaço sanguíneo positivo para um dos agentes da piroplasmose equina. Estes autores observaram diferença estatística significativa em diversos parâmetros, havendo uma tendência decrescente na contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina, hematócrito, AST, GGT, uréia sanguínea, cálcio, magnésio e albumina, em animais considerados positivos em lâmina que apresentaram sinais clínicos. Não houve alteração significativa na contagem total de leucócitos entre os grupos positivo e negativo, entretanto, em animais infectados e sem sinais clínicos houve baixa contagem de neutrófilos e alta na contagem de linfócitos, quando comparados à animais não infectados e também à animais que apresentaram sinais clínicos.

Como achados de necropsia observa-se carcaças pálidas e amarelas (anemia e icterícia), edema de subcutâneo e das subserosas, 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, congestão e edema de pulmões (DE WALL, 1992). Enterite catarral tem sido relatada em alguns casos (ROTHSCHILD, 2013).

## **2.8 Diagnóstico**

### **2.8.1 Parasitológico**

Detecção de *T. equi* através da visualização dos hemoparasitas em esfregaços sanguíneos é uma das formas mais específicas e práticas de diagnóstico. Os hemoparasitas podem ser demonstrados através de coloração dos esfregaços sanguíneos, preferencialmente, com solução de Giemsa a 10%. Casos agudos de *T. equi* podem apresentar mais de 20% das hemácias parasitadas (DE WALL, 1992). Os trofozoítos de *T. equi* podem assumir uma variedade de formas (oval, arredondado, elíptico) e serem maiores que 3 µm de diâmetro. Já os merozoítos são piriformes, com cerca de 1,5 µm de comprimento, podendo aparecer em tetrades, apresentando-se no típico formato de “cruz de malta” no interior do eritrócito (DE WALL, 1992). O diagnóstico do hemoparasita nos esfregaços é possível principalmente na fase aguda da doença, quando há alta proporção de hemácias parasitadas. Animais portadores assintomático possuem baixo número de hemoparasitas circulantes, ocasionando decréscimo na sensibilidade do exame de esfregaço (ROTHSCHILD, 2013).

### **2.8.2 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, foi aceita como teste oficial pela OIE, passando a ser utilizado em todo o mundo. Entretanto, ao longo dos anos comprovou-se que a RFC não detectava infecções latentes e casos crônicos, podendo liberar resultados falso-positivos assim como reações cruzadas, além de diversos outros problemas técnicos, não podendo ser considerado o teste “padrão ouro” para o diagnóstico da piroplasmose equina (BRÜNING, 1996).

O teste “padrão ouro” para o diagnóstico da piroplasmose equina 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; 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 (BRUNING, 1996). A RIFI possui alta sensibilidade e especificidade, mas não pode ser considerada econômica como teste de rotina. O mesmo se aplica ao *Western blotting*. O ELISA é uma técnica alternativa, tornando-se o “padrão ouro” (BRUNING, 1996).

Nos Estados Unidos foi desenvolvido um ELISA competitivo utilizando-se o EMA-1 e anticorpos monoclonais específicos. EMA-1 é uma proteína de superfície do estágio eritrocitário da *T. equi* que possui um epítipo imunodominante e conservado em todo o mundo. Tal teste foi superior à RFC ao detectar infecções latentes não detectadas por este último. Em 2004, a OIE aprovou o teste como “padrão ouro”, para *T. equi* e *B. caballi*, sendo este recomendado para o trânsito internacional de equinos. Tal teste também regula a entrada de equinos nos Estados Unidos (ROTHSCHILD, 2013). Atualmente a OIE recomenda, como testes oficiais para o 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 a RIFI e o ELISA detectaram soropositividade em 76% dos equinos testados, enquanto a RFC detectou nas mesmas amostras somente 61%. Isso demonstra que haviam infecções latentes não detectadas pelo RFC, gerando falsos negativos. Quando o ELISA foi comparado à RIFI, foi possível observar uma concordância de 83,5%, sugerindo que ambos os testes podem ser indicados para a realização de estudos soroepidemiológicos. Os resultados obtidos pela RFC demonstraram baixa sensibilidade em relação à RIFI e ao ELISA (SANTOS et al. 2009).

Santos et al. (2009) ainda salienta que as desvantagens da RIFI em relação ao ELISA é o fato do antígeno ser preparado a partir de esfregaços sanguíneos com percentual variado de eritrócitos infectados. Ademais, a produção e a disponibilidade desse antígeno em particular constitui um dos maiores entraves desse método de diagnóstico. Ainda, pode-se dizer que a RIFI é um teste subjetivo em que a experiência do observador é necessária para diferenciar reações fracamente positivas das 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 epítopos 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 ser mais expedito, ao processar um grande número de amostras, e ter uma leitura automatizada 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. Obtiveram excelentes resultados, com 100% de sensibilidade e especificidade. Assim, o ELISA é um teste passível de utilização no diagnóstico sorológico desta hemoparasitose, bem como um teste apropriado à estudos epidemiológicos em áreas endêmicas.

### 2.8.3 Molecular

A detecção do DNA de *T. equi* utilizando-se da reação em cadeia da polimerase (PCR) é o teste mais sensível, sendo este ideal para a detecção de equinos portadores assintomáticos (RAMPERSAD et al., 2003). A ferramenta molecular da PCR em tempo real (qPCR), possui

alta especificidade e sensibilidade, e também tem sido satisfatoriamente utilizada em estudos epidemiológicos (PECKLE et al., 2013). No entanto, apesar de serem mais precisas, as técnicas moleculares, em geral são mais onerosas e trabalhosas comparadas às técnicas sorológicas.

## 2.9 Tratamento

Drogas normalmente efetivas para o tratamento de animais acometidos por parasitos do gênero *Babesia*, como o Diaminazeno, administrado a 11 mg/kg por dois dias consecutivos, não tem eficácia na eliminação de *T. 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* e, apesar do equino apresentar melhora clínica, permanece infectado para toda sua vida (BRUNING, 1996).

Apesar disto, Dipropionato de Imidocarb na dose de 4,0 mg/kg, intramuscular, com 72 horas de intervalo em um 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 um 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 linfócitos, 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).

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 perigoso, principalmente em animais de alto valor zootécnico. Além disso, 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, fluidoterapia intra-venosa, infusão de glicose (DE WALL, 1992) e uso de antiinflamatórios não esteroidais (ROTHSCHILD, 2013).

## 2.10 Prevenção e Métodos de Controle

O controle da Theileriose equina deve incluir um controle de carrapatos efetivo, 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 hemoparasito. Além disso, devem ser tomadas medidas preventivas relacionadas ao trânsito de animais (monitoramento sorológico), à introdução de animais (evitar introduzir animais positivos no rebanho), vigilância acarológica e quarentena.

As formas de prevenir a ocorrência de doenças variam de acordo com o status da hemoparasitose na área em questão. Em áreas livres da doença, a entrada de equinos e carrapatos deve ser monitorada. Estratégias de premunicação 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 sistemas de criação extensivos localizados 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, levando à 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, e o tratamento só deve ser feito em animais com doença moderada ou severa. No entanto, tem sido 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

A área onde foi realizado tal estudo encontra-se descrita no item 3.1 do primeiro capítulo.

#### 3.2 Inquérito Epidemiológico nos equinos de uso militar

##### 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.

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

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

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

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 sob estudo, que era de 174 equinos de uso militar. Sendo assim, todos os equinos de uso militar presentes no rebanho da AMAN 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 fevereiro de 2013 a março de 2013.

##### 3.2.2 Caracterização do rebanho de equinos de uso militar da AMAN

A caracterização do rebanho encontra-se descrita no item 3.2.2 do primeiro capítulo.

##### 3.2.3 Ficha de exame físico e informação

Cada animal teve seus dados de registrados em uma Ficha Individual de Exame Físico e Informação de Equino (Anexo 1), visando recolher informações inerentes aos equinos (idade, sexo, cor, raça), quanto à infestação por carrapatos (número 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 na AMAN, 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 na AMAN). Todas as informações adquiridas a partir de tais fichas foram tabuladas numa planilha do Microsoft Excell a fim de avaliar possíveis fatores associados à sororreatividade dos equinos à *T. equi*.

### **3.2.4 Coleta de carrapatos e de amostras de sangue**

Os procedimentos de coleta de carrapatos e amostras de sangue estão descritos no item 3.2.4 do primeiro capítulo.

## **3.3 Teste Sorológico**

### **3.3.1 Obtenção do antígeno**

O antígeno utilizado no presente estudo é um antígeno parcialmente purificado de *Theileria equi*, que foi gentilmente cedido pela Professora Rosângela Zacarias Machado, Departamento de Patologia Animal UNESP/FCAV, Jaboticabal. Tal antígeno foi obtido conforme descrito por Baldani et al. (2004).

### **3.3.2 Obtenção do controle positivo**

Os soros controles positivos foram obtidos do banco de soros do Laboratório de Hemoparasitoses da Estação Experimental W.O. Neitz. Tais amostras são provenientes de animais esplenectomizados e cronicamente infectados por *T. equi*, além disso, foram comprovadamente positivas a RIFI e PCR para *T. equi*.

### **3.3.3 Obtenção dos controles negativos**

Os soros controles negativos foram obtidos do banco de soros do Laboratório de Hemoparasitoses da Estação Experimental W.O. Neitz. Tais amostras foram comprovadamente negativas na RIFI e PCR para *Theileria equi*, sendo provenientes de animais da região serrana do Rio de Janeiro (Petrópolis e Teresópolis), com excelente controle sanitário nas propriedades.

### **3.3.4 Ensaio de imunoadsorção enzimática indireta (iELISA) para *Theileria equi***

As amostras coletadas foram analisadas através do iELISA, conforme preconizado por Baldani et al. (2004) e modificado conforme comunicação pessoal de Machado (2014). Realizou-se o ensaio para detectar anticorpos IgG anti - *Theileria equi*. O antígeno parcialmente purificado de *T. equi* foi utilizado na concentração de 10 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 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.

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 (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) 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 (MACHADO et al., 1997). O valor do ponto de corte “Cut off” foi calculado como sendo duas vezes e meia o valor da DO média dos controles negativos, resultando num valor de 0,278, conforme descrito por Baldani et al., (2004). Foi considerado positivo todas as amostras com valor S/P acima do valor de “Cut off”.

### 3.4 Análise estatística

Para a descrição da prevalência de animais positivos no rebanho, assim como nos respectivos grupos (Grupo 1, 2, 3 e 4), foi calculada a taxa de prevalência dividindo o número de equinos positivos no rebanho, ou no grupo, pelo efetivo do rebanho, ou grupo em questão, multiplicando-se pela constante (100), conforme Pereira (2012).

Para a comparação da prevalência de animais positivos entre grupos utilizou-se o teste de comparação de proporções, em nível de significância de 5 %.

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 *T. equi* ao iELISA, 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. Para as variáveis com significância foram calculadas as *Odds Ratio* (OR) e os respectivos intervalos de confiança (IC). Todas as análises estatísticas foram realizadas através do programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2010).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Inquérito Sorológico para *Theileria equi*

A partir das 174 amostras submetidas ao iELISA, foram detectados 129 (prevalência de 74,14%) animais sororreagentes para *Theileria equi*. Destes, 27 animais pertenciam ao Grupo 1, 29 animais ao Grupo 2, 41 animais ao Grupo 3, e 30 animais ao Grupo 4. Os resultados de soropositividade e respectivas prevalências dos grupos e rebanho estão expressos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Resultados de sororreatividade ao iELISA indireto para *Theileria equi*, respectivas prevalências nos grupos de equinos, e resultado do teste de comparação de proporções.

	iELISA		Prevalência	Teste de comparação de proporções
	Positivos	Negativos		<i>p</i> -valor
Grupo 1	27	10	72,97%	0,59
Grupo 2	29	11	72,50%	
Grupo 3	41	19	68,33%	
Grupo 4	30	7	81,08%	

Grupo 1: equinos da Sec Equi, estabulados no pavilhão Odim (37 equinos); Grupo 2: equinos da Sec Equi, semi-estabulados do pavilhão Box (40 equinos); Grupo 3: equinos da Sec Equi, semi-estabulados do pavilhão Geral (60 equinos); Grupo 4: equinos semi-estabulados do C Cav (37 equinos).

### 4.2 Fatores Associados aos Equinos Sororreagentes à *Theileria equi*

Na Tabela 2, observa-se a análise bivariada e multivariada dos fatores associados à soropositividade dos equinos frente à detecção de anticorpos anti-*T. equi* através do iELISA indireto. Dentre todas as variáveis independentes, definição racial, idade, grupo de manejo, sistema de criação, origem dos equinos, infestação por *D. nitens* e infestação por *A. cajennese* não apresentaram associação estatística ( $p > 0,25$ ) a partir da análise bivariada (Tabela 2). As variáveis gênero, tempo de criação na AMAN, presença de infestação por carrapatos e grau de infestação por carrapatos apresentaram significância na análise bivariada ( $p < 0,25$ ) e, assim, foram incluídas na análise multivariada. De todas estas variáveis, quando submetidas à regressão logística, apenas o tempo de criação na AMAN foi significativamente associado à soropositividade nos equinos.

**Tabela 2.** Análise bivariada e multivariada da frequência de equinos soropositivos através do iELISA para *T. 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 do município de Resende – RJ.

Características dos animais e manejo	N	(%)	Bivariada		Multivariada		
			$\chi^2$	P	P	OR	IC 95%
<b>Gênero</b>							
Fêmea	77	77,9	1,70	0,25	0,36	-	(0,68 - 2,85)
Macho	97	69,1				*	-
<b>Idade</b>							
≤ 6 anos	10	70	3,45	0,33	-	-	-
> 6 e ≤ 10 anos	62	71			-	-	-
> 10 e ≤ 20 anos	87	71,3			-	-	-
> 20 anos	15	93,3			-	-	-
<b>Definição racial</b>							
Com raça	42	71,4	0,07	0,95	-	-	-
Sem raça definida	132	73,5			-	-	-
<b>Grupo de manejo</b>							
Grupo 1	37	73	1,89	0,59	-	-	-
Grupo 2	40	72,5			-	-	-
Grupo 3	60	68,3			-	-	-
Grupo 4	37	81,1			-	-	-
<b>Tempo de criação na AMAN</b>							
≤ 5 anos	82	65,9	21,71	0,00	-	*	-
> 5 e ≤ 15 anos	64	73,4			0,48	-	(0,61 - 2,77)
> 15 anos	28	92,9			0,02	5,79	(1,23 - 27,1)
<b>Emprego do equino</b>							
Esporte	42	73,8	0,02	0,95	-	-	-
Instrução	132	72,7			-	-	-
<b>Sistema de criação</b>							
Semi-estabulado	134	73,1	0,006	0,90	-	-	-
Estabulado	40	72,5			-	-	-
<b>Origem dos equinos</b>							
Coudelaria do Rincão	90	80	3,79	0,31	-	-	-
Rio Grande do Sul	61	62,3			-	-	-
Desconhecida	23	73,9			-	-	-
<b>Infestação por <i>Dermacentor</i></b>							
Não	105	71,4	0,33	0,69	-	-	-
Sim	69	75,4			-	-	-
<b>Infestação por <i>Amblyomma</i></b>							
Não	67	70,1	0,44	0,62	-	-	-
Sim	107	74,8			-	-	-
<b>Grau de infestação por carrapatos</b>							
Ausente/leve	140	70,7	1,18	0,24	-	*	-
Moderado/alta	34	82,4			0,51	-	(0,50 - 3,96)
<b>Infestação por carrapatos</b>							
Não	50	66	1,74	0,25	-	*	-
Sim	124	75,8			0,84	-	(0,49 - 2,38)

N: Número de amostras de animais;  $\chi^2$ : Valor do Qui-quadrado; \*\*Teste Exato de Fisher; P: p-valor; OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de confiança. \*Categoria de referência.

## 5 DISCUSSÃO

A soroprevalência encontrada no presente estudo corrobora a enzootia de *T. equi* na região, observada por Henriques (2006), de forma similar ao observado em outras regiões do estado do Rio de Janeiro (PFEIFER BARBOSA et al., 1995; SANTOS et al., 2011, PECKLE et al., 2013).

A despeito da alta prevalência, nenhum animal do rebanho apresentava sintomatologia clínica no período de coleta das amostras, corroborando a rara ocorrência de manifestações clínicas e surtos em áreas enzoóticas relatadas por De Wall (1992) e Heucheter et al. (1999). Demonstrando que, em regiões enzoóticas, a maioria dos animais recuperam-se da doença e tornam-se portadores e carreadores assintomáticos (ROTHSCHILD, 2013). Desta forma, conclui-se que o rebanho está em estabilidade enzoótica (MAHONEY; ROSS, 1972).

Desta forma, por ser região endêmica com a presença de muitos animais portadores assintomáticos, há que se tomar medidas preventivas em equinos, oriundos de regiões não enzoóticas, que adentram ao plantel da AMAN, evitando a ocorrência de doença clínica conforme preconiza De Wall (1992). Tal fato é relevante, pois os equinos de uso militar são oriundos, em sua maioria, da Coudelaria do Rincão, centro de reprodução equina do Exército Brasileiro localizado em São Borja, Rio Grande do Sul, estado de baixa prevalência para *T. equi* e considerado de instabilidade enzoótica para a hemoparasitose (GOLINSKY et al., 2008). Assim, tais animais que adentram ao rebanho da AMAN, oriundos desta região, estão predispostos à manifestações clínicas agudas da doença, e até mesmo a óbitos (DE WALL, 1992).

O exame de ELISA indireto, baseado em antígeno parcialmente purificado de *T. equi*, mostrou-se eficiente na varredura epidemiológica do rebanho, identificando portadores assintomáticos, corroborando o observado por Baldani et al. (2004) na microrregião de Jaboticabal, estado de São Paulo.

Neste estudo transversal as infestações por *Amblyomma* ou por *Dermacentor*, assim como o grau de infestação por carrapatos e a presença de infestação por carrapatos, foram variáveis que não demonstraram associação com a soropositividade dos equinos. O carrapato *D. nitens* é vetor competente da *B. caballi* (MUJICA, 2002; ROBY; ANTHONY, 1963), mas não da *T. equi* (DENNING F., 1988, apud PFEIFER BARBOSA et al., 1995). Pesquisas indicam uma associação entre a infestação por *A. cajennense* e positividade para *T. equi* em exames sorológicos (KERBER et al, 2009) e moleculares (PECKLE et al., 2013). Houve evidências epidemiológica de tal associação nos surtos recentes nos Estados Unidos (SCOLES et al., 2011).

Entretanto, o presente estudo não verificou associação entre as infestações por carrapatos, por *A. cajennense* ou por *D. nitens* (grau de infestação ou presença de infestação), e a soropositividade para *T. equi* nos animais, indo de encontro ao observado por Pfeifer Barbosa et al. (1995). Tal pesquisa, analisando as glândulas salivares de carrapatos *A. cajennense*, *R. microplus* e *D. nitens*, coletados de rebanhos equinos de regiões endêmicas do estado do Rio de Janeiro com soroprevalência para *T. equi* entre 90,6% a 100%, não identificou nenhum carrapato infectado por *T. equi*, e sugeriu que estes não estivessem envolvidos na epidemiologia da doença. Além disso, Ribeiro et al. (2011) que verificaram que ninfas de *A. cajennense* falharam em tornarem-se infectadas por *T. equi* após alimentação em animais cronicamente infectados, sugeriram que tal carrapato possa não ser um vetor competente para esta hemoparasitose.

Apesar dos equinos do Grupo 4 serem os mais intensamente infestados por carrapatos do gênero *Amblyomma*, com mais de 83,8% dos equinos infestados, e também apresentarem a

maior prevalência para *T. equi* entre os grupos (com 81% dos animais positivos), tal fato provavelmente está ligado ao tempo em que os equinos deste grupo estão na propriedade, visto tratar-se do grupo de equinos que há mais tempo encontra-se na AMAN. A positividade dos animais em relação ao fator “tempo na propriedade” pode estar relacionado ao maior período que estes equinos apresentaram de exposição aos possíveis carrapatos vetores e ao agente etiológico.

A transmissão iatrogênica, através de uso de seringas e agulhas contaminadas é improvável, visto que todos os procedimentos invasivos nos equinos são à cargo dos médicos veterinários da Divisão de Clínica e Cirurgia do Hospital Veterinário da AMAN, não sendo permitido a reutilização de materiais contaminados conforme comunicação pessoal de Campos (2013).

O controle estratégico de carrapatos adotado na AMAN (banhos à base de cipermetrina dados semanalmente, de abril a outubro, e mensalmente, de novembro a março), desde o ano de 2005, causou a diminuição na incidência de casos clínicos de babesiose equina, transmitida por *D. nitens* e causada por *B. caballi*, no rebanho (CAMPOS et al., 2013). No entanto, tal controle, que é voltado especificamente para carrapatos do gênero *Amblyomma* (LABRUNA et al., 2004), aparentemente não impactou drasticamente a soroprevalência para *T. equi* no rebanho, comparando-se a soroprevalência obtida por Henriques (2006), de 85,96% através de RIFI, à obtida neste estudo, que foi de 74,14%.

A população de carrapatos *Amblyomma*, aparenta ter sido impactada por tal controle estratégico realizado há mais de oito anos ininterruptamente, conforme comunicação pessoal de Campos (2013). Considerando-se somente a espécie *A. cajennense*, a média de contagem por equino no rebanho foi de 3,2 carrapatos por equino. Tal contagem, realizada no mês de fevereiro de 2013, é baixa comparada à encontrada em animais criados à pasto sem controle estratégico de carrapatos. Labruna et al. (2004), na mesma época do ano em que foi realizado este estudo, encontrou uma contagem média que variou de 560,7 a 763,6 carrapatos *A. cajennense* por equino. Ressalta-se que janeiro e fevereiro são os meses de pico de populações de fases adultas destes carrapatos na região sudeste do Brasil (OLIVEIRA et al., 2000; LABRUNA et al., 2004). Assim, o controle estratégico de carrapatos *Amblyomma* realizado na AMAN impactou a população de carrapatos, mas não a soroprevalência de *T. equi* no rebanho.

Pesquisas também tem evidenciado o possível papel do carrapato *R. microplus* como vetor competente para *T. equi* (GUIMARÃES et al., 1997; GUIMARÃES et al., 1998; UETI et al., 2005), havendo também evidência epidemiológica pela ocorrência de *T. equi* em rebanho parasitado somente por *R. microplus* (DE SOUZA et al., 2000), assim como associação entre o contato de equinos com pecuária, com presença de *R. microplus*, e a soropositividade para *T. equi* nos animais (HEUCHETER et al., 1999). Entretanto, no rebanho da AMAN é muito pouco provável que o *R. microplus* desempenhe papel como vetor na manutenção da enzootia de *T. equi*, pois os equinos deste local são criados sem contato com bovinos. Ademais, não foi verificado parasitismo por *R. microplus* em nenhum equino do rebanho, sendo *A. cajennense* e *D. nitens* as duas únicas espécies identificadas realizando parasitismo nos animais.

Todos os equinos positivos para *T. equi* no presente estudo, ao momento da coleta, apresentavam-se clinicamente hígidos, sugerindo tratar-se de infecções subclínicas / portadores assintomáticos que se infectaram há tempos e recuperaram-se da doença, sendo o rebanho considerado em estabilidade enzoótica. Desta forma, por se tratar de estudo transversal, e considerando-se que a *T. equi* persiste ao longo da vida do equino infectado, (DE WALL, 1992; RÜEGG et al., 2007), é possível que a inexistência de associação entre a infestação por carrapatos tenha sido ocasionada pelo descompasso temporal entre a infestação

de carrapatos verificada no momento da coleta e a infestação de carrapatos que ocorreu próximo à época da primo-infecção dos equinos. Desta forma, tal resultado não refuta a possibilidade dos carrapatos estarem envolvidos na epidemiologia da theileriose equina no rebanho, sendo necessários novos estudos, preferencialmente longitudinais, para uma melhor avaliação do potencial destes como vetores da doença.

Das variáveis que apresentaram significância na análise bivariada (gênero, tempo de criação na AMAN, presença de infestação por carrapatos e grau de infestação por carrapatos) ao serem colocadas no modelo de regressão logística (análise multivariada), somente o tempo de criação na AMAN (animais com mais de 15 anos na propriedade) apresentou associação com a soropositividade para *T. equi* (OR 5,79; IC 1,23-27,1). Esta observação sugere que os equinos com mais tempo na propriedade do estudo, caracterizada como enzoótica, tem mais chances de tornarem-se soropositivos. Tal inferência é lógica pois equinos negativos num rebanho enzoótico, com o passar do tempo, acabam por se infectarem e tornarem-se positivos. Tal fato corrobora o aumento da prevalência para *T. equi*, observado por Heucheter et al. (1999) em estudo longitudinal, que acompanharam a prevalência para a hemoparasitose em potros em fazendas no estado de São Paulo, onde também observaram aumento da prevalência com o passar do tempo. Assim como por Rüegg et al. (2007), que constataram associação entre a idade e positividade para *T. equi* pela PCR e RIFI, com um incremento da prevalência de *T. equi* com o passar da idade, sugerindo persistência da infecção nos equinos.

## 6 CONCLUSÕES

A área militar da AMAN, no município de Resende, é endêmica para a *Theileria equi*, e o rebanho equino encontra-se em estabilidade enzoótica.

A associação entre a soropositividade e permanência dos animais por um longo período de tempo na propriedade estudada, evidencia o fato que, em regiões enzoóticas, quanto mais tempo os animais permanecerem na região, maiores as chances de tornarem-se infectados.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- AMERICAN HORSE COUNCIL. **National Economic Impact of the U.S. Horse Industry**. 2005. Disponível em: <<http://www.horsecouncil.org/national-economic-impact-us-horse-industry>>. Acessado em 17 jun 2013.
- ASGARALI, Z.; COOMBS, D.K.; MOHAMMED, F.; CAMPBELL, M.D.; CAESAR, E. A serological study of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in Thoroughbreds in Trinidad, **Veterinary Parasitology**, v. 144, p. 167-171, 2007.
- 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.
- BHOORA, R.; QUAN, M.; FRANSSEN, L.; BUTLER, C.M.; VAN DER KOLK, J.H.; GUTHRIE, A.J.; ZWEYGARTH, E.; JONGEJAN, F.; COLLINS, N.E. Development and evaluation of real-time PCR assays for the quantitative detection of *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses from South Africa. **Veterinary Parasitology**, v. 168 , p. 201–211, 2010.
- 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.
- CAMPOS, C.H.C. Comunicação pessoal. 2013. (Hospital Veterinário da Academia Militar das Agulhas Negras, Resende, Rio de Janeiro, Brasil).
- 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.
- 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. **Arquivo do Instituto de Biologia**, 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. **Erfolgreiche Versuche zur Übertragung von *Babesia equi* durch *Anocentor nitens* and *Amblyomma cajennense***. Thesis, Hannover School of Veterinary Medicine, 122 p. 1988. apud PFEIFER BARBOSA, I., PFEIFER BARBOSA, I.; BÖSE, R.; PEYMANN, B.;

DE 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 WALL, D.T. Equine piroplasmiasis : a review. **British Veterinary Journal**, v.148, p. 6-14, 1992.

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.

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

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.

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.

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

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.

HAILAT, N.Q.; LAFI, S.Q.; A1-DARRAJI, A.M.; A1-ANI; F.K. Equine babesiosis associated with strenuous exercise: clinical and pathological studies in Jordan. **Veterinary Parasitology**, v. 69, 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, 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.

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.

KAPPEMEYER, 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.

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

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.

MACHADO, R.Z. Comunicação Pessoal. 2014. (Departamento de Patologia Animal FCAV UNESP, Jaboticabal, São Paulo, Brasil).

MACHADO, R.Z.; MONTASSIER, H.J.; PINTO, A.A.; LEMOS, E.G.; MACHADO, M.R.; VALADÃO, I.F.; BARCI, L.G.; MALHEIROS, E.B. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 71, p.17-26, 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.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Equídeos**. Disponível em:< <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>>. Acessado em: 02 jan 2014.

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 piroplasms: life cycle and sexual stages. **Advances in Parasitology**, v. 23, n.1, p.37-103, 1984.

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.

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.

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

O'DWYER, L. H. Piroplasmídeos – *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\\_PIROPLASMOSIS\\_FINAL.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/EQUINE_PIROPLASMOSIS_FINAL.pdf)>. acessado em 30 Nov 2013.

OLIVEIRA, P.R.; BORGES, L.M.F.; LOPES, C.M.L.; LEITE, R.C. Population dynamics of the free-living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) on pasture of São Leopoldo, Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.92, p. 295-301, 2000.

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

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

PFEIFER BARBOSA, I.; BÖSE, R.; PEYMAN, B.; FRIEDHOFF, K.T. Epidemiological aspects of equine babesiosis in a herd of horses of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.58, p. 1-8, 1995.

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. 63 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

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>.

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

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.

ROBY, T.O.; ANTHONY, D.W. Transmission of equine piroplasmiasis by *Dermacentor nitens* Neumann. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.142, n.2, p.768-769, 1963.

RONCATI, N. V. **Ocorrência de *Theileria equi* congênita em potros Puro Sangue Lusitano no Brasil, diagnosticada através da técnica RT-PCR**. 2006. 71 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

ROTHSCHILD, C.M. Equine Piroplasmiasis. **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.; 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.

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, p. 939–947, 2007.

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.

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

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 eqüinos 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.; ROIERI, 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. Factors associated to *Theileria equi* in equids of two microregions from Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 3, p. 235-241, 2011.

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

SCOLES, G. A.; HUTCHESON, H.J.; SCHLATER, J.L.; HENNAGER, S.G.; PELZEL, A.M.; KNOWLES, D.P. Equine piroplasmiasis associated with *Amblyomma cajennense* ticks, Texas, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 10, out 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.

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

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

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.

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 piroplasmiasis 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, 479 p. 1995.

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

UETI, M. W.; MEALEY, R.H.; KAPMEYER, 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.

UILENBERG, G. *Babesia* - A historical overview. **Veterinary Parasitology**, v.138, 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 Chileno de Parasitología**, v.28, p. 6-9, 1973.

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

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

## 8 CONCLUSÕES GERAIS

Houve diferença significativa entre as médias de contagens de carrapatos sobre os equinos nos diferentes grupos, indicando que as diferentes condições de pastagens, toailete e manejo podem estar influenciando no grau de infestação dos animais.

A presença de anticorpos IgG homólogos anti-*B. burdorferi* em equinos de uso militar da AMAN é indicativo da circulação de *Borrelia* spp. na área militar.

A presença de infestação por carrapatos foi significativamente associada à soropositividade dos equinos para *Borrelia* spp., sugerindo que tal artrópode é potencial vetor.

A alta prevalência de animais positivos ao iELISA para *T. equi* indica que área militar da AMAN, no município de Resende, é endêmica para a hemoparasitose, estando o rebanho equino em estabilidade enzoótica.

O tempo de criação na AMAN (animais com mais de 15 anos na propriedade) apresentou associação significativa com a soropositividade para *T. equi*, sugerindo que, quanto mais tempo o equino passa numa região enzoótica, maiores as chances deste tornar-se sorologicamente positivo.

## **ANEXOS**

Anexo I – Ficha individual de exame físico informação de equino.

## FICHA INDIVIDUAL DE EXAME FÍSICO E 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:

Seção de Equitação  Curso de Cavalaria

Pavilhão de baias:

Odím  Box  Geral  Curso de Cavalaria

Manejo:

Estabulado  Semi-estabulado

Tipo de emprego:

Instrução Militar  Pólo  Hipismo ou Concurso Completo de Equitação

Área de pastagem (animais semi-estabulados):

Seção de Equitação  Curso de Cavalaria

Contato com áreas de capoeira, fragmentos de mata atlântica, mata ciliar e animais silvestres:

Sim  Não

Número de carrapatos infestando equino no momento da coleta:

Amblyomma spp.: \_\_\_\_\_

Dermacentor nitens: \_\_\_\_\_

Rhipicephalus microplus: \_\_\_\_\_

**Outras observações relevantes:**

---

---

---