

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**Avaliação clínica e laboratorial de equídeos sororreagentes para
Anaplasma phagocytophilum (Rickettsiales: Anaplasmataceae)
em Minas Gerais, Brasil**

Luan Gavião Prado

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2014**

Luan Gavião Prado

Avaliação clínica e laboratorial de equídeos sororreagentes para *Anaplasma phagocytophilum* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) em Minas Gerais, Brasil

Dissertação apresentada à UFMG, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área: Medicina e Cirurgia Veterinárias

Orientadora: Profa. Maristela Silveira Palhares

Co-orientador: Prof. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2014**

P89ac Prado, Luan Gavião, 1988-
Avaliação clínica e laboratorial de equídeos sororreagentes para *Anaplasma phagocytophilum* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) em Minas Gerais, Brasil / Luan Gavião Prado. - 2014

74 p. : il.

Orientadora: Maristela Silveira Palhares

Co-orientador: Múcio Flávio Barbosa Ribeiro

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

Inclui bibliografia

1. Equino – Doenças – Diagnóstico – Teses.
2. Sorologia veterinária – Teses.
3. Carrapato como transmissor de doenças — Teses. I. Palhares, Maristela Silveira. II. Ribeiro, Múcio Flávio. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.
- IV. Título.

CDD – 636.108 96

Dissertação defendida e aprovada em 30 de abril de 2014, pela Comissão Examinadora constituída por:



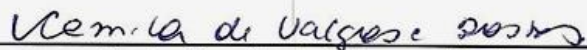
Profª. Maristela Silveira Palhares
Presidente - Orientador



Prof. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG



Profª. Fabíola de Oliveira Paes Leme
Escola de Veterinária - UFMG



Profª. Camila de Vargas e Bastos
Escola de Veterinária - UFMG



Profª. Júlia Angélica Gonçalves da Silveira
Escola de Veterinária - UFMG

II

Desinventar objetos. O pente, por exemplo.
Dar ao pente funções de não pentear. Até que
ele fique à disposição de ser uma begônia. Ou
uma gravanha.
Usar algumas palavras que ainda não tenham
idioma.

III

Repetir repetir - até ficar diferente.
Repetir é um dom do estilo.

O livro das Ignoranças, Manoel de Barros

Dedico àqueles que tornaram essa conquista possível:
Rose, Everton, Ivo, Clara e Ruanny
Marília, Celina, Romil, Tom e Míriam

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, por tornar esse sonho possível.

À minha mãe, mulher de ferro e batalhadora, que me fez ver a importância da verdade, da honestidade e do carinho. Que me mostrou que se chega muito longe quando se quer e se persegue os sonhos. Hoje não somos apenas mãe e filho, somos um, somos mais! Obrigado por tudo! Pelas palavras que me acalmaram, e pelas que me fizeram pensar. Mãe, obrigado, acima de tudo, pelo amor incondicional que ganho a cada segundo da minha vida.

Ao meu pai, meu exemplo de profissionalismo e de magistério. O professor que um dia quero chegar perto de ser. Em todos esses anos de vida acadêmica sempre se mostrou disposto a ajudar e me fazer crescer. Pai presente, que mostrou a mim e aos meus irmãos o significado da palavra amor. Obrigado por todo o carinho e paciência.

Ao meu irmão, Ivo, por me proporcionar momentos tão bons ao seu lado. As conversas, as dicas, os “puxões de orelha”. Em tudo isso que passamos juntos eu sempre pude ver a felicidade que você tinha em me ajudar, em ser meu irmão mais velho. Agradeço à minha nova irmã, Ruanny, que se eu pudesse resumir tudo o que eu tenho para dizer sobre ela, seria com a frase: “Os melhores perfumes, sempre vêm nos menores frascos”.

À minha irmã, Clara, que, geograficamente, esteve tão longe de toda a família durante a maior parte do meu mestrado, mas que nunca deixou de participar de todas as nossas conquistas! Obrigado, mana!

Ao Danilo, que é muito mais irmão que primo! Obrigado pela confiança, pelo carinho e por fazer minha vida mais feliz!

Aos meus avós, por todo o amor e carinho que sempre recebi. Cada um de vocês tem uma importância tão grande em todo esse processo de conclusão de mais uma etapa na minha vida, que não caberia em apenas algumas páginas para lhes agradecer. Vocês são tudo em minha vida. Aos tios, primos e agregados, pela cumplicidade, apoio e carinho durante todos esses anos. Principalmente à Tia Míriam, minha segunda mãe, pelo amor incondicional.

Aos meus afilhados, Tábata e Vítor, e aos afilhados de coração Tomaz e Samuel, minha vida é mais feliz por ter vocês.

À professora Maristela Silveira Palhares, pelos quase sete anos de orientação. Meu muito obrigado por me apresentar o Projeto Carroceiros, que foi o projeto que com toda certeza me trouxe grandes alegrias durante a graduação e o mestrado.

Ao professor Múcio Flávio Barbosa Ribeiro, pela co-orientação, pelo tempo gasto comigo, sempre solícito em me sanar todas as dúvidas sobre o experimento. Por me apresentar um lado na Veterinária que ainda não conhecia profundamente e que hoje se tornou uma paixão.

À professora Renata de Pino Albuquerque Maranhão, que entrou na minha vida quase que de supetão, e, posso dizer com toda certeza, que hoje se tornou uma grande amiga. Muito obrigado pelos momentos em que escutou meus problemas, relacionados ou não ao mestrado, me ajudou como profissional e principalmente, obrigado por me ajudar a crescer como pessoa. Você foi uma das peças-chaves nesse meu crescimento.

À professora Fabíola Oliveira Paes Leme, pelos ensinamentos, que me acompanham desde a minha graduação, pela paciência em ensinar, pela humildade, pelo carinho gratuito que sempre recebi. Obrigado pelas conversas, pelas dicas e muito obrigado pela amizade, que tenho certeza ainda há muito que crescer!

À grande amiga Ana Luísa! Esses dois anos ficarão na história. Obrigado pelos momentos, vários, de cumplicidade mútua, de carinho correspondido, de sinceridades válidas, de diversões merecidas, de amor sincero. Não tinha como você ficar sem um agradecimento, com um parágrafo dedicado total e exclusivamente para você. Não foram apenas dois anos de convivência diária que fizeram você essa pessoa tão especial em minha vida, foram os anos anteriores, na graduação, foram as conversas, os desabaços, as risadas, sempre compartilhadas de uma forma ímpar, que eu nunca mais encontrarei em nenhuma outra pessoa. Obrigado por ser essa pessoa única em minha vida!

Ao Raphael Mattoso, que nesse momento, a tantos quilômetros de distância, consegue se manter presente! Obrigado por ser esse amigo que apoia, anima, briga e que sempre quer meu melhor. Mesmo de longe sei que você está torcendo pela minha vitória. Obrigado sempre!

Ao Vinícius Monteiro Bezerra, que aos poucos foi entrando em minha vida e que hoje é uma das mais especiais que tenho o prazer de conviver. Obrigado pelo carinho, pela paciência, pelos conselhos, pelas risadas, pelos momentos únicos que pudemos dividir. Vi, a vitória também é sua!

À Priscila Fantini, meu presente, sempre presente! Ela que me ensinou tanto quando eu era um simples aspirante a veterinário, me emprestou um lugar no pequeno apartamento dela em Barcelona, quando tive meu primeiro contato com a vida acadêmica internacional, me apoiou, me colocou onde eu nunca achei que conseguiria chegar. Com seu jeito bravo e ao mesmo tempo doce, sempre disposta, me conquistou! Obrigado por me mostrar como algumas coisas acontecem e são, por me dar aquele “empurrãozinho” que faltava para chegar onde precisava, por abrir meus olhos e por ser essa grande amiga!

Aos amigos Álvaro, Vivian, Viviane, Karen e Roberta pela ajuda e por tornarem a caminhada mais fácil e tranquila.

Aos amigos Thamy, Lorena, Jonas, Eduardo, Alair e Bárbara pelos momentos inesquecíveis que passei ao lado de vocês. Pelas festas, almoços, festivais de pizza, pelas conversas, risadas, desabafos, cervejas geladas e muito carinho!

Ao Gustavo, por me mostrar que família também é aquela que nós escolhemos. Gu, muito obrigado por fazer parte da minha vida.

Ao Luiz Henrique, Mariana, Leonardo e Tamiris, o que seria de mim sem vocês, meus irmãos? Obrigado pelos mais de 10 anos, 20, no caso da Mariana, de amizade, cumplicidade, sinceridade. Podemos não estar juntos, nós cinco, sempre que queremos, mas nossos corações vão sempre estar unidos! Muito obrigado por tudo!

À Júlia Angélica Gonçalves da Silveira, Julinha, pela dedicação e paciência! Pela vontade de ajudar e por colaborar tanto para a realização desse mestrado. Saiba que sem você as coisas teriam sido ainda mais difíceis.

À Camila de Valgas Bastos, por ser a responsável pela minha paixão pelo *Anaplasma phagocytophilum*, por me ensinar muita coisa do que sei e utilizei nesse experimento. Por me acompanhar, juntamente com a Julinha, durante o congresso de Zaragoza, e por me tranquilizarem naquele momento em que eu não estava tão seguro. Sem esquecer, é claro, dos passeios, das conversas e do macarrão com cogumelos.

Aos amigos do projeto Carroceiros.

À Catiane Lopes, por me ajudar a ver como a vida pode ser melhor quando a gente ri. Obrigados pelas tardes no Projeto Carroceiros, que deixaram de ser uma obrigação e passaram a ser diversão, principalmente pelo fato de estarem comigo, você o Rafael Felipe e Renato Thomaz. Meus agradecimentos anteriores já mostram o quanto sou grato a vocês.

Aos ex-residentes Filipe Moraghi Moreira e Jackeline Rezende, às residentes Iolanda Gea Kassem, Patrícia Castro, Paula Lopes e Natália Bernstein, Figura, Jack, Ioiô, Paty, Paulete e Nath, apenas um muito obrigado, extremamente sincero, a vocês pela ajuda! Sem vocês esse mestrado não seria tão bom!

Ao Sebastião Alves e à Isabel Vinagre, Tião e Bel. Meus dias no galpão eram mais felizes quando os tinha perto de mim. Tião, obrigado pelos ensinamentos, pela ajuda e pelo carinho que sempre teve por mim. Bel, obrigado pelos momentos maravilhosos que você me proporcionou, pelos conselhos e pelo carinho.

À Juliana Leão, que perto ou longe, sempre está ao meu lado, com seus conselhos, com aquela risada gostosa que anima meu dia. Com a paciência que só ela sabe ter comigo. Pelo carinho, pelos longos oito anos de amizade! Obrigado Ju!

À Eleonora, pela presença em todos os momentos felizes e tristes nesta minha caminhada. Pela paciência em me ouvir, pelos conselhos, pela preocupação e principalmente pelo carinho.

À Paula e à Bruna! Obrigado pelo carinho e a recepção ímpar que recebi de vocês durante a minha estadia no Laboratório de Protozoologia. Paula, muito obrigado pelas palavras sábias, que mesmo você não sabendo, me tranquilizavam e me davam forças para continuar. Bruna,

obrigado pela ajuda técnica, mas, principalmente, obrigado pelas conversas, pelas risadas, e pelo amor que você tem pela pesquisa, que contagiava qualquer um ao seu lado, e que também me contagiou.

Ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, em nome da ex-residente Anna Luiza Faccchetti, agradeço a todos os ex-residentes, residentes e funcionários pela grande ajuda.

Ao rapaz que um dia me pediu dez centavos emprestados no Xerox. Por me mostrar que nem por dez centavos devemos desistir dos nossos sonhos.

Ao Laboratório de Parasitologia Molecular e à professora Élide Rabelo, meus agradecimentos pela grande colaboração e por tornarem possível a realização das análises moleculares presentes nesta dissertação.

Aos funcionários e professores do Hospital Veterinário da UFMG.

Aos proprietários e funcionários da Fazenda dos Coqueiros e da Fazenda Engenho de Serra que me abriram as portas gentilmente e me acolheram em seus lares. Ajudaram durante todo o tempo em que estive trabalhando nas propriedades, mesmo que, com isso, deixassem de lado suas obrigações. Meu muitíssimo obrigado, sem a colaboração de vocês eu não teria conseguido.

Aos porteiros do LEPET, pela preocupação, pela amizade e pelos cafezinhos quando o sono era mais forte.

Aos potros, John Lennon, Yoko Ono, Ringo Star, Rita Lee, Janis Joplin, Paul McCartney, Clara Nunes, Elis Regina, Elza Soares e Cartola por me proporcionarem tantas alegrias e por me reavivarem minha paixão pela veterinária nos momentos de cansaço. Aos garanhões, Amboos, Atlantik e Ribeiro, e às éguas Fiona, Cereja, Dakita, Daisy, Deca, Gipsy, Catarina, Margarida e Bainha, por serem fonte de aprendizagem e por contribuírem tanto para a minha formação profissional.

Agradeço aos animais, minha fonte de inspiração e de amor pela profissão. Tudo que eu fiz durante o mestrado, foi pensando neles.

SUMÁRIO

	RESUMO	15
	ABSTRACT	16
1.	INTRODUÇÃO	17
2.	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1.	Agente etiológico e ciclo biológico	18
2.2.	Cultivo celular do agente	20
2.3.	Hospedeiros	21
2.3.1.	Hospedeiros invertebrados (vetores)	21
2.3.2.	Hospedeiros mamíferos / reservatórios	22
2.4.	Epidemiologia	22
2.5.	Fisiopatogenia	25
2.6.	Manifestações clínicas	27
2.7.	Diagnóstico	28
2.7.1.	Exame parasitológico	29
2.7.2.	Exames sorológicos	29
2.7.3.	Exame molecular: reação em cadeia de polimerase (PCR)	30
2.8.	Tratamento	30
2.9.	Prevenção e controle	31
3.	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1.	Avaliação hematológica, sorológica e molecular de equinos de tração do município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil	32
3.1.1.	Localização geográfica e condições climáticas	32
3.1.2.	Delineamento e seleção dos animais	32
3.1.3.	Coleta e processamento do material	33
3.1.3.1.	Hemograma e bioquímica sérica	33
3.1.4.	Métodos diagnósticos	34
3.1.4.1.	Exame direto	34
3.1.4.2.	Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)	34
3.1.4.3.	Avaliação molecular	35
3.1.4.3.1.	Extração do DNA	35
3.1.4.3.2.	Amplificação do DNA	35
3.1.4.3.3.	Sequenciamento nucleotídico	37
3.2.	Avaliação clínica e laboratorial da ocorrência de <i>Anaplasma phagocytophilum</i> em duas regiões do estado de Minas Gerais, Brasil	37
3.2.1.	Localização geográfica e condições climáticas	37
3.2.2.	Cálculo amostral	38
3.2.3.	População estudada	38
3.2.4.	Coleta e processamento do material	39
3.2.4.1.	Hemograma e bioquímica sérica	39
3.2.5.	Métodos diagnósticos	39
3.2.6.	Estudo da incidência cumulativa de anaplasmose granulocítica equina	39
3.3.	Comparação clínica entre animais positivos e negativos para anaplasmose granulocítica equina	39
3.4.	Casos clínicos de AGE atendidos no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais	39

3.5.	Análises estatísticas	40
4.	RESULTADOS E DICUSSÃO	40
4.1.	Avaliação hematológica, sorológica e molecular de equinos de tração do município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil	40
4.1.1.	População estudada	40
4.1.2.	Avaliação sorológica pela reação de imunofluorescência indereta (RIFI)	40
4.1.3.	Avaliação parasitológica pela capa leucocitária	44
4.1.4.	Avaliação molecular (PCR)	44
4.1.5.	Avaliação laboratorial	45
4.1.5.1	Eritrograma e plaquetograma	45
4.1.5.2.	Leucograma	46
4.1.5.3.	Bioquímica sérica	48
4.1.5.3.1.	Perfil hepático	48
4.1.5.3.2.	Perfil renal	49
4.1.5.3.3.	Perfil proteico	49
4.2.	Avaliação clínica e laboratorial de equídeos e da ocorrência de <i>Anaplasma phagocytophilum</i> em duas regiões do estado de Minas Gerais, Brasil	50
4.2.1.	Ectoparasitas	50
4.2.2.	Avaliação sorológica pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	52
4.2.3.	Avaliação parasitológica pela capa leucocitária	53
4.2.4.	Avaliação molecular (PCR)	54
4.2.5.	Avaliação laboratorial	54
4.2.5.1.	Eritrograma e plaquetograma	54
4.2.5.2.	Leucograma	56
4.2.5.3.	Bioquímica sérica	57
4.2.5.3.1.	Perfil hepático	57
4.2.5.3.2.	Perfil renal	58
4.2.5.3.3.	Perfil proteico	59
4.2.7.	Estudo da incidência de anaplasrose granulocítica equina	60
4.3.	Comparação clínica entre animais positivos e negativos para anaplasrose granulocítica equina	61
4.4.	Casos clínicos de anaplasrose granulocítica equina atendidos no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (HV-EV/UFMG)	62
5.	CONCLUSÕES	65
6.	PERSPECTIVAS FUTURAS	65
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
8.	ANEXOS	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Sequência dos iniciadores utilizados na primeira e na segunda reação de <i>nested</i> PCR, para identificação do agente.	36
Tabela 2:	Programa submetido ao termociclador automático para realização do <i>nested</i> PCR para amplificação para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> , utilizando os iniciadores MSP4AP5 e MSP4AP3, para a primeira reação e os iniciadores msp4f e msp4r para a segunda reação.	36
Tabela 3:	Condição para reação de <i>nested</i> PCR para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> utilizando os iniciadores MSP4AP5 e MSP4AP3, para primeira reação e os iniciadores msp4f e msp4r, para a segunda reação.	36
Tabela 4:	Temperatura (°C), umidade relativa do ar (%) e precipitação pluviométrica (mm), na região dos municípios de Ataléia e São Vicente de Minas, no estado de Minas Gerais, Brasil, de acordo com o período da coleta dos dados*.	38
Tabela 5:	Distribuição dos animais estudados em ambas as propriedades de acordo com a coleta e o sexo.	39
Tabela 6:	Distribuição dos animais de acordo com as URPV's e Regionais no município de Belo Horizonte.	41
Tabela 7:	Distribuição da frequência de animais reagentes para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> de acordo com a Regional Administrativa de Belo Horizonte.	41
Tabela 8:	Distribuição das amostras reativas na RIFI, de acordo com a Regional e a diluição do soro, em investigação de soroprevalência equina para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .	43
Tabela 9:	Valores médios (média + erro padrão) do eritrograma e da plaquetometria entre os grupos de animais reativos e não reativos no exame de RIFI em investigação da soroprevalência equina para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .	46
Tabela 10:	Valores médios absolutos (média ± erro padrão) do leucograma entre os grupos de animais reativos e não reativos à RIFI, em investigação da soroprevalência equina para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .	48
Tabela 11:	Valores médios (média ± erro padrão) dos perfis renal e hepático entre os grupos de animais reativos e não reativos à RIFI, em investigação da soroprevalência equina para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .	49
Tabela 12:	Valores médios (média ± erro padrão) do perfil proteico entre os grupos de animais reativos e não reativos à RIFI, em investigação da soroprevalência equina para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .	50
Tabela 13:	Distribuição do número de animais de acordo com a presença de carrapatos, no verão e no inverno, de acordo com a propriedade, em dois municípios de Minas Gerais, Brasil.	50
Tabela 14:	Distribuição da frequência de animais de acordo com a reatividade sorológica na RIFI na diluição de 1:160, de acordo com a propriedade e a estação do ano, em investigação da soroprevalência equina para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> , em duas regiões do estado de Minas Gerais, Brasil.	52

Tabela 15:	Distribuição das amostras reativas na RIFI, de acordo com a propriedade, a estação do ano e a diluição do soro, em investigação de soroprevalência equina para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> em duas regiões do estado de Minas Gerais, Brasil.	53
Tabela 16:	Distribuição da frequência de animais de acordo com a presença de mórulas no esfregaço de capa leucocitária, propriedade e a estação do ano, em investigação de soroprevalência equina de <i>Anaplasma phagocytophilum</i> em duas regiões do estado de Minas Gerais, Brasil.	54
Tabela 17:	Valores médios (média \pm erro padrão) do eritrograma e plaquetograma de animais reativos e não reativos à RIFI, de acordo com a propriedade, em investigação da soroprevalência equina para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> em duas regiões do estado de Minas Gerais, Brasil.	55
Tabela 18:	Valores médios absolutos (média \pm erro padrão) do leucograma de animais reativos e não reativos à RIFI, de acordo com a propriedade, em investigação da soroprevalência equina para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> em duas regiões de Minas Gerais, Brasil.	56
Tabela 19:	Valores médios (média \pm erro padrão) do perfil hepático entre os grupos de animais reativos e não reativos à RIFI de acordo com a propriedade, em investigação da soroprevalência equina para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> em duas regiões do estado de Minas Gerais, Brasil.	58
Tabela 20:	Valores médios (média \pm erro padrão) do perfil renal entre os grupos de animais reativos e não reativos à RIFI de acordo com a propriedade, em investigação da soroprevalência equina para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> em duas regiões do estado de Minas Gerais, Brasil.	58
Tabela 21:	Valores médios (média \pm erro padrão) do perfil proteico entre os grupos de animais reativos e não reativos à RIFI, de acordo com a propriedade, em investigação da soroprevalência equina para <i>Anaplasma phagocytophilum</i> em duas regiões do estado de Minas Gerais, Brasil.	59
Tabela 22:	Comparação de perfil hematológico e bioquímico de animais positivos na capa leucocitária ou PCR e animais negativos na capa leucocitária e PCR, sem alteração clínica aparente.	61
Tabela 23:	Perfil hematológico dos animais atendidos no HV-EV/UFMG nos anos de 2010 a 2013 apresentando AGE, com diagnóstico através de capa leucocitária ou PCR.	62
Tabela 24:	Perfil leucocitário dos animais atendidos no HV-EV/UFMG nos anos de 2010 a 2013 apresentando AGE, com diagnóstico através de capa leucocitária ou PCR.	63
Tabela 25:	Perfil bioquímico dos animais atendidos no HV-EV/UFMG nos anos de 2010 a 2013 apresentando AGE, com diagnóstico através de capa leucocitária ou PCR.	64

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: A: Reação de Imunofluorescência Indireta negativa. Observar as células IDE8 contendo inclusões de *A. phagocytophilum* sem ligação do conjugado. B: Reação de Imunofluorescência Indireta positiva. Observar fluorescência do conjugado ligado à membrana citoplasmática do *A. phagocytophilum*. Aumento: 400x. 35
- Figura 2: Frequência das diluições dos soros, em amostras reativas na RIFI, em investigação de soroprevalência equina *Anaplasma phagocytophilum*, Belo Horizonte. 42
- Figura 3: Distribuição das amostras reativas e não reativas, de acordo com o mês avaliado e a pluviosidade encontrada em cada mês avaliado. 43
- Figura 4: Neutrófilo circulante apresentando inclusão intracitoplasmática sugestiva de mórula de *Anaplasma phagocytophilum*. Aumento 1000x. 44
- Figura 5: Gel de Agarose 1% apresentando amostra positiva para *Anaplasma phagocytophilum*. P: Padrão, peso molecular 1Kb; C+: Controle Positivo, obtido após extração de DNA de cultivo celular de *A. phagocytophilum*; A+: Amostra positiva; as duas últimas canaletas contêm os brancos da primeira e da segunda reação, respectivamente. 45
- Figura 6: Pavilhão auricular de um equino apresentando infestação por carrapatos. 51
- Figura 7: Infestação por carrapato na região perianal de equino pertencente à propriedade 1. 51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLA

µl = microlitro
ACD = Ácido cítrico-dextrose
AGE = Anaplasmose Granulocítica Equina
ALT = Alanina Aminotransferase
AST = Aspartato Aminotransferase
BID = *bis in die*, duas vezes ao dia
CHCM = Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
DAAS = Dissipação da Água no Solo
DH82 = linhagem de células oriundas de macrófagos caninos
DMSO = Dimetilsulfóxido
DNA = Ácido Desoxirribonucleico
EDTA = Ácido etilenodiamônio tetra-acético
EGE = Erliquiose Granulocítica Equina
EGH = Erliquiose Granulocítica Humana
ELISA = *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

EP = erro padrão
FA = Fosfatase Alcalina
fl = fentolitro
g/dl = gramas por decilitro
GGT = Gama Glutamiltransferase
GLUT-2 = Proteína de Transporte de Glicose 2
GLUT-4 = Proteína de Transporte de Glicose 4, sensível à Insulina
HL-60 = linhagem de células pró mielocíticas de humanos
HV-EV/UFGM = Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais
IDE8 = linhagem de células embrionárias oriundas do carrapato *Ixodes scapularis*
IFN- γ = Interferon gama
IgG = Imunoglobulina G
IL-1 = Interleucina 1
IL-10 = Interleucina 10
IL-1 β = Interleucina 1 beta
IL-4 = Interleucina 4
IL-6 = Interleucina 6
IL-8 = Interleucina 8
INF- α = Interferon alfa
ISE6 = linhagem de células embrionárias oriundas do carrapato *Ixodes scapularis*
IV = intravenosa
Kb = quilobase
MCP-1 = Proteína Quimiotática para Monócitos 1
mg = miligrama
mg/kg = miligrama por quilo
min = minuto
MIP-1 α = Proteína Inflamatória de Macrófago 1 alfa
MIP-1 β = Proteína Inflamatória de Macrófago 1 beta
ml = mililitro
msp2 = *Major Surface Protein 2*
msp4 = *Major Surface Protein 4*
nm = nanômetro
n° = número
nPCR = *nested* Reação em Cadeia da Polimerase
°C = grau Celsius
pb = pares de base
PBS = *Phosphate Buffer Saline*
PCR = Reação em Cadeia de Polimerase (Polimerase Chain Reaction)
pg = picograma
RANTES = *Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted*
RIFI = Reação de Imunofluorescência Indireta
RNA = Ácido Ribonucleico
rpm = rotações por minuto
rRNA = Ácido Ribonucleico ribossômico
RT-PCR = Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
SID = *semel in die*, uma vez ao dia
TAE = Tampão Tris-Acetato-EDTA
Th1 = Linfócito T helper 1
TNF- α = Fator de Necrose Tumoral alfa
URPVs = Unidades de Recebimento de Pequenos Volumes
UV = ultravioleta
V = volts

RESUMO

A Anaplasmosose Granulocítica Equina (AGE) é causada pelo *Anaplasma phagocytophilum*, bactéria intracelular obrigatória, Gram-negativa, membro da família Anaplasmataceae incluída na ordem das Rickettsiales. Pouco se sabe sobre a doença, dinâmica de transmissão, cepa e prevalência da doença no estado de Minas Gerais. O presente trabalho teve como objetivo apresentar os casos clínicos atendido na Clínica Médica de Equídeos do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, descrever a prevalência desta afecção nas localidades estudadas e realizar uma avaliação laboratorial de equinos sororreagentes para *A. phagocytophilum* em três localidades do estado de Minas Gerais, Brasil. Também se objetivou descrever molecularmente a cepa do agente encontrada nas localidades estudadas com o sequenciamento nucleotídico de amostras que se mostrassem positivas ao teste da reação em cadeia da polimerase (PCR). Foram estudados animais provenientes do município de Belo Horizonte (224), Ataléia (84) e São Vicente de Minas (88). Em Belo Horizonte encontrou-se uma frequência ao exame da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) de 53,57% (120/224). Ao exame de capa leucocitária foi encontrado um percentual de 3,14% (7/223) de animais positivos e apenas 2,67% (6/96) dos animais foram positivos na reação em cadeia da polimerase (PCR). Em Ataléia e São Vicente de Minas encontrou-se uma frequência de animais reativos à RIFI de 76,16% (131/172). O exame de capa leucocitária revelou 12,87% (22/171) dos animais com inclusões em neutrófilos sugestivas de *A. phagocytophilum* e apenas 1,68% (2/84) dos animais foram positivos na PCR, sendo realizado sequenciamento das amostras positivas. Os animais de Belo Horizonte apresentaram valores de hematologia dentro dos valores de referência. Estes animais apresentaram também, relação neutrófilo:linfócito acima dos valores de referência. Os animais não reativos à RIFI do município de São Vicente de Minas apresentaram valores de plaquetas acima dos valores. Os animais de Ataléia apresentaram valores de eritrócitos maiores que os de São Vicente de Minas. Ainda, foi observada elevação no número de leucócitos e linfócitos, com exceção do grupo não reativo de Ataléia. Os resultados alertam para a importância de mais estudos acerca da epidemiologia desta doença em todo o território brasileiro para que medidas de controle possam ser tomadas.

Palavras-chave: equino; *Anaplasma phagocytophilum*; diagnóstico; sorologia; PCR; sequenciamento nucleotídico

ABSTRACT

Equine Granulocytic Anaplasmosis is caused by Gram-positive, obligatory intracellular bacteria, member of the Anaplasmataceae family, included in the Rickettsiales order. Little is known about, disease transmission dynamics, strain and prevalence of the disease in the state of Minas Gerais. This study aimed to define seroprevalence of EGA in three localities in the state of Minas Gerais and realize a hematological and serum biochemistry evaluation of serology positive horses. 224 animals from Belo Horizonte and 172 animals from Ataléia e São Vicente de Minas were studied. In Belo Horizonte, the seroprevalence for indirect immunofluorescence assay was 53.54% (120/224). At examination of buffy coat smear a percentage of 3.14% (7/224) was found and only 2.67% of the animals were positive in polymerase chain reaction. In Ataléia and São Vicente de Minas the prevalence found in indirect immunofluorescence was 76.16% (131/172). At buffy coat smear evaluation, 12.87% (22/171) of the animals were positive and only 1.68% was positive in polymerase chain reaction. Animals from Belo Horizonte presented with hematology values within the expected for the species. Although, values of MCHC were elevated. These animals also had neutrophils:lymphocytes ratio and band cells values above of reference values. At biochemistry, only GGT was elevated. Animals that reacted in IFA from Ataléia had erythrocytes values higher than São Vicente de Minas animals. Also, it was observed that leucocytes and lymphocytes numbers were higher than the other three groups. GGT was elevated in all animals from these groups. The results emphasize the importance of further studies on the epidemiology of this disease throughout the Brazilian territory so that control measures can be taken against the spread of the disease.

Key-words: Equine; *Anaplasma phagocytophilum*; diagnosis; serology; PCR; nucleotide sequencing.

1. INTRODUÇÃO

A Anaplasmosose Granulocítica Equina (AGE) é causada pelo *Anaplasma phagocytophilum*, bactéria intracelular obrigatória, Gram-negativa, membro da família Anaplasmataceae incluída na ordem das Rickettsiales (Mezerville e Padilla-Cuadra, 2007). Baseados em análises no RNA ribossômico 16S e no gene groESL, na presença de antígenos e características biológicas comuns, o agente da Erliquiose Granulocítica Humana (EGH), *Ehrlichia equi*, agente da Erliquiose Granulocítica Equina (EGE), e *Ehrlichia phagocytophila*, agente da Febre do Carrapato em ruminantes, foram reagrupadas em uma única espécie: *Anaplasma phagocytophilum* (Dumler *et al.*, 2001; von Loewenich *et al.*, 2003). A bactéria infecta leucócitos polimorfonucleares do hospedeiro, principalmente os neutrófilos (Carlyon e Fikring, 2003).

Anaplasma phagocytophilum se mantém na natureza de forma cíclica, alternando-se entre vetor (carrapatos) e mamíferos suscetíveis (Carlyon e Fikring, 2003). Além dos equídeos, os ruminantes, roedores, canídeos, aves e seres humanos são possíveis hospedeiros da bactéria (de la Fuente *et al.*, 2005). O aumento do contato entre animais selvagens, domésticos e seres humanos eleva o risco de surtos de doenças transmitidas por carrapatos, dentre elas a anaplasmosose. Esse contato estreito entre animais e seres humanos torna difícil a implementação de programas de controle tanto do vetor quanto da doença (de la Fuente *et al.*, 2005).

A primeira descrição do agente em equinos foi realizada em 1969 na Califórnia, Estados Unidos (Gribble, 1969; Stannard *et al.*, 1969) e em seres humanos em 1994, também nos Estados Unidos (Bakken *et al.*, 1994). A anaplasmosose granulocítica é considerada uma das doenças transmitidas por carrapatos do gênero *Ixodes* mais

disseminadas na Europa (Stuen, 2007). Em equinos, já foi descrito caso clínico na Alemanha (von Loewenich *et al.*, 2003) e levantamentos sorológicos foram realizados no Brasil (Salvagni *et al.*, 2010; Gavião Prado *et al.*, 2011), Dinamarca (Hansen *et al.*, 2010), Espanha (De La Fuente *et al.*, 2005) e Suíça (Pusterla *et al.*, 1999).

No Brasil, por se tratar de uma doença emergente, pouco se sabe sobre sua epidemiologia, fisiopatologia e transmissão. Há pesquisas soropidemiológicas nos estados de Minas Gerais (Gavião Prado *et al.*, 2011), Goiás e Distrito Federal (Salvagni *et al.*, 2010). Em um levantamento clínico sorológico na região centro – oeste do Brasil, Salvagni *et al.* (2010) encontraram uma prevalência de 65% de equinos positivos para *A. phagocytophilum* pelo teste de ELISA. Apesar disto, nenhum equino foi positivo pelo exame microscópico de capa leucocitária ou nested PCR (nPCR). Já Gavião Prado *et al.* (2011), em estudo feito com equídeos de tração da região metropolitana de Belo Horizonte, apesar de terem encontrado soroprevalência semelhante (64,91%), obtiveram resultado de 28,06% de animais positivos pelo exame microscópico de capa leucocitária.

A anaplasmosose granulocítica é caracterizada por sinais clínicos de hipertermia, anorexia, depressão, edema de membros, ataxia e baixa mortalidade. Corpúsculos de inclusão em neutrófilos, leucopenia, trombocitopenia e anemia leve são as alterações hematológicas mais relatadas (Gribble, 1969; Salvagni *et al.*, 2010). Em equinos a doença é considerada auto limitante e, normalmente, os animais se recuperam sem qualquer tipo de seqüela ou necessidade de tratamento (Gribble, 1969; Salvagni *et al.*, 2010).

O diagnóstico da AGE é realizado por meio dos sinais clínicos e presença de inclusões intracitoplasmáticas em granulócitos, principalmente neutrófilos (Stannard *et al.*,

1969; De La Fuente *et al.*, 2005; Salvagni *et al.*, 2010). Métodos sorológicos e moleculares como ELISA, Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) e Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) também são utilizados para diagnóstico do agente (de la Fuente *et al.*, 2005; Hansen *et al.*, 2010; Salvagni *et al.*, 2010). A reação de Imunofluorescência indireta é considerado um bom método de diagnóstico para o *A. phagocytophilum*, apesar de possuir uma sensibilidade e especificidade mais baixas, quando comparado ao ELISA (Zimmerman e Crisman, 2008).

A AGE ainda é uma doença sub diagnosticada em todo o território brasileiro e causa grandes impactos econômicos e de saúde pública no mundo, mas ainda não se sabe qual sua situação no território brasileiro, sendo de real importância se fazer um levantamento de seu *status* epidemiológico e assim se tomar as medidas necessárias de controle da doença. Além disso, por não se saber qual o vetor e se a doença possui caráter zoonótico no Brasil, o conhecimento sobre seu ciclo na natureza e nos animais domésticos é importante para que se evite a infecção de seres humanos e suas consequências.

O presente trabalho teve como objetivo apresentar os casos clínicos atendido na Clínica Médica de Equídeos do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, descrever a prevalência desta afecção nas localidades estudadas e realizar uma avaliação laboratorial de equinos sororreagentes para *A. phagocytophilum* em três localidades do estado de Minas Gerais, Brasil. Também se objetivou descrever molecularmente a cepa do agente encontrada nas localidades estudadas com o sequenciamento nucleotídico de amostras que se mostrassem positivas ao teste da reação em cadeia da polimerase (PCR).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Agente etiológico e ciclo biológico

Anaplasma phagocytophilum é a nova designação para três espécies de bactérias granulocíticas: *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi* e o agente da Erliquiose Granulocítica Humana. Esta nomenclatura foi baseada na relação genética e antigênica, na predileção por células de sangue periférico derivadas de precursores da medula óssea, principalmente os neutrófilos e morfologia das três espécies (Dumler *et al.*, 2001; von Loewenich *et al.*, 2003; Woldehiwet, 2010). Os três organismos apresentam, pelo menos, 99,1% de similaridade nas sequências de nucleotídeos do gene do 16S rRNA e possuem 100% de similaridade na sequência de aminoácidos da proteína groESL. Outra característica comum às três espécies é a participação de um vetor invertebrado na sua transmissão, sendo o principal responsável o carrapato (Dumler *et al.*, 2001). Assim, o agente foi classificado dentro do gênero *Anaplasma*, família *Anaplasmataceae* e ordem *Rickettsiales* (Dumler *et al.*, 2001; Lillini *et al.*, 2006; Woldehiwet, 2010).

Anaplasma phagocytophilum é uma bactéria Gram-negativa, geralmente pleomórfica, cocóide a elipsoidal, que se reproduz por fissão binária, uniforme ou não, dentro de vacúolos ligados à membrana citoplasmática. Podem ser únicos ou múltiplos, chamados de inclusões ou mórulas, medindo entre 1,5 a 2,5 µm, podendo chegar até a 6µm. As células bacterianas podem possuir diâmetro de até 2µm em cultivos celulares utilizando células embrionárias de carrapatos. Análises ultraestruturais de neutrófilos equinos infectados por *A. phagocytophilum* revelaram que as células continham apenas pequenas mórulas contendo células bacterianas reticuladas, com parede citoplasmática ondulada e solta. Em alguns casos a membrana da mórula era cercada

perpendicularmente por microfilamentos citoplasmáticos que mediam entre 5 a 6 nm de diâmetro. O agente infecta leucócitos granulócitos circulantes, principalmente neutrófilos (Popov *et al.*, 1998; Dumler *et al.*, 2001; Rikihisa *et al.*, 2010).

Niu *et al.* (2008) demonstraram que a bactéria é capaz utilizar, a seu favor, o mecanismo de autofagia celular. *A. phagocytophilum* ao entrar na célula hospedeira se desvia da rota endossomal e se replica em compartimentos ligados à membrana citoplasmática. Esses compartimentos possuem bi camada lipídica, característica de autofagossomos. Eles não possuem a capacidade de se fundir a lisossomos, o que favorece a infecção e replicação do agente no interior das células do hospedeiro, formando as inclusões intracitoplasmáticas ou mórulas, observadas à microscopia ótica. Isso explica a controvérsia da sobrevivência do agente no interior de neutrófilos, já que essa é uma célula que participa de primeira linha de defesa contra patógenos, por meio de um arsenal de mecanismos oxidativos e não oxidativos.

Os neutrófilos são células altamente perecíveis, sobrevivendo na corrente sanguínea por apenas seis a 12 horas, mas sua meia vida aumenta durante a inflamação. A bactéria parece ser capaz de alterar a meia vida do neutrófilo, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Carlyon e Fikrig, 2003). Para comprovar o atraso na apoptose de neutrófilos infectados Scaife *et al.* (2003) analisaram amostras de neutrófilos de ovelhas infectadas ou não. Após a coleta do sangue, isolamento e purificação dos neutrófilos, estes foram cultivados por 22 horas. A taxa de apoptose dos neutrófilos infectados foi significativamente menor que a dos neutrófilos do grupo controle ($30\pm 7\%$ e $52\pm 5\%$, respectivamente). Esse atraso é importante para a replicação do agente, pois o mesmo possui uma baixa taxa de crescimento (Carlyon e Fikrig, 2003).

A. phagocytophilum compartilha vários antígenos de membrana e sequências de nucleotídeos no seu DNA com as bactérias *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ruminantium* e *Anaplasma platys*. Isto pode ser útil para a diferenciação e verificação da contaminação de amostras provenientes de cultivos celulares submetidas a análises por PCR, além daqueles antígenos serem possíveis responsáveis pela ocorrência de reações cruzadas em outras espécies como cães e ruminantes (Munderloh *et al.*, 1996; Popov *et al.*, 1998; Ferreira *et al.*, 2008, Santos *et al.*, 2011).

Existem evidências da existência de cepas que se diferem genética, fenotípica e antigenicamente, tornando-as relativamente espécie-específicas, o que impede que haja infecção de todos os hospedeiros por todas as cepas. Variação antigênica, principalmente das proteínas de membrana, é um dos principais mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro. Em um estudo realizado nos Estados Unidos da América, verificou-se que a cepa que infectava um roedor silvestre na Califórnia não foi capaz de causar doença clínica quando inoculadas em equinos saudáveis. Além disso, não foram encontradas mórulas nas células circulantes, não houve soroconversão e não foi detectado DNA de *A. phagocytophilum* no sangue dos equinos (Swanson *et al.*, 2006; Foley *et al.*, 2008). Já Silaghi *et al.* (2011), na Alemanha, verificaram diferenças genéticas entre cepas da bactéria ao estudarem 14 casos de ocorrência natural da AGE. Os pesquisadores sequenciaram e compararam quatro genes específicos: 16S rRNA, groESL, msp2 e msp4, encontrando quatro diferentes sequências de nucleotídeos nos genes que codificam o 16S rRNA, a proteína groESL e a proteína de membrana msp2. Apenas três sequências diferentes foram encontradas no gene da proteína de membrana msp4. Segundo o estudo há evidências de que diferentes cepas infectem

animais de vida livre e domésticos e que mais de uma cepa pode infectar equinos tanto na Alemanha quanto em outros países.

Pouco se sabe sobre o ciclo biológico do *A. phagocytophilum* e sobre os locais de replicação antes da infecção dos granulócitos do hospedeiro (Woldehiwet, 2010). Alguns estudos citam a participação de tecidos e órgãos como pulmão, baço e medula óssea como locais não só de replicação primária do microorganismo como também durante o processo da doença (Walker e Dumler, 1996; Lepidi *et al.*, 2000). Munderloh *et al.* (2004) demonstraram ser a bactéria capaz de infectar células endoteliais de macaco *Rhesus* e bovinas *in vitro*. A partir deste achado levantaram a hipótese de que as células endoteliais estariam envolvidas no estabelecimento da infecção, tanto aquelas infectadas pelo agente quanto aquelas atuando como apresentadoras de antígeno.

Sabe-se que a larva do carrapato eclode do ovo livre de infecção pelo agente, pois a transmissão é transtadial e não transovariana. Ao fazer o repasto sanguíneo em animal infectado ela se infecta e, após ecdise, mantém-se infectada e apta a transmitir a doença para outro hospedeiro susceptível ou reservatório, mantendo o ciclo da doença. Após o repasto sanguíneo e a ecdise, a ninfa se transforma em adulto, que pode também estar infectado pela bactéria. Além desse tipo de transmissão, todos os estágios do carrapato são susceptíveis de contraírem a infecção após se alimentarem em um hospedeiro infectado. Essa dinâmica de infecção e transmissão entre bactéria e vetor pode ser exemplificada pelo menor número de ninfas infectadas, quando comparadas a indivíduos adultos, em um estudo realizado na cidade de Leipzig, Alemanha (Silaghi *et al.*, 2012).

Essa dinâmica não é ditada apenas pela presença ou não do vetor. Fatores abióticos como duração dos dias, temperatura e

umidade interferem na quantidade de vetores disponíveis para manter o ciclo e em qual ciclo de vida tais vetores se encontram. Carrapatos Ixodídeos podem passar por um processo chamado diapausa, no qual indivíduos adultos que não se alimentaram após fazerem a ecdise adiam sua busca por hospedeiros, até que encontrem uma situação climática favorável. Normalmente, a diapausa é influenciada pelo fotoperíodo negativo, ou seja, durante a estação de inverno em que os dias são curtos e as noites longas. Assim, carrapatos que emergem da fase de ninfa nos meses de julho a setembro, nos países do hemisfério sul, tendem a adiar sua busca por hospedeiros até os meses de chuva, de novembro a fevereiro (Madder *et al.*, 1999; Randolph, 2008).

2.2. Cultivo celular do agente

In vitro, a bactéria pode ser cultivada em células humanas HL-60 (linhagem pró mielocítica), células embrionárias de carrapatos *Ixodes scapularis* (IDE8 e ISE6) e em células endoteliais de seres humanos, macacos Rhesus, bovinos e células de linhagem de macrófago canino (DH82) (Goodman *et al.*, 1996; Muderloh *et al.*, 1996; Popov *et al.*, 1998; Muderloh *et al.*, 1999; Muderloh *et al.*, 2004). Por se tratar de uma bactéria intracelular obrigatória não se sabe qual seu comportamento fora das células do hospedeiro, seja ele mamífero ou invertebrado (Woldehiwet, 2010). Em experimento utilizando células embrionárias de carrapato (*Ixodes scapularis*; IDE8) para verificar a infectividade do agente, Munderloh *et al.* (1996) utilizaram três tipos de anticoagulantes (ácido cítrico-dextrose [ACD], heparina e EDTA). Os pesquisadores verificaram que os melhores são a heparina e o EDTA. Os resultados demonstraram que após 11 dias de infecção da cultura celular apenas 0,3% das células que receberam sangue coletado com ACD apresentavam-se infectadas, 0,6% das que receberam sangue com EDTA e 1% das que receberam sangue coletado com heparina.

Os autores também realizaram análise por microscopia óptica e ultraestrutural das células infectadas e encontraram as mórulas presentes nas células IDE8 diferentes das encontradas em neutrófilos de equinos infectados naturalmente. Além disso, observaram que em culturas mais velhas havia presença de mais de uma mórula, podendo chegar a mais de seis por célula.

A bactéria foi isolada e cultivada em células HL-60 na Escandinávia a partir de sangue de dois equinos doentes. O sangue foi coletado e armazenado a -20° C antes de ser semeado no cultivo celular. A presença de mórulas nas células foi verificada após sete dias de infecção. A porcentagem de infecção aumentou, passando de 10% aos sete dias para 60% aos 16 dias, seguida por uma queda na taxa de infecção, que chegou a apenas 20% aos 26 dias pós-inoculação. Essa foi a primeira descrição, na Europa, da utilização de sangue previamente congelado para isolamento e cultivo de *A. phagocytophilum* (Bjöersdorff *et al.*, 2002). Foggie (1966) foi o primeiro pesquisador a manter o agente congelado a uma temperatura de -79° C utilizando dimetilsulfoxido ou glicerol como crioprotetores. As amostras permaneceram viáveis mesmo após 18 meses de congelamento e causaram doença clínica, após inoculação em ovelhas e cobaias.

2.3. Hospedeiros

2.3.1. Hospedeiros invertebrados (vetores)

Existem em todo o mundo aproximadamente 865 espécies de carrapatos. Destes, 650 são classificados como parte da família Ixodidae, que tem como principal característica a presença de uma placa dorsal, conhecida como escudo. Deste total, 240 espécies são do gênero *Ixodes*, espalhados por todo o mundo. Na região neotropical, à qual está inserido o Brasil, estão descritas 46 espécies de *Ixodes*, sendo

38 endêmicas (Swanson *et al.*, 2006; Onofrio *et al.*, 2009).

Na Europa, Ásia e América do Norte o agente é sabidamente transmitido por carrapatos pertencentes ao complexo *Ixodes ricinus*, que compreende as espécies *I. scapularis*, *I. pacificus*, *I. ricinus* e *I. persulcatus*. Tais espécies são heteroxênicas, se alimentando de um hospedeiro diferente em cada fase do seu ciclo de vida e não são espécie-específicos (Swanson *et al.*, 2006).

A análise molecular para detecção do DNA do *A. phagocytophilum*, em carrapatos *I. ricinus*, tem sido realizada em difentes países, tanto em área urbana quanto rural. A prevalência variou de 8,7% na Alemanha (Silaghi *et al.*, 2012), de 2,7 a 17,5% na Turquia (Sen *et al.*, 2011) e de 1,15% na Suécia (Severinsson *et al.*, 2010).

Entretanto, de la Fuente *et al.* (2004) ao avaliarem diferentes espécies de carrapatos, que infectavam mamíferos na região central da Espanha, verificaram a presença do *A. phagocytophilum* nos carrapatos *Hyalomma m. marginatum*, *Rhipicephalus bursa* e *Dermacentor marginatum* e nenhum carrapato do gênero *Ixodes* spp. apresentava a infecção. Tal achado sugere que possa haver outras espécies de carrapatos pertencentes à família Ixodidae, mas não ao gênero *Ixodes*, responsáveis pela transmissão da bactéria, principalmente em áreas onde há a presença do patógeno sem que haja a presença de seus principais vetores. Outros artrópodes, como os ácaros, podem possuir importância na transmissão do agente, Fernández-Soto *et al.* (2001) encontraram evidência moleculares da presença do agente em larvas da espécie *Neotrombicula autumnalis*, coletadas na vegetação da região norte da Espanha.

Apesar de o Brasil ocupar a maior parte da região neotropical do hemisfério sul, a fauna de carrapatos do gênero *Ixodes* é escassa. Das 240 espécies conhecidas em todo o

mundo, apenas oito são encontradas no Brasil e nenhuma delas pertencentes ao complexo *I. ricinus* (Dantas-Torres *et al.*, 2009; Onofrio *et al.*, 2009). Desta forma, não se conhece o vetor responsável pela transmissão da AGE no Brasil (Salvagni *et al.*, 2010; Gavião Prado *et al.*, 2011).

2.3.2. Hospedeiros mamíferos/reservatórios

Anaplasma phagocytophilum apresenta uma grande variedade de espécies de hospedeiros vertebrados, domésticos ou não, dentre eles: ruminantes, roedores, equídeos, canídeos, aves migratórias e carnívoras e seres humanos (Dumler *et al.*, 2001; de la Fuente *et al.*, 2005; Massung *et al.*, 2005; Dugan *et al.*, 2006; Machado *et al.*, 2012). Existem três tipos de hospedeiros vertebrados: aqueles verdadeiramente susceptíveis, os hospedeiros reservatórios e os hospedeiros finais. Os hospedeiros verdadeiramente susceptíveis desenvolvem a doença e apresentam grande quantidade do agente circulante durante a doença clínica; os hospedeiros reservatórios não desenvolvem a doença, mas apresentam parasitemia significativa; os hospedeiros finais, não apresentam quantidades significantes do agente na circulação (Swanson *et al.*, 2006).

Nos Estados Unidos o principal hospedeiro reservatório é um pequeno roedor (*Peromyscus leucopus*). Outro mamífero tem sido incriminado como hospedeiro reservatório da doença, o veado da cauda branca (*Odocoileus virginianus*). Ambos hospedeiros são habitantes naturais do país e frequentemente têm sido encontrados parasitados por carrapatos do gênero *Ixodes*, com infecção por *Anaplasma phagocytophilum* e ausência de sintomatologia clínica (Bakken e Dumler, 2000; Massung *et al.*, 2005; Dugan *et al.*, 2006). Já na Europa, as espécies consideradas como principais reservatórios da doença são os cervídeos (*Cervus elaphus hispanicus* e *Capreolus capreolus*), bovinos (*Bos taurus taurus*), pequenos roedores

(*Myodes glareolus* e *Apodemus flavicollis*), suínos selvagens (*Sus scrofa*) e aves (*Turdus merula*, *Fringilla coelebs* e *Passer domesticus*) (de la Fuente *et al.*, 2005; Silaghi *et al.*, 2012).

Um experimento realizado em Leipzig, Alemanha, analisou a presença do vetor (*I. ricinus*) e a presença do agente no sangue, transudatos ou órgãos de pequenos mamíferos. Foram encontrados ambos, vetor e agente, em dois roedores (*M. glareolus*). Um dos roedores também apresentou o agente no rim (Silaghi *et al.*, 2012). Magnarelli *et al.* (2010) demonstraram que o cervo de cauda branca (*Odocoileus virginianus*), apesar de não desenvolver sinais clínicos, apresentam anticorpos anti-*A. phagocytophilum* na corrente sanguínea.

A. phagocytophilum é capaz de causar doença clínica em ruminantes, canídeos, equídeos e seres humanos, considerados hospedeiros verdadeiros. Apesar da denominação, alguns autores consideram os seres humanos como hospedeiros erráticos (Leiby e Gill, 2004; De la Fuente *et al.*, 2005; Silaghi *et al.*, 2012). No Brasil, apesar da pouca literatura existente sobre o assunto, equídeos, cães e aves carnívoras foram descritos como hospedeiros do agente. Os métodos utilizados para o diagnóstico de *A. phagocytophilum* foram o exame direto de capa leucocitária, RIFI, ELISA e PCR (nested PCR e RT-PCR) (Salvagni *et al.*, 2010; Gavião Prado *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2011; Machado *et al.*, 2012).

2.4. Epidemiologia

O *A. phagocytophilum* é considerado uma bactéria cosmopolita, tendo sido descrita em países da Europa oriental e ocidental (De la Fuente *et al.*, 2005; Stuen, 2007; Hansen *et al.*, 2010; Severinsson *et al.*, 2010; Adaszek e Winiarczyk, 2011), Ásia (Sen *et al.*, 2011), América do Norte (Bakken *et al.*, 1994; Goodman *et al.*, 1996; Madigan *et al.*, 1996; Chae *et al.*, 2000;) e América do Sul

(Salvagni *et al.*, 2010; Gavião Prado *et al.*, 2011).

A dinâmica de doenças transmitidas por carrapatos, entre elas a AGE, é complexa, em parte devido a três condições que devem ser atendidas para manutenção dos os ciclos de transmissão. Primeiramente, deve haver uma espécie de hospedeiro vertebrado susceptível à infecção pelo agente e que o mesmo tenha bacteremia alta o suficiente para que o carrapato possa se infectar durante o repasto sanguíneo. A segunda seria a capacidade do vetor em se infectar, manter a infecção por períodos longos sem se alimentar também durante a ecdise e, mesmo assim, ser capaz de infectar um novo hospedeiro vertebrado. Por último, deve haver na área, indivíduos susceptíveis para que a doença possa ser mantida. A presença de reservatórios naturais competentes, diferentes hábitos alimentares entre as espécies de carrapato e variações na virulência das cepas presentes contribuem conjuntamente para que haja diferenças geográficas na distribuição do agente (Swanson *et al.*, 2006).

Atividades dos seres humanos mudam vastamente a paisagem e o meio ambiente, levando a alterações na fauna e produzindo circunstâncias que levam a um aumento das chances de ocorrerem epidemias de anaplasose granulocítica. Tais mudanças resultam na alteração da distribuição espacial de carrapatos e hospedeiros vertebrados e, também, na introdução de seres humanos e animais domésticos, entre eles o equino, no ciclo carrapato-patógeno-animais selvagens. Pela grande variação antigênica e de virulência de acordo com a cepa e com o hospedeiro, a importância de *A. phagocytophilum* como um problema de saúde pública pode variar entre as diversas regiões onde o agente está presente (De la Fuente *et al.*, 2004; Telford III e Goethert, 2004; Foley *et al.*, 2008; Granquist *et al.*, 2010a).

O fator de risco é definido como o atributo de um grupo da população que apresenta maior incidência de uma doença ou agravamento à saúde, em comparação com outros grupos definidos pela ausência ou menor exposição a tal característica (Almeida Filho e Rouquayrol, 2006). Ou seja, nova interação entre hospedeiros, vetores e patógeno é considerado um importante fator de risco para o desenvolvimento da doença em certa região geográfica (De la Fuente *et al.*, 2005; Swansson *et al.*, 2006). Outro fator de risco importante para anaplasose granulocítica é a introdução de um indivíduo infectado e/ou doente em um grupo saudável, porém susceptível. Zhang *et al.* (2008) relataram a transmissão nosocomial de *A. phagocytophilum* em seres humanos, através do sangue e de secreções respiratórias. São poucos os relatos da transmissão natural do agente sem a participação do vetor, mas, sabe-se que ela pode acontecer por exposição ao sangue contaminado e transplacentária, em seres humanos (Bakken *et al.*, 1996; Horowitz *et al.*, 1998).

Situações experimentais, utilizando sangue de animais infectados por *A. phagocytophilum*, conseguiram reproduzir a doença clínica em várias espécies (Foggie, 1966; Stuen e Artursson, 2000; Bjöersdorff *et al.*, 2002; Davies *et al.*, 2011). Este fato reafirma a transmissão através de transfusões de sangue de um paciente a um indivíduo susceptível, sem a participação do carrapato, como vetor. Mais estudos são necessários para que se possa saber qual a importância epidemiológica da transmissão por transfusão de sangue na AGE (Cable e Leiby, 2003; Leiby e Gill, 2004).

Para se conhecer a real situação da doença em diversas regiões do mundo, levantamentos sorológicos e moleculares vêm sendo realizados. Hansen *et al.* (2010), a fim de saberem qual o *status* da afecção na Dinamarca, testaram, através de ELISA para *A. phagocytophilum* e *Borrelia burgdorferi*, 390 equinos das principais regiões do país.

Os autores encontraram 22,3% dos animais positivos para *A. phagocytophilum* e 29,0% para *B. burgdorferi*. Já Salvagni *et al.* (2010), realizaram diagnóstico direto (microscopia óptica), sorológico (ELISA e RIFI) e molecular (PCR), para *A. phagocytophilum* e *Theileria equi*, em 20 equinos da região centro-oeste brasileira. Os pesquisadores constataram 13 (65%) dos animais positivos sorologicamente para *A. phagocytophilum* e 18 (90%) positivos para *T. equi*, utilizando o teste de ELISA. Os testes realizados por meio da RIFI revelaram que 17 (85%) animais foram positivos para *T. equi*. Nenhum animal apresentou resultado positivo tanto para as análises moleculares quanto no diagnóstico direto das afecções. Entretanto, Gavião Prado *et al.* (2011), em um estudo com equídeos de tração da região metropolitana de Belo Horizonte; Minas Gerais, empregando como método diagnóstico a microscopia óptica e a RIFI, obtiveram 64, 91% de animais positivos para *A. phagocytophilum* e 28,06% dos animais apresentando inclusões intracitoplasmáticas ao exame de microscopia óptica. Já Praskova *et al.* (2011), em outro levantamento sorológico realizado na República Tcheca, encontraram uma prevalência de 73% de animais positivos para *A. phagocytophilum*, pela técnica da RIFI. Além disso, os autores constataram uma associação entre o sexo do animal e seu *status* sorológico, sendo as fêmeas mais predispostas a apresentarem a infecção. Não foi encontrada associação entre a idade e taxa de soropositividade. A alta prevalência encontrada no estudo e a baixa ocorrência da doença clínica nos animais do país sugerem uma alta frequência de infecção, podendo ser maior que 1,5 vezes ao ano.

Trabalhando com seres humanos, Park *et al.* (2003) testaram 271 soros de pacientes sul coreanos para detectar anticorpos contra *A. phagocytophilum* e *Ehrlichia chaffeensis* através de RIFI e Western Blot. Utilizando RIFI, 30 (11,1%) e 39 (14,4%) dos soros

foram positivos para *A. phagocytophilum* e *Ehrlichia chaffeensis*, respectivamente. Já por meio da técnica de Western Blot, 24 (8.9%) e 29 (10.7%) dos soros foram positivos para *A. phagocytophilum* e *Ehrlichia chaffeensis*, respectivamente. Tais resultados demonstraram a ocorrência de ambos patógenos em seres humanos na Coreia do Sul.

O levantamento sorológico de animais selvagens e considerados reservatórios do agente é de extrema importância para saber a distribuição do agente em uma determinada região. Magnarelli *et al.* (2010) analisaram 224 soros de cervos de cauda branca (*Odocoileus virginianus*), por meio de RIFI e ELISA, para detecção de anticorpos contra *B. burgdorferi* e *A. phagocytophilum*. As amostras foram coletadas em 44 cidades do estado de Connecticut, Estados Unidos, durante 11 anos. Constatou-se que 124 das 224 amostras analisadas eram positivas para *A. phagocytophilum* utilizando-se RIFI como método diagnóstico. Os autores analisaram, ainda, soro de oito cervos que foram capturados e marcados e tiveram o sangue coletado. Os mesmos cervos foram recapturados e passaram pelo mesmo procedimento quando capturados pela primeira vez, após algumas recapturas os autores haviam coletado 18 amostras destes mesmos oito animais. As análises mostraram que não houve grande variação nos títulos de anticorpos para esses animais, apesar de os intervalos entre captura, soltura e recaptura variarem de 17 dias a cinco anos. Os cervos do estado de Connecticut estão em constante contato com o vetor e conseqüentemente com o agente da doença no país.

Existem regiões onde há uma estabilidade enzoótica, ou seja, um estado natural de equilíbrio entre a presença de um patógeno transmissível e de hospedeiros razoavelmente resistentes ao patógeno. Normalmente esse equilíbrio é encontrado na natureza como resultado de uma adaptação dos hospedeiros ao longo da vida,

animais recém-nascidos se infectam por uma cepa virulenta e se tornam imunes sem demonstrar sintomatologia clínica da doença e os adultos mantêm a imunidade através de contatos periódicos com o agente (Praskova *et al.*, 2011). Esta situação epidemiológica é capaz de explicar os resultados encontrados por Magnarelli *et al.* (2003) no estado de Connecticut, nos Estados Unidos e por De la Fuente (2005) na região central da Espanha.

2.5. Fisiopatogenia

Davies *et al.* (2011) baseando-se na hipótese de que a resposta imune do hospedeiro, principalmente o equilíbrio entre as respostas pró e anti inflamatórias, são responsáveis pela sintomatologia clínica e pelas alterações hematológicas observadas na anaplasiose granulocítica equina, realizaram um estudo utilizando oito equinos. Os autores infectaram os animais e os dividiram em dois grupos, tratados com dexametasona (40 mg por animal) entre os dias 4 e 8 após a infecção e não tratados. Todos os animais, de ambos os grupos, foram positivos para *A. phagocytophilum* a partir do quarto dia de infecção e assim permaneceram até o 12º dia. O diagnóstico foi feito através de RT-PCR e por microscopia óptica. Não houve diferença do número de células infectadas no pico da bacteremia entre os grupos, mas a carga bacteriana ao longo de todo o curso da doença foi maior para o grupo dos animais tratados. Também foi observado que, apesar de todos os animais dos dois grupos apresentarem os mesmos sinais clínicos (anorexia moderada, letargia, relutância em mover e icterícia), os animais tratados apresentaram edema de membros menos pronunciado e mais tardiamente. Em relação à resposta imune, não houve alteração significativa da transcrição das citocinas pró-inflamatórias nos animais tratados, durante os quatro dias de tratamento. Já no grupo não tratado houve redução das citocinas anti-inflamatórias apenas no sétimo dia pós-infecção. Levando em

consideração a razão de apenas duas citocinas (IL-10 e INF- γ), os animais tratados apresentaram uma diminuição da resposta pró-inflamatória entre os dias quatro e nove. Os autores concluíram que a modulação da resposta inflamatória através do uso de dexametasona não foi capaz de diminuir significativamente as alterações hematológicas encontradas durante a anaplasiose granulocítica equina.

Lepidi *et al.* (2000) ao compararem os aspectos patológicos da infecção e a distribuição tecidual do agente em seres humanos, equinos e ovelhas, observaram que os sete pacientes humanos, naturalmente infectados apresentaram febre, dores de cabeça, dores no corpo, leucopenia, trombocitopenia e aumento das enzimas hepáticas (alanina aminotransferase [ALT] e aspartato aminotransferase [AST]). Ao exame histopatológico esplênico de quatro dos sete pacientes foi encontrado depleção linfóide, eritro e leucofagocitose, e aumento do número de célula apoptóticas, a medula óssea de dois pacientes apresentavam-se normocelulares e com presença de todos os precursores hematopoiéticos em números esperados. Amostras histológicas do fígado de quatro pacientes apresentavam infiltrados linfohistiocitários periportal moderados, hepatite lobular linfohistiocitária moderada e em dois casos houve hiperplasia de células de Kupfer. Os equinos experimentalmente infectados apresentaram sintomatologia clínica típica e evidência laboratorial de lesão hepática. À histopatologia, os principais achados foram lesões inflamatórias em vários órgãos: pulmões, vasos sanguíneos, rins e intestinos. O baço apresentava depleção linfóide moderada e congestão eritrocítica da polpa vermelha. Uma única ovelha utilizada no estudo foi infectada experimentalmente e eutanasiada após cinco dias de infecção apresentando sintomatologia clínica esperada para a doença, presença de inclusões em neutrófilos circulantes e depleção linfóide do baço, à microscopia.

À imunohistoquímica, foram observados neutrófilos infectados no lúmen de vasos sanguíneos esplênicos e na microvasculatura pulmonar de equinos e seres humanos. A presença da bactéria nos pulmões foi associada à lesão alveolar.

Biópsias de pele realizadas no local onde houve a picada do vetor (*Ixodes ricinus*) de 38 cordeiros foram analisadas através de histologia e imunohistoquímica por Granquist *et al.* (2010b). Os exames revelaram que 35 dos 38 apresentavam lesões inflamatórias caracterizadas por espessamento de epiderme, fibroplasia e infiltrado inflamatório perivascular. Em 17 das 38 amostras analisadas por imunohistoquímica foram observada a presença de agente etiológico, que estavam associados a infiltrados inflamatórios, principalmente dentro de neutrófilos e macrófagos. Também foram encontrados nas túnicas médias e adventícia e raramente na túnica íntima associadas à vasculite. Os autores encontraram correlação entre o grau de inflamação do local da picada do carrapato e o número de *A. phagocytophilum* encontrados na lesão por imunohistoquímica. O estudo sugere, mas não confirma a participação de neutrófilos, macrófagos e células endoteliais na infecção primária.

Pesquisadores concordam com a teoria de que a produção de citocinas pró-inflamatórias participa da patogenia da hipertermia, neutropenia, trombocitopenia e lesão tecidual de animais e seres humanos infectados, principalmente porque a bactéria induz a uma resposta pró-inflamatória modulada por linfócitos Th1, com grande produção de interferon gama (INF- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β) e interleucina 8 (IL-8). Tais citocinas já são conhecidas por serem responsáveis por causarem alterações como as citadas acima (Lepidi *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2007; Davies *et al.*, 2011). Dumler *et al.* (2000) ao

pesquisarem a produção de citocinas séricas em pacientes humanos, durante a fase aguda da doença, constataram aumento de INF- γ , IL-1 β e Interleucina 10 (IL-10) quando comparados com a fase de convalescença ou com indivíduos hígidos, além de baixos níveis de TNF- α e Interleucina 4 (IL-4).

Klein *et al.* (2000) ao pesquisarem a produção *in vitro* de citocinas e quimiocinas por cultivos celulares HL-60, infectados por *A. phagocytophilum*, recebendo ou não tratamento com DMSO que resulta na diferenciação das células promielocíticas HL-60 em células da linhagem neutrofílica, verificaram que a infecção não estimula a produção *in vitro* de citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) ou TNF- α . Ocorreu produção significativa de IL-8, proteína inflamatória de macrófago 1 alfa (MIP-1 α) e beta (MIP-1 β), proteína quimiotática para monócitos 1 (MCP-1) e RANTES (*Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*), quimiocinas associadas a mielossupressão, e importantes no recrutamento de leucócitos em vários tecidos.

Choi *et al.* (2007) utilizando camundongos como modelo experimental, demonstraram que o INF- γ , produzido em maiores quantidades durante a fase aguda da doença, está relacionado com o aumento de lesões hepáticas. Os pesquisadores observaram que os camundongos apresentavam lesões caracterizadas por pequenos acúmulos difusos de linfócitos, macrófagos e, raramente, neutrófilos, os quais se apresentavam ou não, apoptóticos.

Artursson *et al.* (1999) acompanharam clínica e sorologicamente 45 equinos positivos para *Ehlichia equi* (*A. phagocytophilum*) durante aproximadamente um ano. A primeira sorologia, realizada por reação de imunofluorescência indireta (RIFI) durante a fase aguda da doença, demonstrou que dos 45 animais, 20 foram

considerados negativos (titulação \leq 1:10) e os outros 19 animais foram considerados positivos (titulação \geq 1:40). Ao se repetir os exames, oito meses após a fase aguda, apenas 24 animais estavam disponíveis e destes apenas seis foram considerados sorologicamente negativos (titulação \leq 1:10). Dos 24 animais analisados após oito meses, 10 foram escolhidos para serem acompanhados até os 15 meses após a fase aguda, mensalmente, e verificou-se que todos apresentaram maior titulação um mês após o pico de bacteremia e ao final de 15 meses, nove apresentavam-se negativos e apenas um animal apresentava titulação de 1:80. Os autores concluíram que a maioria dos animais tornaram-se sorologicamente negativos oito meses após a infecção, independente da duração da sintomatologia clínica. Baseando-se nesses resultados puderam inferir que os animais considerados positivos em levantamentos sorológicos estão com infecção subclínica ou em estado convalescente.

2.6. Manifestações clínicas

A anaplasmoze granulocítica equina (AGE), antigamente conhecida como erliquiose granulocítica equina, foi descrita pela primeira vez no Estado da Califórnia, Estados Unidos da América (Gribble, 1969; Stannard *et al.*, 1969). Após receberem cinco animais procedentes da mesma área apresentando sinais clínicos comuns, os autores inocularam sangue dos animais afetados em outros dois animais, que apresentaram a mesma sintomatologia. Para esclarecer a natureza infecciosa da doença, os autores inocularam 43 equinos e quatro muares. O critério utilizado, para considerar que os animais inoculados foram ou não infectados, foi a presença de inclusões intracitoplasmáticas em granulócitos. Assim, dos 47 animais utilizados, 40 equinos e três muares foram considerados infectados. Além das inclusões intracitoplasmáticas, os animais apresentaram febre, depressão, anorexia, edema subcutâneo e de membros e

relutância em se mover. Em nenhum dos muares foi observado edema. O exame hematológico foi caracterizado por leucopenia, trombocitopenia, plasma ictérico, anemia e a presença das inclusões (Gribble, 1969).

A AGE é caracterizada por febre, depressão, anorexia, edema de membros, ataxia, presença de petéquias. Leucopenia, trombocitopenia e anemia são os principais achados hematológicos, o que pode levar a infecções secundárias oportunistas (Gribble, 1969; Stannard *et al.*, 1969; Lepidi *et al.*, 2000; Dumler *et al.*, 2001; Davies *et al.*, 2011). A trombocitopenia é um dos achados mais característicos da AGE, podendo levar a petéquias, equimoses e até pequenos sangramentos através de mucosas. Não se sabe qual o mecanismo exato para a diminuição do número de plaquetas, mas supõe-se que seja por meio da destruição imunomediada, fagocitose por macrófagos e diminuição da produção na medula óssea (Lepidi, 2000; Adaszek e Winiarczyk, 2011).

Sabe-se que cepas diferentes são capazes de induzirem sintomatologia clínica diferente nos hospedeiros (Foley *et al.*, 2008; Granquist *et al.*, 2010a; Silaghi *et al.*, 2011). Para verificar se há diferença na sintomatologia clínica entre indivíduos, Stuen *et al.* (2011) realizaram um estudo utilizando cordeiros de duas raças noruegueses diferentes, *Norwegian White* e *Old Norse*. Os pesquisadores infectaram experimentalmente 10 cordeiros de cada raça, em dois anos consecutivos, utilizando a mesma cepa de *A. phagocytophilum* e seis cordeiros de cada raça foram utilizados como grupos controle. Verificou-se que houve diferença entre as raças no curso da doença, sendo significativas as temperaturas corporais e a taxa de infecção, ambas superiores para a raça *Norwegian White*. Em bovinos há imunidade adquirida após desenvolvimento de doença clínica ou contato estreito com *A. phagocytophilum*,

sendo que ela não é capaz de evitar a infecção pela bactéria, mas capaz de prevenir o aparecimento de sintomatologia clínica (Stuen *et al.*, 2005).

Stuen e Artursson (2000) utilizaram cordeiros para estudarem se a sintomatologia clínica apresentada pelos animais infectados experimentalmente era proporcional à dose infectante. No estudo foram utilizados 21 cordeiros de quatro meses de idade de duas raças diferentes. Apenas um cordeiro infectado foi utilizado como doador de sangue sabidamente infectado pelo agente. Dos 20 cordeiros restantes, 16 foram inoculados com doses infectantes diferentes: $1,3 \times 10^5$ células infectadas (grupo 1), 43 células infectadas (grupo 2), 4,3 células infectadas (grupo 3) e 1,3 células infectadas (grupo 4). Quatro cordeiros não foram inoculados e foram destinados ao grupo controle. Não foram observados, pelos autores, alterações tanto clínica quanto hematológicas nos cordeiros do grupo 4, que receberam 1.3 células infectadas. Estes animais também se apresentavam negativos para PCR até o vigésimo primeiro dia após a infecção. Nos animais dos outros três grupos (1, 2 e 3), observou-se febre superior a 40°C, presença de inclusões intracitoplasmáticas características do agente e neutropenia. O período de incubação foi de dois a quatro dias, sendo consideravelmente menor no grupo 1, que recebeu a maior quantidade de células infectadas. Após avaliação estatística, os autores concluíram que não houve diferença, entre os grupos, dos sinais clínicos apresentados. Sendo assim, a sintomatologia clínica da anaplasmoze granulocítica, não foi considerada dose dependente.

Um experimento realizado com cordeiros verificou que há diferença nos sinais clínicos de acordo com as cepas utilizadas. No experimento, cinco cordeiros foram inoculados experimentalmente com uma cepa de *A. phagocytophilum* (variante 1) e outros cinco foram inoculados com outra

cepa (variante 2). Os cordeiros infectados com a variante 1 apresentaram hipertermia por um maior período, bem como, maior intervalo entre a infecção e a detecção de bacteremia. A neutropenia foi mais severa quando comparada com a dos cordeiros infectados com a variante 2. Esse resultado corrobora com a hipótese de que cepas diferentes da bactéria são capazes de causarem sinais clínicos diferentes e até mesmo não causar doença clínica em alguns hospedeiros. Ambas variantes foram capazes de estabelecer infecção persistente por até seis meses pós-inoculação, havendo diferenças na frequência de bacteremia e no número de organismos circulantes durante a bacteremia, sendo as duas maiores para a variante 1 (Granquist *et al.*, 2010a).

Em seres humanos os sinais clínicos se assemelham ao dos equinos, caracterizados por hipertermia de início súbito, cefaleia, mialgia e artralgia. Alguns pacientes podem apresentar tosse, náuseas, vômitos, diarreia, dores abdominais e anorexia. Dentre as complicações advindas da infecção pode-se citar coagulação intravascular disseminada, dificuldade respiratória, neuropatia periférica, pancreatite, rabdomiólise, além de choque séptico decorrente da infecção (Oteo e Brouqui, 2005; Mezerville e Padilla-Cuadra, 2007).

2.7. Diagnóstico

O diagnóstico, em qualquer modelo epidemiológico, é de extrema importância para que se possa, tanto tratar individualmente o paciente quanto estudar quais são os grupos e fatores de risco de tal doença (Almeida Filho e Rouquayrol, 2006). Sendo assim, para anaplasmoze, há vários métodos diagnósticos que auxiliam no entendimento do processo saúde-doença.

Os principais métodos utilizados por profissionais e pesquisadores para anaplasmoze granulocítica são: microscopia óptica, sorologia e biologia molecular

(Dagnone *et al.*, 2001; de la Fuente *et al.*, 2005; Zimmerman e Crisman, 2008; Granquist *et al.*, 2010a; Stuen *et al.*, 2011). É importante lembrar que nenhum meio diagnóstico auxiliar tem validade se não for utilizado em conjunto com o exame clínico completo do paciente (Artursson *et al.*, 1999).

Os sinais clínicos apresentados pelos equinos acometidos (hipertermia, depressão, anorexia, edema de membros, fraqueza e relutância em se locomover), são considerados muito vagos e podem ser facilmente confundidos com outras doenças. Assim, se faz necessária a realização de exame clínico associado a métodos laboratoriais complementares para se chegar ao diagnóstico definitivo da anaplasmoze granulocítica equina (Aguero-Rosenfeld, 2002).

2.7.1. Exame parasitológico

A visualização das inclusões intracitoplasmáticas em leucócitos, principalmente os neutrófilos é o diagnóstico definitivo e considerado *padrão ouro* para anaplasmoze granulocítica (Dagnone *et al.*, 2001). Para realização do método utilizam-se lâminas de capa leucocitária, coradas pela técnica de Romanovsky, Giemsa ou May-Grumwald-Giemsa, que são lidas em imersão em óleo em aumento de 1000 vezes. Para o cálculo da taxa de infecção são avaliados 400 neutrófilos, anotando-se a quantidade desses que apresentam mórulas e então faz-se a estimativa da taxa de infecção (Stuen *et al.*, 2011). Segundo Aguero-Rosenfeld (2002) o exame de capa leucocitária apresenta o limitação de possuir baixa sensibilidade (~60%), apesar da alta especificidade.

2.7.2. Exames sorológicos

Sorologia é definida como a detecção de anticorpos contra um determinado epítipo no soro ou plasma de um paciente.

Assim sendo, foram desenvolvidos vários ensaios sorológicos a fim de detectar tais anticorpos. No diagnóstico de anaplasmoze granulocítica são utilizados o *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e, a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) (Zimmerman e Crisman, 2008).

Para a maioria dos exames sorológicos, amostras pareadas, coletadas em certo período de tempo (normalmente 1 a 3 semanas), são necessárias para o diagnóstico preciso de doenças infecciosas, como é o caso da anaplasmoze (Artursson *et al.*, 1999; Zimmerman e Crisman, 2008).

O ELISA é um teste imunológico sensível e versátil que utiliza anticorpos conjugados a enzimas e antígenos ou anticorpos ligados a um suporte sólido. São mensuradas mudanças na atividade enzimática durante a reação e, tais mudanças, estão diretamente relacionadas à ligação e ao tipo de ligação dos anticorpos conjugados aos antígenos ou anticorpos em uma base sólida (Paulie *et al.*, 2005).

A reação de imunofluorescência indireta é um teste que se baseia na detecção de anticorpos contra epítipos. A forma de obtenção dos antígenos varia entre pesquisadores e laboratórios, que podem utilizar culturas celulares de *A. phagocytophilum* obtidos de animais infectados natural ou experimentalmente (Ferreira e Carvalho, 1973; Jongejan *et al.*, 1989; Artursson *et al.*, 1999; Zimmerman e Crisman, 2008). Segundo Zimmerman e Crisman (2008), a técnica possui sensibilidade e especificidade altas e é de rápida realização. A maioria dos levantamentos soropidemiológicos realizados para *A. phagocytophilum* utilizam a técnica de RIFI devido sua praticidade, baixo custo e rapidez (Zimmerman e Crisman, 2008; Hansen *et al.*, 2010; Salvagni *et al.*, 2010; Praskova *et al.*, 2011).

2.7.3. Exame molecular: reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) sintetiza artificialmente, através de reações enzimáticas, sequências de Ácido Desoxirribonucleico (DNA), utilizando oligonucleotídeos, conhecidos como *primers* para iniciar o processo. Assumindo uma eficiência de 100%, após 20 ciclos, a reação é capaz de multiplicar uma única sequência de DNA por 2². É considerada uma técnica simples, rápida e totalmente automatizada, o que justifica seu largo emprego no auxílio de diagnósticos de certas doenças virais, bacterianas ou fúngicas (Ehrlich, 1989; Dumler *et al.*, 2001; Silaghi *et al.*, 2012).

As amostras utilizadas para realização de PCR podem ser obtidas de fluidos corporais ou por meio de biópsias de tecidos. No diagnóstico de anaplasmose granulocítica, são utilizados, principalmente, sangue e capa leucocitária, mas tecidos vascular, pulmonar ou hepático também podem ser utilizados (Massung *et al.*, 1998; Lepidi *et al.*, 2000; Granquist *et al.*, 2010b; Sen *et al.*, 2011).

2.8. Tratamento

O grupo das tetraciclina tem sido o mais recomendado para o tratamento clínico da doença, sendo a tetraciclina o antibiótico de escolha para animais domésticos e a doxiciclina para humanos, por serem mais efetivas no tratamento de micro organismos intracelulares (Stuen e Bergström, 2001; Mezerville e Padilla-Cuadra, 2007, Dzięgiel *et al.*, 2013).

Segundo McQuiston *et al.* (2003), o uso da oxitetraciclina para o tratamento de equinos é mais indicado e deve ser feito na dose de 7mg/kg, por via intravenosa, SID, por pelo menos oito dias. Adaszek *et al.* (2009) relataram o uso de oxitetraciclina intravenosa em um caso de AGE. O animal recebeu o tratamento antibiótico, na dose de 8,0 mg/kg, associado a dexametasona

(20mg), apresentando rápida melhora do quadro clínico. Já Siska *et al.* (2013), após atendimento e diagnóstico de AGE a seis equinos no hospital veterinário da Universidade de Purdue, Estados Unidos da América, utilizou, no tratamento de cinco animais, a oxitetraciclina na dose de 6,6 a 10 mg/kg, por via intravenosa, BID ou SID, durante cinco a sete dias, associada a flunexin meglumine (1,0 mg/kg, IV, SID). O animal restante foi tratado na propriedade, mas diferentemente dos outros animais, recebeu doxiciclina na dose de 10 mg/kg, via oral, BID, durante 7 dias e também associada a flunexin meglumine. Os sinais clínicos não foram observados nos animais após 24 horas do início do tratamento, em ambos os protocolos utilizados.

Franzén *et al.* (2009) demonstraram, através de PCR, a persistência de infecção em quatro equinos procedentes da Suécia. Esses animais foram infectados experimentalmente e se recuperaram espontaneamente, e após imunossupressão com dexametasona ou após estresse (transporte), foi possível detectar a presença do agente na corrente sanguínea. Mesmo após o achado, os autores consideram que ainda não existem evidências suficientes para confirmar a presença da forma crônica após o tratamento, em equinos.

Morales *et al.* (2012) verificaram, em um estudo com 105 equinos da raça Puro Sangue de Corrida que apresentaram sintomatologia clínica para hemoparasitoses (Piroplasmose e/ou Tripanossomiase), que a oxitetraciclina é eficaz no tratamento destas enfermidades. O problema encontrado pelos pesquisadores foi a ocorrência de miosite cervical no local de aplicação devido ao grande volume utilizado do fármaco. Em contrapartida, Costa *et al.* (2004) utilizaram a oxitetraciclina em apresentações de longa ação, por via intravenosa em 24 equídeos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina, sem que houvesse qualquer tipo de reação adversa.

Os autores ainda chamam a atenção de que o fármaco, por causar grande irritação tecidual, não deve ser utilizado pela via intramuscular e a veia jugular deve ser mantida cateterizada durante todo o período de tratamento.

A fim de avaliar a eficiência de duas apresentações de tetraciclina, de longa e curta ação, no tratamento da anaplasiose em cordeiros, Stuen e Bergström (2001) infectaram experimentalmente 10 cordeiros de um mês de vida. Quatro cordeiros receberam tratamento com a apresentação de longa ação, quatro receberam o medicamento de curta ação e dois cordeiros foram utilizados como grupo controle, não recebendo nenhum tratamento após a inoculação do agente. Os animais foram monitorados quanto à presença de sintomatologia clínica, presença da bactéria na corrente sanguínea, testada através de microscopia óptica e por PCR e sorologicamente por RIFI. Todos os animais recuperaram da doença clínica, mas não foram encontradas diferenças na utilização de ambas as apresentações. Um mês depois de terminados os tratamentos, 250 ml de sangue de cada animal foram coletados e inoculados em outro animal susceptível. Dois dos oito animais inoculados apresentaram febre, bacteremia e soroconversão. Tais achados mostram que a oxitetraciclina é efetiva durante a doença clínica, reduzindo a febre e a bacteremia, mas ineficiente em eliminar a infecção.

2.9. Prevenção e controle

Por serem considerados os principais transmissores do agente nos países europeus, Estados Unidos da América e no oriente, as formas de prevenção e controle da doença focam-se no combate aos carrapatos (Stuen, 2007; Stuen *et al.*, 2012). No Brasil, *Amblyomma cajennense* e *Rhipicephalus Boophilus microplus* são os carrapatos mais comuns, e, apesar de não se saber qual o vetor do agente no país, há hipóteses de que

eles possam ser responsáveis pela transmissão, sendo importante o controle dos mesmos.

Atualmente, estratégias de controle da doença em países Europeus baseiam-se na redução da infestação por carrapatos, utilizando acaricidas químicos que, em sua maioria, são representados por piretróides aplicados *pour-on* ou na forma de banhos pos aspersão do medicamento. Outra forma de tratamento profilático é a aplicação de tetraciclina de longa ação antes da mudança de animais de áreas livres da doença para áreas endêmicas (Brodie *et al.*, 1988; Stuen *et al.*, 2012).

No Brasil, Labruna *et al.* (2004) realizaram um trabalho utilizando um método de controle estratégico de *Amblyomma cajennense* em equinos, verificaram que a aplicação de piretróides nos meses de abril a outubro, quando há maior infestação por larvas e ninfas é mais eficaz na diminuição do número de adultos na próxima geração do que quando utilizado apenas nos meses de abril a julho, quando há maior infestação por larvas. O estudo demonstrou uma diminuição de 89,7% do número de carrapatos adultos no grupo tratado de abril a outubro, em contrapartida, o grupo tratado de abril a julho apresentou uma diminuição de 58,6%, apenas.

Cunha *et al.* (2008) a fim de verificar alterações clínicas, de hematologia e de bioquímica sérica dos animais, trabalharam com 16 equinos apresentando alta carga parasitária em Palmas, Minas Gerais, durante os anos de 2003 e 2008. Os autores verificaram que não houve alterações clínicas ou mudanças comportamentais nos equinos submetidos ao controle estratégico de *A. cajennense*. Também foi observada melhora do eritrograma dos animais após os tratamentos com banhos utilizando piretróides, mas não houve alterações nos leucogramas. A melhora do eritrograma dos animais foi justificada pela diminuição da

infestação por carrapatos, que são grandes espoliadores sanguíneos. Não houve alterações significativas na bioquímica sérica. O estudo mostrou a segurança do uso de piretróides como método de controle de carrapatos, quando utilizado conforme orientação do fabricante.

Stuen *et al.* (2012) testaram a hipótese de que tratamento a base de piretróides reduz a infestação por carrapato *I. ricinus* e consequentemente a infecção por *A. phagocytophilum*. Para isso utilizaram 40 cordeiros, 20 pares de irmãos gêmeos, que constituíam os grupos experimentais: tratados com flumetrin e não tratados (controle). Todos os cordeiros foram avaliados a cada 14 dias a procura de carrapatos, coleta de sangue, pesagem e aferição da temperatura retal. O tratamento de um dos grupos foi realizado também a cada 14 dias até 126 dias de experimento. Os autores encontraram, no final do estudo, que 14 animais soro converteram, sendo seis do grupo dos tratados e oito do grupo controle. O trabalho mostra que a eficácia do tratamento com piretróides na redução da infecção por *A. phagocytophilum* é reduzida, pois pode haver transmissão durante a janela entre o carrapato se fixar ao hospedeiro e o período de ação do medicamento, mas diminui o número de animais parasitados por carrapatos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos de acordo com os conceitos e preceitos éticos, após aprovação no CEUA UFMG sob protocolo nº 167/2013 (Anexo 1). Os proprietários assinaram termo de consentimento para utilização dos animais nesta pesquisa (Anexo 2).

3.1. Avaliação hematológica, sorológica e molecular de equinos de tração do município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

3.1.1. Localização geográfica e condições climáticas

O município de Belo Horizonte se encontra no estado de Minas Gerais, latitude - 19.8157, longitude -43.9542, a 19° 48' 57" Sul e 43° 57' 15". Possui altitude de 858 metros a cima do nível do mar. Seu clima é considerado subtropical úmido.

3.1.2. Delineamento e seleção dos animais

Foi realizado um estudo descritivo e transversal, utilizando 224 animais de tração oriundos de Belo Horizonte, Minas Gerais. Tais animais são pertencentes aos carroceiros do município, devidamente inscritos no projeto de extensão “Correção Ambiental e Reciclagem com Carroceiros de Belo Horizonte” (Projeto Carroceiros). Este é um projeto de extensão da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais em parceria com a Prefeitura Municipal de Belo Horizonte. Semanalmente são realizadas visitas às Unidades de Recolhimento de Pequenos Volumes (URPVs), nas quais os carroceiros depositam entulhos da construção civil, madeira, podas de árvores e jardins, pneus e móveis descartados.

Durante as visitas os estudantes de graduação do curso de Medicina Veterinária realizam o cadastramento e marcação, após a realização de um questionário socioeconômico com o proprietário. Os animais recém-cadastrados e os previamente cadastrados recebem vacinação antirrábica e são feitas as coletas de sangue para realização de exames sorológicos e hematológicos. Além da vacinação dos animais, os carroceiros têm direito a assistência médico veterinária por menores custos no Hospital Veterinário da Escola de

Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (HV-EV/UFGM).

O município de Belo Horizonte é dividido, desde 1983, em nove unidades administrativas, denominadas Regionais. As amostras utilizadas no estudo são provenientes de oito Regionais Administrativas, com exceção da Regional Centro-Sul, devido ao fato de os carroceiros serem proibidos de circularem dentro do perímetro urbano delimitado pela Avenida do Contorno.

3.1.3. Coleta e processamento do material

A coleta e o processamento do material foram semelhantes nos experimentos, exceto a coleta dos carrapatos, realizada apenas nas propriedades estudadas.

Dos animais que apresentavam infestação por carrapatos foram coletados por amostragem aleatória e conservados em álcool 70%, para posterior identificação. No laboratório de Protozoologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFGM os carrapatos coletados foram identificados (Aragão e Fonseca, 1961).

A coleta do sangue foi realizada através de venulopunção da jugular externa, após contenção dos animais em tronco e antisepsia do local, utilizando algodão embebido em álcool 70%. Foram coletados dois tubos a vácuo, sendo um deles sem anticoagulante e outro contendo ácido etilenodiamônio tetra-acético (EDTA).

3.1.3.1. Hemograma e bioquímica sérica

No mesmo dia da coleta de sangue, a partir do tubo com EDTA, foram confeccionados, em duplicata, esfregaços sanguíneos, corados pelo método de Romanowsky¹, para exame celular diferencial. Com o auxílio de

uma centrífuga de microhematócrito² foram preparados microtubos utilizados para a determinação do hematócrito, das proteínas plasmáticas totais, do fibrinogênio e para a confecção de esfregaços com a capa de leucócitos, também em duplicata. A hematimetria foi determinada em contador automático de células³, através do método de impedância. Os esfregaços sanguíneos e de capa leucocitária foram confeccionados de acordo com a técnica descrita por Cowell e Tyler (2002) e secos à temperatura ambiente.

A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em microscópio óptico e sob imersão. Foram contados 100 leucócitos ao longo do corpo do esfregaço sanguíneo. Após a obtenção dos valores relativos, foram calculados os valores absolutos.

Para determinação do fibrinogênio utilizou-se a técnica descrita por Kaneko *et al.* (2008) e realizadas duas leituras, através de refratometria, do plasma. A primeira, logo após centrifugação do tubo capilar e a segunda após aquecimento do tubo capilar a 56° C por três minutos e nova centrifugação. O valor do fibrinogênio foi obtido pela diferença entre as duas leituras.

O restante do sangue total foi alíquotado em tubos plásticos cônicos de 0,5 ml e armazenados em freezer a temperatura de -20°C para posterior análise da presença do *A. phagocytophilum*, por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Após a retração do coágulo, o tubo sem anticoagulante foi centrifugado⁴ a 3000 rotações por minuto (rpm) (1106,82 x g), durante cinco minutos, e o soro obtido foi congelado a -20°C, em pelo menos seis alíquotas de 0,5 ml.

¹ Panótico para colorações de esfregaço – Laborclin – Pinhais, Brasil

² H-240 - CentriBio

³ Abacus Júnior Vet – Hematology Analyser, Diatron – São Paulo, Brasil

⁴ Excelsa Baby – Fanem Ltda – São Paulo, Brasil

O soro foi analisado em aparelho semiautomático de bioquímica sanguínea⁵, com *kits* específicos⁶. As análises realizadas constaram do perfil renal (uréia e creatinina) e hepático (Gama glutamiltransferase [GGT], Aspartato aminotransferase [AST], Alanina aminotransferase [ALT], Fosfatase alcalina [FA], albumina e proteínas totais).

3.1.4. Métodos diagnósticos

3.1.4.1. Exame direto

As lâminas de esfregaço de capa leucocitária foram analisadas em microscopia óptica, em aumento de 1000 vezes e em objetiva de imersão para procura de inclusões intracitoplasmáticas de *A. phagocytophilum* em neutrófilos. A leitura foi feita em toda a extensão do esfregaço, totalizando a contagem de 100 neutrófilos. Foi considerado positivo o animal que apresentasse inclusões intracitoplasmáticas, independentemente do percentual de células infectadas.

3.1.4.2. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

Foram utilizadas as amostras de soro congeladas a -20°C pertencentes à soroteca do Projeto Carroceiros. Lâminas de vidro próprias para RIFI⁷, contendo 12 poços que foram previamente fixados com o antígeno proveniente do cultivo de *Anaplasma phagocytophilum* mantido em IDE8 no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. A técnica utilizada para

fabricação e fixação do antígeno foi adaptada da descrita por Aguiar *et al.* (2007).

Após padronização prévia da técnica, as amostras foram diluídas na proporção de 1:160, em salina fosfatada tamponada 1x (PBS 1x), que foi considerado o ponto de corte para a análise, e então pipetadas nos poços. Permitiu-se que o soro diluído reagisse com o antígeno da lâmina por 30 minutos, em câmara úmida a 37°C. Após esse tempo as lâminas passaram por três lavagens, a primeira e a segunda com PBS 1x e a última com água destilada, sendo que, depois de cada lavagem as lâminas foram submergidas em PBS 1x e água destilada, respectivamente, durante três minutos. As lâminas foram secas a temperatura ambiente. Após secagem, foi pipetado em cada poço, o conjugado anti IgG equina⁸, previamente diluído em Azul de Evans na proporção de 1:160, e repetiu-se a primeira reação exatamente como descrita acima. Ao final, as lâminas foram cobertas com glicerina alcalina e lamínula e lidas em microscópio de epifluorescência⁹. As amostras foram consideradas positivas, quando, à microscopia de fluorescências o antígeno apresentou fluorescência, na diluição de 1:160, que foi utilizada como ponto de corte neste experimento (Fig. 1 e 2). Utilizou-se PBS 1x como o branco e o soro de um animal sabidamente positivo para o agente foi utilizado como controle positivo para todas as reações.

Após a triagem, as amostras consideradas positivas, foram novamente diluídas para se avaliar a titulação do IgG desses animais. As diluições utilizadas foram 1:320, 1:640 e 1:1280.

⁵ Analisador Semi automático

⁶ Bioclin – Quibisa Química Básica – Belo Horizonte, Brasil

⁷ Perfecta – São Paulo - Brasil

⁸ Anti-Horse IgG (whole molecule) – FITC antibody produced in rabbit – Sigma-Aldrich- St. Louis, USA

⁹ Microscópio

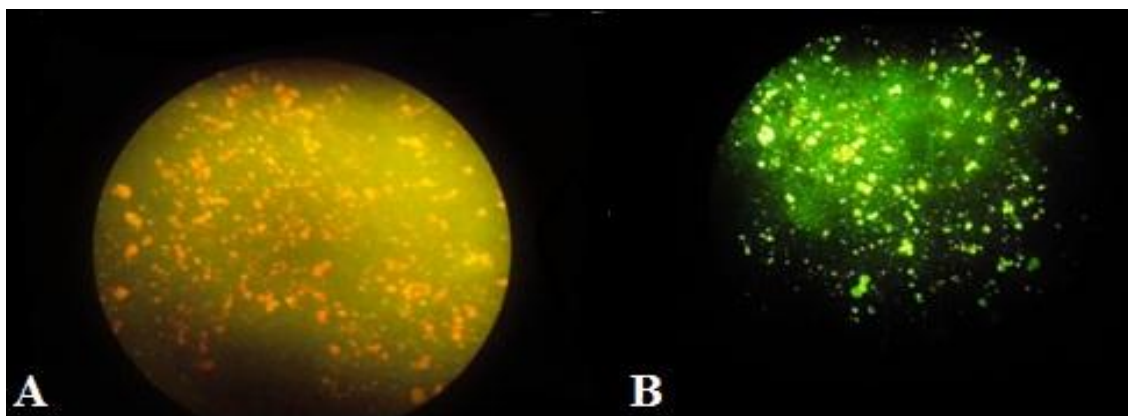


Figura 1: A: Reação de Imunofluorescência Indireta negativa. Observar as células IDE8 contendo inclusões de *A. phagocytophilum* sem ligação do conjugado. B: Reação de Imunofluorescência Indireta positiva. Observar fluorescência do conjugado ligado à membrana citoplasmática do *A. phagocytophilum*. Aumento: 400x

3.1.4.3. Avaliação molecular

3.1.4.3.1. Extração do DNA

Para realização da PCR foram utilizadas as amostras de sangue total, alíquotadas e congeladas em *freezer* a -20° . A extração de DNA das amostras foi realizada com o kit Wizard® Genomic DNA Purification¹⁰, de acordo com o recomendado pelo fabricante para extração de amostras de 300 μ L.

3.1.4.3.2. Amplificação do DNA

Para amplificação do DNA extraído das amostras foi utilizada a técnica de *nested* PCR, com o objetivo de aumentar a sensibilidade do teste. Esta técnica se baseia em submeter as amostras a duas reações de amplificação do alvo desejado. Durante a primeira reação há amplificação do alvo contendo maior número de pares de base e na segunda há amplificação de uma parte específica de pares de base contidos dentro do que foi amplificado na primeira reação.

Os iniciadores utilizados, tanto para a primeira quanto para a segunda reação, foram aqueles utilizados por Silaghi *et al.* (2012) e estão descritos na Tab. 1. Os iniciadores utilizados possuíam como alvo o gene *msp4*, responsável pela expressão de uma proteína de membrana do agente de mesmo nome.

A amplificação foi feita utilizando-se termociclador automático¹¹ e o programa utilizado encontra-se descrito na Tab. 2. Como controle positivo utilizou-se DNA extraído a partir de cultura celular contendo o agente e como brancos da primeira e da segunda reação utilizou-se aqui miliequivalente. Para as reações, utilizou-se 13,5 μ l de mix para PCR adicionado de 1,5 μ l de DNA (1ª reação) ou produto de PCR (2ª reação). Os componentes da mix para PCR estão sumarizados na tab 3.

¹⁰ Promega Corporation - USA

¹¹ Eppendorf Mastercycler Personal®, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha.

Tabela 1: Sequência dos iniciadores utilizados na primeira e na segunda reação de *nested* PCR, para identificação do agente

Especificidade <i>A. phagocytophilum</i>	Sequência do primer (5' - 3')	Alvo	Nome	Tamanho do produto (pb)	Referência
1ª reação	ATGAATTACAGAGAATTGCTTGTAGG TTAATTGAAAGCAAATCTTGCTCCTATG	<i>msp4</i>	MSP4AP5 MSP4AP3	849	de la Fuente <i>et al.</i> 2005
2ª reação	CTATTGGYGGNGCYAGAGT GTTCATCGAAAATTCCGTGGTA	<i>msp4</i>	msp4f msp4r	381	Bown <i>et al.</i> 2007

Tabela 2: Programa submetido ao termociclador automático para realização do *nested* PCR para amplificação para *A. phagocytophilum*, utilizando os iniciadores MSP4AP5 e MSP4AP3, para a primeira reação e os iniciadores msp4f e msp4r, para a segunda reação

Ciclo	Passo	Temperatura (°C)	Duração
1 (1x)	Desnaturação inicial	94	5 min
2 (29x)	Desnaturação	92	1 min
	Anelamento	54	1 min
	Extensão	72	2 min
3 (1x)	Extensão final	72	8 min
4	“Hold”	12	-

Tabela 3: Condição para reação de *nested* PCR para *Anaplasma phagocytophilum* utilizando os iniciadores MSP4AP5 e MSP4AP3, para primeira reação e os iniciadores msp4f e msp4r, para a segunda reação.

Reagente	Volume (µl)
GoTaq® Green Master Mix ¹²	7,5
H ₂ O MiliQ	5,4
Mix primer (f+r) (10mM)	0,6
DNA/Produto 1ª reação	1,5

Os produtos obtidos após a segunda reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE (0,5 X). Foram aplicados 5µL dos produtos, juntamente com 1µL do corante gel red¹³ (1µl/10µl de TAE 0,5X) em cada canaleta do gel. Como padrão foi utilizado 1Kb Ladder Plus¹⁴. Após aplicação dos produtos e padrão, o gel foi submetido a um campo elétrico de 100V, por aproximadamente 25 minutos e, então,

observado em lâmpada de UV. Observou-se a formação de banda nas canaletas das amostras e comparou-se com as bandas formadas pelo padrão e pela amostra positiva. Além disso, observou-se se houve formação de bandas nos brancos, tanto da primeira quanto da segunda reação a fim de se descartar possíveis contaminações durante o processo.

¹² Biotium - USA

¹³ Fermentas – Thermo Fisher Scientific Inc. - USA

¹⁴ PROMEGA – USA

3.1.4.3.3. Sequenciamento nucleotídico

As amostras que apresentaram banda após eletroforese em gel de agarose 1% foram submetidas a purificação pelo polietilenoglicol 20% (PEG 20%) para posterior sequenciamento nucleotídico. A purificação teve como objetivo eliminar bandas com peso molecular abaixo de 300-400 pb.

Primeiramente, todo o produto de PCR foi transferido para um tubo de plástico de 1,5ml e, então, foi adicionado o mesmo volume de PEG 20%. A mistura foi homogeneizada em “vortex” e os tubos foram colocados em banho-maria a 37°C por 15 minutos. Depois de decorrido o tempo, os tubos foram centrifugados a 13000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi retirado, cuidadosamente, com auxílio de uma pipeta. Adicionou-se 125µl de etanol 80% gelado e centrifugou-se a 13000 rpm por 5 minutos. Novamente o sobrenadante foi descartado. Repetiu-se os três últimos passos. Permitiu-se que as amostras secassem a temperatura ambiente *overnight*. No dia seguinte as amostras foram ressuspensas com tampão EB num volume de ~20µl.

Após purificação, as amostras foram submetidas à avaliação da quantidade de produto de PCR presente através de espectrofotometria¹⁵. As amostras foram então preparadas para o sequenciamento conforme exigido pelo laboratório (Myleus Biotechnology) e então analisadas por eletroforese capilar em aparelho ABI3130, utilizando-se o polímero POP7 e BigDye3.1.

3.2. Avaliação clínica e laboratorial da ocorrência de *Anaplasma phagocytophilum* em duas regiões do estado de Minas Gerais, Brasil

3.2.1. Localização geográfica e condições climáticas

O estudo foi realizado em duas épocas distintas do ano (período chuvoso e de seca) em duas propriedades localizadas nos municípios de Ataléia e São Vicente de Minas, situadas no nordeste e sul do estado de Minas Gerais, respectivamente. Ambas apresentam estações do ano definidas: estação seca de abril a setembro e estação chuvosa de outubro a março.

O município de São Vicente de Minas está localizado na região sul do estado de Minas Gerais e pertence à microrregião de Andrelândia. A sede do município encontra-se a 962 metros de altitude e sua posição geográfica corresponde 21°42'46" de latitude sul e 44°26'38" de longitude oeste. Possui clima classificado como tropical de altitude, com duas estações bem definidas: verões brandos e úmidos e invernos secos. A temperatura média anual é de 20,7°C e o índice pluviométrico é de 1200 mm.

O município de Ataléia se localiza na região nordeste de Minas Gerais e é pertencente à mesorregião do Vale do Mucuri, e à microrregião de Teófilo Otoni. A sede do município encontra-se a 264 metros de altitude e sua posição geográfica corresponde a 18°02'38" de latitude sul e 41°06'36" de longitude oeste. Possui clima classificado como tropical de savana.

As propriedades localizadas em Ataléia e em São Vicente de Minas, serão referidas no texto como propriedade 1 e propriedade 2, respectivamente. As condições climáticas, durante o período de coleta dos dados, estão descritas na Tab. 3. Os dados referem-se ao valor obtido no dia da coleta do material e à variação obtida no período de 15 dias, compreendendo a data da coleta.

¹⁵ Nanodrop – Thermo Scientific Fisher Inc. – USA.

Tabela 4: Temperatura (°C), umidade relativa do ar (%) e precipitação pluviométrica (mm), na região dos municípios de Ataléia e São Vicente de Minas, no estado de Minas Gerais, Brasil, de acordo com o período da coleta dos dados*

Índice	Propriedade 1 Região do município Ataléia		Propriedade 2 Região do município São Vicente	
	Verão	Inverno	Verão	Inverno
Temperatura Máxima	29,9 (29,7 - 32,5)	29,1 (21,7 - 29,4)	23,4 (22,3 - 28,9)	25,8 (12,9 - 28,6)
Temperatura Mínima	21,4 (20,7 - 21,7)	16,1 (13,2 - 19,2)	17,5 14,7 - 18,8	7,3 (5,8 - 16,8)
Precipitação pluviométrica	0,8 (0,00 - 35,0)	0,0 (0,0 - 6,8)	34,2 (0,0 - 73,0)	0,0 (0,0 - 8,6)
DAAS**	34,8 (12,6 - 44,3)	11,5 (11,5 - 19,1)	75,0 (51,4 - 75,0)	39,4 (30,0 - 44,9)
Umidade Relativa Máxima	86,0 80,0 - 89,0	85,0 (82,0 - 92,0)	100,0 (92,0 - 100)	95,0 (81,0 - 100)
Umidade Relativa Mínima	53,0 (41,0 - 58,0)	37,0 (37,0 - 74,0)	79,0 (28,0 - 88,0)	28,0 (21,0 - 93,0)

*Dado do dia da coleta (variação de 15 dias compreendendo a data da coleta); **DAAS: dissipação da água no solo.
Fonte: www.agritempo.gov.br

3.2.2. Cálculo amostral

O número de amostras coletadas foi calculado de acordo com a fórmula do Centro Panamericano de Zoonoses (CEPANZO, 1973):

$$N = p \times (100-p) z^2 / (d \times p/100)^2$$

Onde: n= número de indivíduos a estudar (número de amostras); p = prevalência esperada; d = erro esperado; z = grau de confiança a 95%. Considerando uma prevalência esperada (p) de 64,9% (Gavião Prado *et al.*, 2011), um erro esperado (d) de 15% e um grau de confiança a 95% (z) de 1,96, deveriam ser utilizadas no mínimo 92 amostras de soro.

3.2.3. População estudada

Os animais da propriedade 1, exceto os garanhões, são mantidos em regime de criação extensivo, recebendo suplementação mineral, apenas os potros recebem concentrados e capim napier (*Pannisetum*

purpureum) picado. Os garanhões eram mantidos em baias abertas, com acesso a piquete, e recebem feno à vontade. Os animais foram vacinados contra garrotilho e influenza. Foram estudados ao todo 84 animais na propriedade 1, sendo 40 durante a primeira coleta e 44 na segunda.

Na propriedade 2, o manejo dos animais é similar ao da propriedade 1, alterando apenas o sanitário, pois os animais receberam apenas a vacina anti rábica. Apenas os considerados de melhor desempenho receberam suplementação de concentrado. Nesta propriedade foram avaliados 88 equinos, sendo 43 na primeira coleta e 45 na segunda.

Ambas as propriedades são de criação de equinos da raça Mangalarga Marchador, mas apenas na propriedade 1 foram avaliados dois muares e um asinino que eram utilizados ara trabalho. A distribuição dos animais de acordo com o sexo está demonstrada na tab. 5.

Tabela 5: Distribuição dos animais estudados em ambas as propriedades de acordo com a coleta e o sexo

Sexo	Propriedade 1		Propriedade 2	
	Chuva	Seca	Chuva	Seca
Fêmea (%)	52,50	52,27	86,05	68,89
Macho (%)	22,50	29,55	6,98	13,33
Macho Castrado (%)	25,00	18,18	6,98	17,78

3.2.4. Coleta e processamento do material

A coleta e o processamento do material está descrito no item 3.1.3. As coletas na propriedade 1 foram realizadas nos dias 18/01/2013 e 20/07/2013 e na propriedade 2 nos dias 09/02/2013 e 02/08/2013.

3.2.4.1. Hemograma e bioquímica sérica

O hemograma e a bioquímica sérica foram realizados conforme descrito no item 3.1.3.1.

3.2.5. Métodos diagnósticos

Os exames direto, de reação de imunofluorescência indireta e da reação em cadeia da polimerase foram realizados conforme descrito no itens 3.1.3.1, 3.1.4.2 e 3.1.4.3, respectivamente.

3.2.6. Estudo da incidência cumulativa de anaplasose granulocítica equina

A fim de se estudar a incidência cumulativa os animais das Propriedades 1 e 2 foram agrupados a fim de se avaliar a incidência cumulativa. Apenas os animais avaliados nas coletas 1 e 2 foram incluídos nos estudo, totalizando 52 animais e 104 amostras. A incidência cumulativa em uma população leva em consideração o número de casos novos em relação ao número de animais em risco de adoecer, estipulado no início do estudo. Assim, a incidência cumulativa é a probabilidade ou risco de um indivíduo em população susceptível desenvolver a doença em um determinado período de tempo (Almeida Filho e Rouquayrol, 2006).

3.3. Comparação clínica entre animais positivos e negativos para anaplasose granulocítica equina

A fim de se avaliar as alterações causadas pela AGE em equídeos dos municípios de Belo Horizonte, Ataléia e São Vicente de Minas, agrupou-se 37 animais positivos ao exame de capa leucocitária ou na PCR e outros 37 animais negativos. O critério de seleção dos animais negativos foi definido pela ausência de inclusões intracitoplasmáticas na capa leucocitária, ausência de sororreatividade na RIFI e PCR negativo, tendo sido realizado um sorteio para inclusão dos animais nesse grupo. Foram estudados os perfis hematológicos e bioquímicos dos animais e comparados entre si.

3.4. Casos clínicos de AGE atendidos no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

Foram atendidos seis casos de anaplasose granulocítica equina na Clínica Médica de Equídeos do HV-EV/UFMG entre os anos de 2010 e 2013. Todos os casos foram encaminhados ao HV devido a queixas diferentes à AGE. Durante a internação dos animais, sinais clínicos característicos da afecção foram observados, tais como: anorexia, hipertermia, trombocitopenia e anemia. Avaliação da capa leucocitária, bem como dos perfis hematológicos e bioquímicos dos animais foram realizados para se chegar ao diagnóstico definitivo. Todos os animais foram positivos ao exame de capa leucocitária, mas apenas um foi positivo para a PCR. As coletas de sangue

foram realizadas no dia do diagnóstico e a cada 48-72 horas após o início do tratamento.

3.5. Análises estatísticas

Os dados foram tabulados no programa Excel® e analisados pelo programa estatístico SAS (2003).

O resultado do teste diagnóstico de RIFI foi utilizado para o cálculo da soroprevalência para *A. phagocytophilum*. Os dados com distribuição não paramétrica foram submetidos a transformação pelo $\text{Log}(x+1)$ e os percentuais pelo Arco seno \sqrt{x} . Após transformação, os dados permaneceram com distribuição não paramétrica. Desta forma, as médias foram comparadas pelo teste de Wilcoxon (duas médias) ou pelo teste de Kruskal-Wallis (três ou mais médias). As variáveis proporcionais foram comparadas pelo teste χ^2 .

A prevalência foi calculada pela fórmula: nº total de casos/população total estudada. E a incidência cumulativa foi calculada pela fórmula: nº de casos novos/população inicial em risco de infecção.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação hematológica, sorológica e molecular de equinos de tração do município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

4.1.1. População estudada

Foram estudados 224 equídeos provenientes do município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, devidamente cadastrados no Projeto Carroceiros, durante os anos de 2010, 2011 e 2012. Foram amostradas 21 URPVs, distribuídas em oito Regionais. Apenas a Regional Centro-Sul não foi

amostrada, pois não há trânsito de equídeos nesta Regional (Tab. 6).

Do total de 224 animais avaliados, 41,07% (92/224) eram fêmeas e 58,93% (132/224) eram machos. A distribuição dos animais segundo o sexo variou de 30,00% (9/30) de fêmeas e 70,00% (21/30) de machos na regional Pampulha a 55,00% (11/20) de fêmeas e 45,00% (9/20) de machos na regional Barreiro. Não houve diferença entre as oito regionais do município de Belo Horizonte em relação à distribuição dos animais entre os sexos. A maior porcentagem de machos está relacionada à preferência pessoal do carroceiro que consideram as fêmeas menos resistentes e aptas ao trabalho. Além disso, as fêmeas possuem o inconveniente de apresentarem o estro, o que atrai os garanhões, atrapalhando o trabalho do carroceiro, apresentam ainda a gestação e a lactação que as impedem de trabalhar durante um período do ano. Durante o tempo em que as fêmeas não estão trabalhando, os carroceiros necessitam de adquirir, temporária ou definitivamente, outro animal para substituir a fêmea gestante ou lactante, sem deixar de arcar com os gastos para manutenção da mesma.

4.1.2. Avaliação sorológica pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

Encontrou-se uma frequência de 53,57% (120/224) de animais positivos à diluição de 1:160. A maior frequência foi na Regional Oeste (83,33%) e a menor na Pampulha (36,67%). Foram observadas variações estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as frequências da regional Oeste e Venda Nova e entre as Regionais Venda Nova e Leste, Nordeste, Barreiro, Noroeste, Norte e Pampulha. A distribuição de animais, de acordo com as regionais, está apresentada na Tab. 7.

Tabela 6: Distribuição dos animais de acordo com as URPV's e Regionais no município de Belo Horizonte.

Regional	URPV	Data	Frequência	Porcentagem
Barreiro	Flávio de Oliveira	02/09/2011	18	8,03
	Túneo e Lindóia	01/06/2012	2	0,9
Leste	Andradas I	29/06/2012	30	13,39
Nordeste	São Gabriel	16/09/2011	17	7,59
	São Paulo	09/05/2011	7	3,13
	São Paulo	14/05/2010	6	2,67
Noroeste	Pindorama	23/09/2011	13	5,80
	Delta	02/04/2012	12	5,35
	Delta	18/04/2011	3	1,34
	Pedro II	02/12/2011	2	0,9
Norte	Aeroporto	26/08/2011	11	4,91
	Bacurus	30/05/2011	11	4,91
	Saramenha	07/05/2010	8	3,57
Oeste	Teresa Cristina	13/09/2011	16	7,14
	Barão Homem de Melo	16/03/2012	2	0,9
	Silva Lobo	18/05/2012	6	2,67
Pampulha	Garça	04/11/2011	11	4,91
	Castelo	27/06/2011	12	5,35
	Santa Amélia	22/11/2010	7	3,13
Venda Nova	São João Batista	07/10/2011	7	3,13
	Vilarinho	11/04/2011	11	4,91
	Rio Branco	13/06/2011	12	5,35
Total			224	100

Tabela 7: Distribuição da frequência de animais reagentes para *Anaplasma phagocytophilum* de acordo com a Regional Administrativa de Belo Horizonte.

Regional	Amostras Reativas	
	%	n
Barreiro	45,00 ^C	(9/20)
Leste	56,67 ^{BC}	(17/30)
Nordeste	50,00 ^C	(15/30)
Noroeste	43,33 ^C	(13/30)
Norte	40,00 ^C	(12/30)
Oeste	83,33 ^A	(20/24)
Pampulha	36,67 ^C	(11/30)
Venda Nova	76,67 ^{AB}	(23/30)
Total	53,57	(120/224)

Percentuais seguidos por letras diferentes, na mesma coluna, diferem (p<0,05).

Apesar de serem esperadas maiores taxas de positividade para as fêmeas, devido à maior exposição a fatores estressantes, como a gestação, parto e lactação, com aumento das chances de infecção, o mesmo não foi confirmado ($p>0,05$). O percentual de fêmeas positivas e negativas foi de 55,43 % (51/92) e 44,57% (41/92), respectivamente. Os machos apresentaram 52,27% (69/132) de positividade e 47,53% (63/132) foram negativos.

A maioria das amostras (41,47%) apresentou uma diluição de 1:160, tais amostras foram então submetidas à titulação nas diluições de 1:320, 1:640 e 1:1280. As Regionais Oeste e Venda Nova apresentaram grande número de animais positivos com titulação predominantemente entre 1:160 e 1:320. Nas Regionais Leste e Norte, houve uma alta prevalência de animais com título acima de 1:640. A frequência das diluições encontradas e a distribuição das titulações de acordo com as Regionais estão apresentadas na Fig. 2 e Tab. 8, respectivamente.

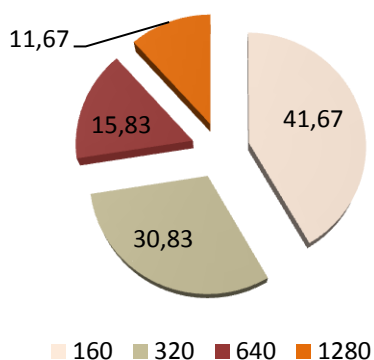


Figura 2: Frequência das diluições dos soros, em amostras reativas na RIFI, em investigação de soroprevalência equina *Anaplasma phagocytophilum*, Belo Horizonte.

Com exceção das Regionais Norte e Leste, todas as Regionais apresentaram maior frequência de animais apresentando títulos mais baixos, apesar disto não se pode caracterizar estas como áreas de estabilidade enzoótica devido à porcentagem de amostras consideradas positivas, que deveriam estar acima de 80%.

O percentual de animais sororreagentes com títulos acima de 1:640 foi de 41,18% e 50,00% nas Regionais Leste e Norte, respectivamente. Franzén *et al.* (2005) descreveram o pico da titulação entre três a sete dias após a soroconversão, correspondendo ao período entre 12 a 16 dias após infecção experimental. O que pode ser extrapolado para a situação em estudo e descrever os animais destas regionais com animais em fase de convalescença. Além

disso, como as amostras foram obtidas durante o horário de trabalho dos animais, provavelmente os animais considerados positivos não apresentavam sintomatologia grave da doença.

Não foi possível realizar um exame clínico detalhado dos animais durante as visitas realizadas às URPVs, sendo os principais motivos falta de infraestrutura adequada e a grande quantidade de animais que devem passar pela vacinação e marcação. A falta desse exame clínico torna difícil a comparação entre os valores das titulações e a presença ou não de sintomatologia clínica. Vale ressaltar também que, como a coleta realizada foi pontual, não foi possível o acompanhamento dos animais e dos valores das titulações.

Tabela 8: Distribuição das amostras reativas na RIFI, de acordo com a Regional e a diluição do soro, em investigação de soroprevalência equina para *Anaplasma phagocytophilum*.

Regional	Titulação das amostras reativas (% , n)			
	1:160	1:320	1:640	1:1280
Barreiro	44,44 (4/9)	44,44 (4/9)	0,00 (0/9)	11,11 (1/9)
Leste	41,18 (7/17)	17,65 (3/17)	23,53 (4/17)	17,65 (3/17)
Nordeste	26,67 (4/15)	53,33 (8/15)	6,67 (1/15)	13,33 (2/15)
Noroeste	61,54 (8/13)	15,38 (2/13)	23,08 (3/13)	0,00 (0/13)
Norte	16,67 (2/12)	33,33 (4/12)	25,00 (3/12)	25,00 (3/12)
Oeste	65,00 (13/20)	15,00 (3/20)	15,00 (3/20)	5,00 (1/20)
Pampulha	54,55 (6/11)	27,27 (3/11)	0,00 (0/11)	18,18 (2/11)
Venda Nova	26,09 (6/23)	43,48 (10/23)	21,74 (5/23)	8,70 (2/23)
Total	41,47 (50/120)	30,83 (37/120)	15,83 (19/120)	11,67 (14/120)

Ao se comparar os animais reativos e não reativos e as estações chuvosa e de seca, não se encontrou diferenças entre as estações ($p>0,05$). O mês com maior número de amostras analisadas foi o mês de setembro (64/224), seguido por junho (56/224), dezembro e março foram os meses com menor quantidade de animais avaliados, apenas dois animais em cada URPV. A fig. 4 apresenta a distribuição das amostras

reativas e não reativas de acordo com o mês do ano e a pluviosidade encontrada em cada mês.

Não foi observada diferença ($p>0,05$) entre as estações do ano nas coletas utilizadas devido ao fato de serem pontuais e não ao longo de todo o ano, não sendo possível realizar um estudo sobre a dinâmica de infecção, re-infecção e cura nestes animais.

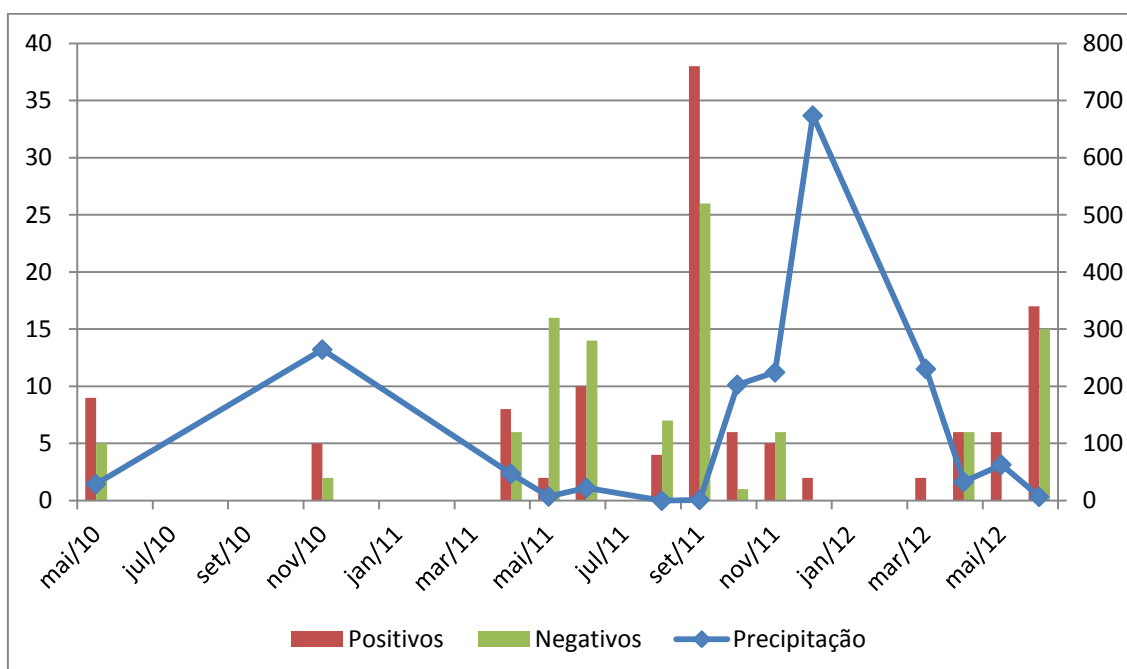


Figura 3: Distribuição das amostras reativas e não reativas, de acordo com o mês avaliado e a pluviosidade encontrada em cada mês avaliado.

4.1.3. Avaliação parasitológica pela capa leucocitária

Dentre os animais avaliados pelo esfregaço de capa leucocitária 3,14% (7/223) possuíam inclusões indicativas da presença do agente. A Regional com o maior número de animais positivos foi a Norte (10,00% - 3/30). As regionais Barreiro, Leste, Noroeste e Oeste não apresentaram nenhum animal considerado positivo, neste exame.

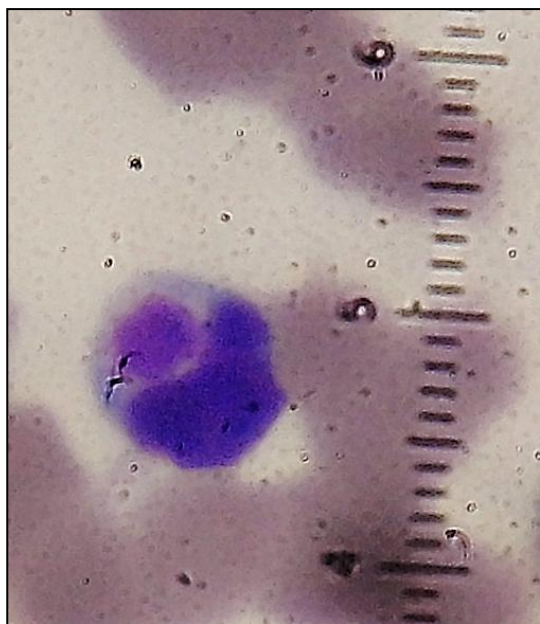


Figura 4: Neutrófilo circulante apresentando inclusão intracitoplasmática sugestiva de mórula de *Anaplasma phagocytophilum*. Aumento 1000x.

A baixa prevalência do exame direto encontrada no presente trabalho foi devida a coleta pontual. Segundo a literatura (Stannard *et al.*, 1969; Butler *et al.*, 2008), as mórulas são normalmente encontradas durante a fase aguda e febril da doença. Durante os cursos e palestras ministradas, os carroceiros são orientados a não trabalharem com animais apresentando qualquer sintomatologia clínica. Recomenda-se encaminhá-los ao Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da Universidade

Federal de Minas Gerais (HV-EV/UFGM), onde serão devidamente avaliados e tratados de forma mais adequada. Assim, como as coletas foram realizadas nas URPVs e não no HV-EV/UFGM, o número de animais com sintomatologia clínica e consequentemente com presença de neutrófilos circulantes infectados, foi muito baixo.

4.1.4. Avaliação molecular (PCR)

Foram escolhidas, aleatoriamente 96 amostras de Belo Horizonte para a realização da PCR, totalizando 192 reações, por se tratar de *nested* PCR. Dessas amostras, apenas seis (6,25%) foram consideradas positivas para *Anaplasma phagocytophilum*. O sequenciamento das amostras positivas, não foi satisfatório, não sendo possível sua análise através do BLASTN (*Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide*). O BLASTN é um programa, pertencente ao NCBI, que compara a sequência nucleotídica encontrada com outras previamente depositadas no banco de dados (genBank). Provavelmente, o sequenciamento das amostras positivas foi insatisfatório devido a pouca quantidade de produto de PCR obtido ao final da segunda reação, apesar de terem sido seguidos os mesmos procedimentos para todas as amostras.

Devido à coleta pontual, não foi possível o acompanhamento e coleta durante a fase aguda da doença e por isso o valor encontrado pode ter sido baixo. Apesar disso, os valores descritos na literatura atual em equinos são mais baixos que os encontrados ou até mesmo nulos. No Brasil ainda não foram descritos casos com comprovação molecular da presença do agente em equinos (Salvagni *et al.*, 2010).

A Fig. 6 mostra um gel de agarose 1% contendo amostra positiva para o gene *msp4* do *Anaplasma phagocytophilum*.

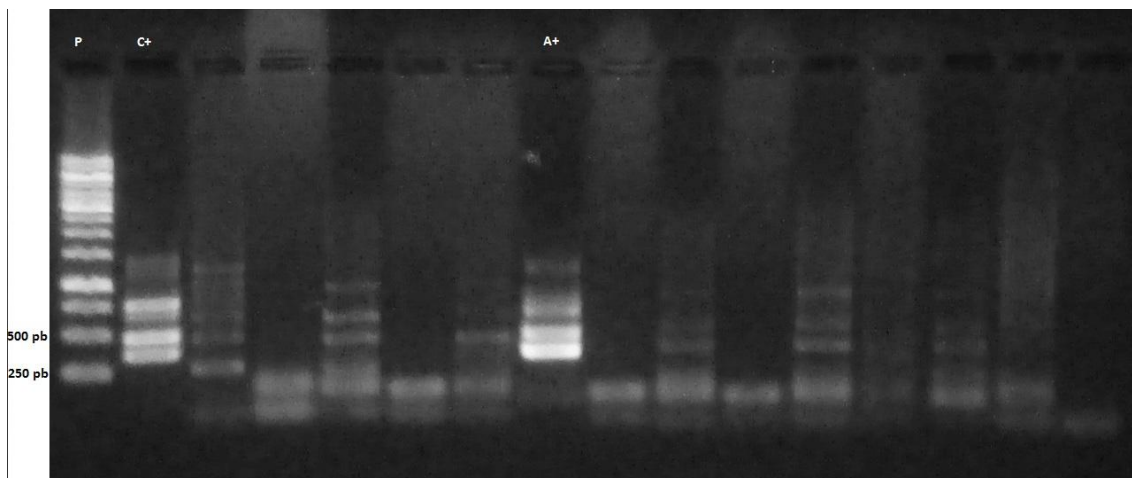


Figura 5: Gel de Agarose 1% apresentando amostra positiva para *Anaplasma phagocytophilum*. P: Padrão, peso molecular 1Kb; C+: Controle Positivo, obtido após extração de DNA de cultivo celular de *A. phagocytophilum*; A+: Amostra positiva; as duas últimas canaletas contém os brancos da primeira e da segunda reação, respectivamente.

4.1.5. Avaliação laboratorial

4.1.5.1. Eritrograma e plaquetograma

O eritrograma e índices hematiméricos dos animais tanto para o grupo de animais reativos como para os não reativos para RIFI estão dentro da faixa de variação esperada para a espécie. Exceção se faz para valores de Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), que se encontram acima dos valores de referência para ambos os grupos avaliados. O CHCM é um índice que avalia a coloração dos eritrócitos em casos de anemia, seu aumento caracteriza uma hipercromia, com aumento de hemoglobina no interior dos eritrócitos. A hipercromia é observada em casos onde há liberação retardada de eritrócitos na corrente sanguínea, pois há mais divisões nas células precursoras de eritrócitos e maior concentração da hemoglobina em seu interior. Esta avaliação deve ser feita criteriosamente, pois em casos de hemólise da amostra após a coleta e icterícia, os valores podem se apresentar aumentados pela análise automática, mas não refletir a verdadeira condição do animal.

Ao comparar as médias entre os grupos considerados reativos e não reativos sorologicamente, houve diferença ($p < 0,05$) apenas nos valores de eritrócitos e de hemoglobina, sendo ambos maiores para o grupo reativo. Como foi realizada coleta pontual desses animais, não foi possível avaliar a dinâmica dos parâmetros durante o curso da infecção. Segundo a literatura, espera-se encontrar animais apresentando anemia moderada quando infectados pelo *A. phagocytophilum* (Dagnone *et al.*, 2001; Franzén *et al.*, 2005; Woldehiwet, 2010; Soares, 2012). Os animais avaliados, provavelmente, não encontravam-se com a doença clínica, apesar de serem positivos para a RIFI e os valores de eritrócitos e hemoglobina encontrados foram devido à recuperação dos animais após a infecção. Também, valores mais altos de eritrócitos podem ser encontrados em animais apresentando desidratação, independente do seu grau, que leva a hemoconcentração e consequentemente a uma policitemia relativa (Thrall *et al.*, 2006; Kaneko *et al.*, 2008). Apenas a infecção por *A. phagocytophilum* foi pesquisada nas amostras obtidas.

Animais de tração são constantemente submetidos a esforço físicos exaustivos. Como a hemoglobina é responsável pelo transporte de oxigênio para os tecidos, através dos eritrócitos e por estes animais apresentarem maior demanda de oxigênio, o aumento da hemoglobina é considerado normal. Isto também está relacionado aos valores de CHCM encontrados em ambos os grupos experimentais. Kowal *et al.* (2006) demonstraram aumento nos valores de eritrócitos, hematócrito e de hemoglobina em equinos Puro-Sangue-Inglês submetidos a teste de esforço em esteira ergométrica, com aumento proporcional ao esforço ao qual os animais foram submetidos.

Os animais apresentaram plaquetas dentro dos valores de referência, não havendo diferença entre os grupos analisados ($p < 0,05$). Os resultados encontrados estão em desacordo com o descrito na literatura, que descreve a trombocitopenia como a alteração hematológica mais frequente nos casos clínicos de anaplasose granulocítica equina (Dagnone *et al.*, 2001; Franzén *et al.*,

2005; Woldehiwet, 2010). Ainda não se sabe qual o mecanismo exato para a redução do número de plaquetas circulantes, mas acredita-se que mecanismos imunológicos sejam responsáveis por essa diminuição (Leipidi *et al.* 2000).

Os equídeos estão submetidos a um grande estresse, devido a alta concentração de animais nas URPVs durante as coletas, a marcação e manipulação e contenção física em troncos ou utilizando cachimbo, quando necessário. Quando em situações de estresse, apresentam contração esplênica, que, além de aumentar os valores de eritrócitos e leucócitos durante um período de tempo, também aumenta os valores de plaquetas o que justifica o aumento das mesmas na circulação destes animais. Não é possível afirmar que os animais apresentavam valores de plaquetas abaixo do esperado antes de serem submetidos aos fatores de estresse citados (Weiss e Wardrop, 2010). Os valores de eritrograma, índices hematimétricos e de plaquetometria estão demonstrados na Tab. 9.

Tabela 9: Valores médios (média + erro padrão) do eritrograma e da plaquetometria entre os grupos de animais reativos e não reativos no exame de RIFI em investigação da soroprevalência equina para *Anaplasma phagocytophilum*.

Parâmetro avaliado	Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	
	Reativos (X±EP)	Não reativos (X±EP)
Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	7,16±0,10 ^a	6,89±0,12 ^b
Hematócrito (%)	29,90±0,42	29,46±0,41
Hemoglobina (g/dl)	11,84±0,18 ^a	11,45±0,16 ^b
VGM (fl)	40,59±0,38	40,70±0,47
CHCM (pg)	41,03±0,29	41,54±0,43
HCM (pg)	16,62±0,15	16,83±0,25
RDW (%)	19,51±0,13	19,65±0,14
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	190,73±6,99	185,97±7,17

X=Média; EP=Erro padrão. Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha, diferem ($p < 0,05$). Valores de referência: Hematócrito: 24-44; Hemoglobina: 8-14; Eritrócitos: 5,5-9,5; Volume globular médio (VGM): 37-58,5; Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM): 31-38; Hemoglobina Corpuscular Média (HCM): 12,3-19,7; RDW: 19-20; Plaquetas: 120-256. Fonte: Jain (1993).

4.1.5.2. Leucograma

Na avaliação do leucograma, ambos os grupos, apresentaram valores da relação neutrófilo:linfócito acima dos esperados

para a espécie, mas ao se comparar esse parâmetro entre os grupos não houve diferença ($p > 0,05$). Relação neutrófilo:linfócito acima dos valores esperados é devido ao aumento do número

de neutrófilos circulantes ou à queda do número de linfócitos. Animais submetidos a exercício apresentam, logo após o exercício, um aumento tanto de neutrófilos quanto de linfócitos e, mais tardiamente apresentam uma queda nos valores de linfócitos e aumento nos valores de neutrófilos, com consequente alteração de relação neutrófilo:linfócitos (Dias, 2008). Os animais avaliados são levados às URPVs durante os intervalos entre uma coleta de entulho e outra. Este trabalho é considerado atividade física e por isso os animais apresentaram essa variação nos números de neutrófilos e linfócitos, com alteração nos valores da relação neutrófilo:linfócito.

Além disso, o estresse a que os animais são submetidos anteriormente à coleta de sangue aumenta a concentração de cortisol endógeno que pode levar a pseudoleucocitose, já que nenhuma célula foi produzida e sim realocada, saindo do *pool* de células marginais, se tornando parte dos leucócitos circulantes, elevando a relação neutrófilo:linfócito (Snow *et al.*, 1983). A aplicação exógena de hormônio adrenocorticotrófico foi capaz de elevar a relação neutrófilo:linfócito em equinos hípidos (Rossdale *et al.*, 1982).

Houve diferença entre os valores encontrados para linfócito absoluto, bastonete absoluto e bastonete relativo, sendo todas as médias maiores ($p < 0,05$) para o grupo dos animais reativos para sorologia para *A. phagocytophilum*.

Animais acometidos pela anaplasose granulocítica apresentam um quadro de leucopenia, caracterizada por neutropenia e linfopenia (Dagnone *et al.*, 2001; Franzén *et al.*, 2005; Woldehiwet, 2010). Os valores encontrados no estudo diferem do descrito na literatura, pois os animais apresentaram valores leucocitários dentro dos esperados e ainda houve diferença entre os valores de

linfócitos, sendo maiores para o grupo de animais reativos. A principal causa de aumento dos valores de linfócitos é a resposta à excitação causada pelo manejo do animal ou devido à exercício físico. Os animais de ambos os grupos estão submetidos ao mesmo nível de excitação no momento da coleta e são animais que estão trabalhando anteriormente à coleta, não sendo possível afirmar que o aumento de linfócitos encontrado no grupo reativo seja devido a isso. Outras causas de linfocitose são a exposição a antígenos e neoplasias linfóides (Weiss e Wardrop, 2006). Não foi possível avaliar se os animais do grupo possuíam alguma dessas alterações citadas, pois o diagnóstico das mesmas não é baseado apenas no leucograma, sendo necessária avaliação minuciosa dos animais.

Houve diferença entre grupos ($p < 0,05$) para os valores de neutrófilos bastonetes, tanto relativo quanto absoluto, sendo as médias maiores para o grupo reativo. Os bastonetes são considerados granulócitos jovens e são liberados na corrente sanguínea quando há diminuição da sua forma adulta (neutrófilos segmentados) numa taxa acima da capacidade da medula óssea liberar novos neutrófilos segmentados. Os neutrófilos são células de defesa primária e normalmente atuam contra microorganismos, trauma e lesão tecidual ou qualquer outro sinal inflamatório (Weiss e Wardrop, 2010). Como a anaplasose granulocítica equina leva a uma redução no número de neutrófilos circulantes, este aumento nos valores de bastonetes no grupo dos reativos se deve a maior liberação dessas formas jovens, o objetivo seria restabelecer os valores normais de neutrófilos e bastonetes esperados para a espécie, caracterizando o desvio a esquerda, ou seja, os animais foram responsivos à queda dos leucócitos circulantes. Os valores médios do leucograma dos animais reativos e não reativos estão apresentados da Tab. 10.

Tabela 10: Valores médios absolutos (média ± erro padrão) do leucograma entre os grupos de animais reativos e não reativos à RIFI, em investigação da soroprevalência equina para *Anaplasma phagocytophilum*.

Parâmetro avaliado	Imunofluorescência Indireta (RIFI)	
	Reativos (X±EP)	Não reativos (X±EP)
Leucócitos (células/ μ l)	11547,86±336,60	10814,90±283,34
Basófilo (células/ μ l)	72,78±11,83	51,92±8,80
Eosinófilo (células/ μ l)	537,95±45,10	481,28±36,92
Neutrófilo (células/ μ l)	6757,09±242,70	6623,44±251,61
Bastonete (células/ μ l)	135,53±18,85 ^a	80,06±14,23 ^b
Linfócito (células/ μ l)	3502,17±165,03 ^a	3026,38±147,91 ^b
Monócito (células/ μ l)	544,19±44,69	551,71±37,68
Relação Neutrófilo:Linfócito	2,46±0,14	2,76±0,20

X: Média; EP: Erro padrão; Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha ($p < 0,05$). Valores de referência (Jain, 1993): Leucócitos Totais: 5200-13900 cels/ μ l; Basófilo absoluto: 0-290 cels/ μ l; Eosinófilo absoluto: 100-1000 cels/ μ l; Neutrófilo absoluto: 2200-8500 cels/ μ l; Bastonete absoluto: 0-1000 cels/ μ l; Linfócito absoluto: 1500-7000 cels/ μ l; Monócito absoluto: 0-1000 cels/ μ l; Relação Neutrófilo:Linfócito: 1:2-1:3.

4.1.5.3. Bioquímica sérica

Os valores médios e erro padrão da média para o perfil hepático, renal e proteico estão apresentados na tab. 10.

4.1.5.3.1. Perfil hepático

Não foram observadas alterações nos valores médios das enzimas hepáticas, com exceção da GGT. Entretanto, Lepidi *et al.* (2000) descrevem injúria hepática moderada em seis equinos com infecção experimental pelo agente. O órgão dos animais foi avaliado por histopatologia após eutanásia durante a fase aguda da doença. Foram encontrados focos inflamatórios caracterizados por infiltrados periportais moderados de células mononucleares, hepatite lobular apresentando agregados de macrófagos e ocasionalmente neutrófilos com focos apresentando células apoptóticas. Agüero-Rosenfeld (2002) cita o aumento das enzimas hepáticas, principalmente AST e ALT, como o principal achado de bioquímica séria nos casos de anaplasose granulocítica.

Kaneko *et al.* (2008) citam a GGT como uma enzima presente na superfície luminal das células dos túbulos contorcidos proximais, sendo o equino uma exceção por

apresentar concentrações mais altas dessa enzima nas células dos canalículos biliares, nos hepatócitos as concentrações são menores. Durante lesões tubulares, há liberação desta enzima diretamente na urina. O fígado é considerado o órgão que mais contribui para a atividade da GGT sérica. Não há descrição do aumento da GGT em casos de anaplasose granulocítica equina na literatura consultada.

Mesmo não sendo descrito o aumento de GGT em casos de anaplasose granulocítica equina, outras causas devem ser consideradas para o aumento observado. Em casos de colestase em equinos, há aumento dos valores de GGT e a enzima é considerada mais sensível do que a fosfatase alcalina (FA), que tem aumento discreto, para diagnóstico desta afecção. Os valores de FA no presente estudo se mantiveram dentro dos valores de referência, podendo-se descartar a colestase como um diagnóstico provável, pois mesmo a GGT sendo mais sensível para o diagnóstico, os valores de FA deveriam se apresentar mais elevados. Enterite proximal, também pode levar a um aumento da atividade de GGT sérica (Kaneko *et al.*, 2008), mas os animais, provavelmente não apresentavam quadros de enterite proximal, pois tal afecção causa dor e outras alterações clínicas, de hematologia e

de bioquímica sérica, não encontradas nos animais estudados.

O fígado também é o principal órgão responsável pela homeostase da glicose, e apesar de não possuir receptores GLUT-4, que são responsivos à insulina no processo de internalização da glicose, eles possuem receptores GLUT-2 que permitem livre entrada de glicose nos hepatócitos. Quando

em concentrações elevadas na circulação, o fígado é obrigado a metabolizar rapidamente a glicose, em glicogênio, lipídeos, corpos cetônicos, o que leva a uma sobrecarga do órgão, levando a lesões hepáticas (Kaneko *et al.*, 2008), com consequente liberação de GGT na corrente sanguínea. Seria interessante mensurar a concentração tanto da glicose quanto da insulina, entretanto isto não foi possível neste estudo.

Tabela 11: Valores médios (média \pm erro padrão) dos perfis renal e hepático entre os grupos de animais reativos e não reativos à RIFI, em investigação da soroprevalência equina para *Anaplasma phagocytophilum*.

Parâmetro avaliado	Reativos (X \pm EP)	Não reativos (X \pm EP)
Uréia (mg/dl)	48,55 \pm 2,28	47,42 \pm 1,36
Creatinina (mg/dl)	1,29 \pm 0,03	1,30 \pm 0,02
GGT (U/L)	19,10 \pm 1,80	15,70 \pm 0,58
AST (U/L)	310,65 \pm 46,98	267,65 \pm 12,07
ALT (U/L)	10,51 \pm 2,22	7,49 \pm 1,01
FA (U/L)	137,01 \pm 7,67	127,25 \pm 6,87

X: Média; EP: Erro padrão. Valores de referencia (Meyer *et al.*, 1995; Kaneko *et al.*, 1997) Uréia: 21,4-51,5 mg/dl; Creatinina: 0,9-2,0 mg/dl; GGT: 4-13,4 UI/l; AST: 226-366 UI/l; ALT: 3-23 UI/l; FA: 86-295 UI/l; Albumina: 2,4-4,0 mg/dl; Proteínas totais: 5,2-7,9 mg/dl.

4.1.5.3.2. Perfil renal

Não houve alteração nos valores de ureia e creatinina nos grupos estudados. Neste trabalho foram realizadas mensurações dos valores de ureia sérica. Alguns laboratórios clínicos utilizam os valores do nitrogênio ureico sanguíneo o que pode levar a confusão dos médicos veterinários ao avaliarem os resultados, pois ao considerar todo o nitrogênio ureico os valores encontrados são maiores que os valores de ureia.

4.1.5.3.3. Perfil proteico

Não foram encontradas alterações no perfil proteico dos animais avaliados, nem quando comparados os grupos reativos e não reativos. Apesar de Soares (2012) ter encontrado aumento das proteínas do perfil

proteico em equídeos de tração de Belo Horizonte, utilizando como parâmetro de comparação a reatividade dos animais à sorologia para *Leishmania* sp., no presente estudo os animais avaliados não apresentaram alterações no perfil proteico, quando comparados entre si e quando avaliados como um único grupo de animais. A Tab. 12 mostra os valores médios encontrados para o perfil proteico.

Apesar de Soares (2012) ter encontrado aumento das proteínas do perfil proteico em equídeos de tração de Belo Horizonte, utilizando como parâmetro de comparação a reatividade dos animais à sorologia para *Leishmania* sp., no presente estudo os animais avaliados não apresentaram alterações no perfil proteico, quando comparados entre si e quando avaliados como um único grupo de animais.

Tabela 12: Valores médios (média ± erro padrão) do perfil proteico entre os grupos de animais reativos e não reativos à RIFI, em investigação da soroprevalência equina para *Anaplasma phagocytophilum*

Parâmetro avaliado	Reativos (X±EP)	Não reativos (X±EP)
Proteínas totais	7,40±0,06	7,26±0,07
Fibrinogênio	338,57±24,01	405,00±33,14
Albumina	2,84±0,03	2,80±0,04
Globulina	4,57±0,07	4,46±0,07
Albumina:Globulina	0,64±0,01	0,65±0,01

X: Média; EP: Erro padrão. Valores de referência (Robinson, 1997; Kaneko *et al.*, 2008); Albumina: 2,4-4,0 mg/dl; Proteínas totais: 5,2-7,9 mg/dl; Fibrinogênio: 100 – 400 mg/dl; Globulinas: 2,62-4,04 mg/dl; Albumina:Globulina: 0,62-1,46.

Animais apresentando reatividade a alguma doença infecciosa, possuem um aumento significativo das globulinas, em especial as imuno ou gamaglobulinas. Este aumento é visto durante a fase aguda e de convalescença. Durante a fase aguda, o sistema imunológico dos animais está produzindo anticorpos contra o agente infeccioso, principalmente imunoglobulinas M e A, já na fase de convalescença a imunoglobulina predominante é a G (Abbas e Lichtman, 2008). Esperar-se-ia encontrar aumento nos valores de globulina e diminuição da relação albumina:globulina nos animais reativos, pois os mesmos apresentam maior quantidade de globulinas circulantes. Os valores dentro da normalidade apresentados pelo grupo reativo pode ser devido a uma menor resposta imunológica dos animais ou a níveis de imunoglobulinas anti-*A. phagocytophilum*

mais baixos, devido a estabilidade enzoótica encontrada em algumas regionais pesquisadas.

4.2. Avaliação clínica e laboratorial de equídeos e da ocorrência de *Anaplasma phagocytophilum* em duas regiões do estado de Minas Gerais, Brasil.

4.2.1. Ectoparasitas

Durante as visitas às propriedades foram encontrados carrapatos parasitando os animais. Os carrapatos foram coletados e foi feito um *pool* de cada propriedade, em cada coleta, a presença de infestação foi devidamente documentada para casa animal. A frequência de animais infectados, em cada época do ano e de acordo com a propriedade, encontra-se descrita na Tab. 13.

Tabela 13: Distribuição do número de animais de acordo com a presença de carrapatos, no verão e no inverno, de acordo com a propriedade, em dois municípios de Minas Gerais, Brasil

Fazenda	Estação do ano - % (n)	
	Verão	Inverno
Propriedade 1	12,50 (5/40) ^{Bb}	36,36 (16/44) ^a
Propriedade 2	53,49 (23/43) ^A	35,56 (16/45)

Médias seguidas por letras diferentes, maiúscula na coluna e minúscula na linha, diferem (P<0,05 - Teste Qui-quadrado)

Na Propriedade 1, no verão, dos cinco animais parasitados foram identificadas nove fêmeas adultas e duas ninfas ingurgitadas de *Dermacentor (Anocentor) nitens*. Já no inverno, foram identificadas 12

fêmeas adultas ingurgitadas de *Dermacentor (Anocentor) nitens*, machos (quatro) e duas fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e apenas um macho de *Amblyomma cajennense*.

Na Propriedade 2, no verão dos 23 animais parasitados foram coletadas fêmeas ingurgitadas (seis) e não ingurgitadas (três) de *Amblyomma cajennense*, uma fêmea ingurgitada de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e duas fêmeas ingurgitadas de *Dermacentor (Anocentor) nitens*. Já no inverno, foram identificadas três fêmeas adultas e uma ninfa ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e uma fêmea adulta ingurgitada de *Dermacentor (Anocentor) nitens* (Fig. 6 e Fig. 7).

As duas propriedades apresentavam pastos “sujos” contendo vegetação arbustiva, o que favorece a manutenção dos carrapatos nos pastos. Nessas áreas protegidas do sol, com temperatura e umidade relativa favoráveis as teleóginas se abrigam para fazer ovoposição. Além disso, ainda oferece proteção para os

ovos e para as larvas recém-eclodidas (Torres *et al.*, 2012).

Houve diferença ($p < 0,05$) entre as estações e a quantidade de animais parasitados na propriedade 1, sendo a carga parasitária maior durante a coleta realizada no período da seca. Também houve diferença ($p < 0,05$) na taxa de animais parasitados entre as propriedades durante o verão observando-se maior número de animais parasitados na propriedade 2. Não há realização de controle estratégico para carrapatos nas propriedades, sendo o controle realizado apenas quando se nota a presença de parasitas adultos, o que justifica a quantidade de animais parasitados e a diferença entre as propriedades, já que a propriedade 1 mantém um manejo mais intenso dos animais, sendo possível melhor observação da infestação pelo parasitas.



Figura 6: Pavilhão auricular de um equino apresentando infestação por carrapatos.



Figura 7: Infestação por carrapato na região perianal de equino pertencente à propriedade 1.

Em ambas as propriedades há criação de bovinos juntamente aos equídeos, o que pode favorecer a presença de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* parasitando os animais em estudo. Torres *et al.* (2012) em um estudo com equinos das raças Puro Sangue Inglês e Crioula, demonstraram que a criação conjunta de bovinos e equinos é um fator de risco para a infestação dos equinos por *R. (B.) microplus*. No estudo os autores encontraram 31,8% dos animais parasitados pelo carrapato em uma propriedade onde há contato direto dos equinos com bovinos. Em contrapartida, no mesmo estudo, em uma propriedade onde não há contato direto entre equinos e bovinos, nenhum cavalos apresentou infestação pelo ectoparasita.

Não foi identificada nenhuma espécie do complexo *Ixodes persulcatus*, durante as coletas. Espécies deste complexo estão relacionadas à transmissão de *A. phagocytophilum* em países europeus e nos Estados Unidos da América, mas até o presente momento não foram identificadas no Brasil (Dantas-Torres *et al.*, 2009; Salvagni *et al.*, 2010; Silaghi *et al.*, 2012). Não foi objetivo do presente estudo avaliar a taxa de infestação e sim quais as espécies estavam parasitando os animais no momento

das coletas, por isso a realização de um *pool* de carrapatos de cada propriedade, durante cada visita.

Não foi realizado nenhum teste para avaliar a presença ou não do agente nas glândulas salivares dos carrapatos coletados. Silveira (2012) realizou *nested* PCR das glândulas salivares de carrapatos de três espécies, e nenhuma apresentou banda específica para *A. phagocytophilum*. Já Santos *et al.* (2013), realizaram RT-PCR em carrapatos das espécies *A. cajennense*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma ovale* e *Amblyomma* sp., provenientes de cães domiciliados em Seropédica e Itaguaí, no estado do Rio de Janeiro. Os autores encontraram uma frequência de 2,55%, dentre todas as espécies avaliadas, de carrapatos positivos para *A. phagocytophilum*. As fêmeas de *A. cajennense* apresentaram maior frequência de positividade (6,67%).

4.2.2. Avaliação sorológica pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A distribuição dos animais positivos e negativos para RIFI, de acordo com a propriedade e a estação do ano, encontram-se na Tab. 15.

Tabela 14: Distribuição da frequência de animais de acordo com a reatividade sorológica na RIFI na diluição de 1:160, de acordo com a propriedade e a estação do ano, em investigação da soroprevalência equina para *Anaplasma phagocytophilum*, em duas regiões do estado de Minas Gerais, Brasil

RIFI	Propriedade 1		Propriedade 2	
	Chuva	Seca	Chuva	Seca
Reativo (%)	62,50	77,27	88,37	75,56
Não Reativo (%)	37,50	22,73	11,63	24,44

Teste de Qui-quadrado (p=0,0531)

Foram encontrados 76,16% (131/172) de animais positivos para a RIFI quando os animais foram agrupados e analisados independente da propriedade e da coleta. A propriedade que apresentou maior porcentagem de animais positivos foi a Propriedade 2, com 88,37% (38/43) dos

animais apresentando-se reativos para a RIFI na diluição de 1:160 (ponto de corte). Não houve diferença na distribuição de positivos e negativos entre as propriedades (p=0,0531). Ao se avaliar a frequência encontrada de animais positivos e negativos em cada coleta, não se observou diferença

($p > 0,05$) entre a primeira e segunda coleta nas propriedades.

As amostras consideradas positivas foram diluídas e as titulações apresentadas pelos animais foram estudadas. Houve perda de

uma amostra da Propriedade 1, primeira coleta, não sendo possível a realização da titulação da mesma. A Tab. 15 apresenta a distribuição das titulações dos animais positivos na RIFI de acordo com a propriedade e coleta.

Tabela 15: Distribuição das amostras reativas na RIFI, de acordo com a propriedade, a estação do ano e a diluição do soro, em investigação de soroprevalência equina para *Anaplasma phagocytophilum* em duas regiões do estado de Minas Gerais, Brasil

Titulação	Propriedade 1		Propriedade 2	
	Chuva	Seca	Chuva	Seca
1:160 (%)	25,00	23,53	28,95	14,71
1:320 (%)	37,50	41,18	44,74	47,06
1:640 (%)	20,83	32,35	13,16	23,56
1:1280 (%)	16,67	2,94	13,16	14,71

A titulação de 1:320 foi a com maior prevalência (43,08%) quando avaliou-se todos os animais sem considerar a propriedade e a coleta. A Propriedade 1, na estação chuvosa, apresentou maior porcentagem de animais apresentando títulos iguais a 1:1280 (16,67%), mas no total apenas 11,54% dos animais apresentaram esta titulação. Não houve diferença ($p < 0,05$) entre as propriedades e os títulos apresentados pelos animais, nem entre as coletas e dentro das propriedades.

Na Propriedade 1, não houve diferença na prevalência entre a primeira e a segunda coletas, devido a uma estabilidade já alcançada entre o agente, os hospedeiros vertebrados e invertebrados. Os equinos já devem possuir títulos protetores de imunoglobulinas, que os impedem de apresentar sintomatologia clínica, apesar da infecção ocorrer. A maior parte dos animais desta propriedade, que foram positivos na RIFI, apresentaram títulos de 1:160 e 1:320.

A Propriedade 2, apesar de não haver significância ($p > 0,05$), apresentou uma diminuição do número de animais positivos para RIFI. Nesta propriedade há um grande

fluxo de animais, tanto de entrada quanto de saída. Os animais considerados positivos na primeira coleta e que não estavam presentes na segunda, e os novos animais que não tiveram contato com o agente ou não soroconverteram contribuíram para essa diminuição.

4.2.3. Avaliação parasitológica pela capa leucocitária

No presente estudo, foram avaliados os esfregaços capas leucocitárias de todos os animais, tanto na primeira quanto na segunda coleta. Do total de 171 capas leucocitárias avaliadas, foram encontradas inclusões intracitoplasmáticas sugestivas de *A. phagocytophilum* em 22 esfregaços (12,87%). Os valores encontrados correspondem à metade do percentual relatado por Gavião Prado *et al.* (2011) em um levantamento feito com 57 equídeos de tração na região metropolitana de Belo Horizonte. Butler *et al.* (2008), ao avaliarem a capa leucocitária de seis animais com infecção natural pelo agente, encontraram cinco animais positivos. Os resultados estão apresentados na Tab. 16.

Tabela 16: Distribuição da frequência de animais de acordo com a presença de mórulas no esfregaço de capa leucocitária, propriedade e a estação do ano, em investigação de soroprevalência equina de *Anaplasma phagocytophilum* em duas regiões do estado de Minas Gerais, Brasil

Capa	Propriedade 1		Propriedade 2	
	Chuva	Seca	Chuva	Seca
Positivo (%)	2,50	20,93	18,60	8,89
Negativo (%)	97,50	79,07	81,40	91,11

A visualização de inclusões intracitoplasmáticas ocorre apenas durante a fase aguda da doença. Durante as coletas nenhum animal apresentou sintomatologia clínica característica da doença, apesar de se ter encontrado animais apresentando febre, por outras causas comprovadas, como garrotilho e theileriose. Esperar-se-ia que os animais que apresentaram inclusões ao exame da capa leucocitária apresentassem alguma sintomatologia. A ausência de sinais clínicos desses animais pode ser devido a três fatores: outras doenças concomitantes que mascararam os da anaplasiose; o agente presente nessas propriedades apresenta baixa virulência, não levando os animais à doença clínica; e em terceiro lugar os animais apresentam títulos protetores de IgG contra o agente.

4.2.4. Avaliação molecular (PCR)

Foi realizado um total de 103 análises, sendo 84 realizadas com amostras provenientes da Propriedade 1 (40 – coleta 1; 44 – coleta 2) e 19 com amostras da Propriedade 2 (9 – coleta 1; 10 – coleta 2). Apenas duas amostras (1,94%), provenientes da Propriedade 1 (1 – coleta 1; 1 – coleta 2) foram *nPCR* positivos para *A. phagocytophilum* através da análise do gene *msp4*. Após sequenciamento nucleotídico ambas as amostras apresentaram 96% de similaridade com *Anaplasma phagocytophilum*, oriundo de carrapato *I. ricinus* (número de acesso genBank: HQ661156.1).

Até onde foi possível pesquisar na literatura disponível acerca do tema, essa é a primeira

evidência molecular, com sequenciamento nucleotídico da ocorrência de *A. phagocytophilum* em equinos no Brasil. O achado revela a presença e circulação do agente na Propriedade 1. Ambos os animais não apresentavam sinais clínicos da doença no momento da coleta, talvez devido à baixa virulência da cepa encontrada.

4.2.5. Avaliação Laboratorial

4.2.5.1. Eritrograma e plaquetograma

Após análise do eritrograma e plaquetograma dos animais da Propriedade 1 e Propriedade 2, apenas o número de plaquetas do grupo não reativo da Propriedade 2 apresentou valores acima do esperado. Apesar de elevado, o número de plaquetas observado nos animais pode não ter significância clínica, pois os animais são mantidos em pasto localizado a uma grande distância do local onde foram realizadas as coletas. Com o deslocamento dos animais e o estresse a que foram submetidos, os animais poderiam apresentar contração esplênica, o que justificaria o aumento de plaquetas circulantes, devido ao exercício e à excitação dos animais, causando então uma trombocitose fisiológica, mas transitória. Mas, após ocorrência da contração esplênica, outros constituintes sanguíneos e índices hematimétricos, como eritrócitos deveriam aumentar juntamente com as plaquetas. Este aumento não foi observado nas amostras sanguíneas dos animais em questão, apesar disso, houve aumento nos valores totais de leucócitos, achado comum em casos de contração esplênica (Weiss e Wardrop, 2010).

Além disso, outras estruturas sanguíneas incomuns, como eritrócitos fantasmas ou fragmentos de eritrócitos rompidos, podem ser considerados como plaquetas pelo aparelho utilizado para análise, levando a uma pseudotrombocitose (Weiss e Wardrop, 2010). Tais achados são comuns em doenças hemolíticas, como as babesioses, mas apenas um animal apresentou inclusão intraeritrocitária característica de teileriose. Este único animal, não levaria a alteração encontrada da Propriedade 2 como um todo.

Ao se comparar os animais das Propriedades 1 e 2, levando em consideração a reatividade ou não a RIFI, observou-se diferença apenas no número de eritrócitos. Os grupos reativos e não reativos da Propriedade 1 apresentaram médias maiores ($p < 0,05$) quando comparadas àquelas do grupo reativo da Propriedade 2.

A infestação por carrapatos encontrada na Propriedade 2 foi maior ($p < 0,05$) que a encontrada na Propriedade 1. Os carrapatos são grandes espoliadores de sangue,

podendo levar o animal a anemia quando encontrados em alta quantidade em vida parasitária em apenas um hospedeiro. Como os animais da Propriedade 2 apresentaram maiores taxas de parasitismo era de se esperar que os animais apresentassem menores valores de eritrócitos. Além disso, por ser uma doença de provável transmissão por carrapatos no Brasil, também era de se esperar que os animais positivos na RIFI, por apresentarem ou terem apresentado uma maior taxa de infestação por carrapatos, apresentassem menores valores de eritrócitos quando comparados aos outros animais. De qualquer forma, é importante observar que os animais avaliados apresentaram o número de eritrócitos dentro dos valores de referência para espécie, apesar de variarem entre grupos.

Os valores de eritrograma e plaquetograma encontram-se dentro dos valores de referência esperados para a espécie. As médias seguidas dos desvios-padrões dos valores de eritrograma e plaquetograma encontram-se sumarizados na Tab. 17.

Tabela 17: Valores médios (média \pm erro padrão) do eritrograma e plaquetograma de animais reativos e não reativos à RIFI, de acordo com a propriedade, em investigação da soroprevalência equina para *Anaplasma phagocytophilum* em duas regiões do estado de Minas Gerais, Brasil

Parâmetro avaliado	Propriedade 1		Propriedade 2	
	Reativos (X \pm EP)	Não reativos (X \pm EP)	Reativos (X \pm EP)	Não reativos (X \pm EP)
Eritrócitos (x10⁶/μl)	8,25 \pm 0,21 ^a	8,23 \pm 0,36 ^a	7,79 \pm 0,20 ^b	8,18 \pm 0,54 ^{ab}
Hematócrito (%)	32,62 \pm 0,49	31,80 \pm 0,89	31,60 \pm 0,55	33,71 \pm 1,37
Hemoglobina (g/dl)	11,35 \pm 0,19	11,10 \pm 0,30	11,84 \pm 0,32	11,82 \pm 0,51
VGM (fl)	40,64 \pm 0,89	38,44 \pm 1,07	43,34 \pm 2,46	42,66 \pm 3,68
CHCM (pg)	34,73 \pm 0,34	35,11 \pm 0,72	38,30 \pm 1,35	35,60 \pm 1,43
HCM (pg)	14,00 \pm 0,26	13,35 \pm 0,36	16,18 \pm 0,84	15,18 \pm 1,31
Plaquetas (células/μl)	210350,88 \pm 13326,10	197760,00 \pm 18956,55	230166,67 \pm 15831,76	290333,33 \pm 52328,51

X=Média; EP=Erro padrão. Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha, diferem ($p < 0,05$). Valores de referência: Hematócrito: 24-44; Hemoglobina: 8-14; Eritrócitos: 5,5-9,5; Volume glogular médio (VGM): 37-58,5; Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM): 31-38; Hemoglobina Corpuscular Média (HCM): 12,3-19,7; 19-20%; Plaquetas: 120000-256000. Fonte: Jain (1993).

4.2.5.2. Leucograma

Foi observado um aumento nos valores de leucócitos totais e linfócito absoluto em todos os grupos com exceção do grupo não reativo da Propriedade 1. Os grupos reativos e não reativos da Propriedade 2 apresentaram valores relativos para linfócitos maiores que o esperado. Ao se comparar os grupos, houve diferença nos valores de neutrófilo relativo, sendo a média do grupo negativo da Propriedade 1 maior que as médias dos grupos positivo e negativo da Propriedade 2 e sem diferença para o grupo positivo da mesma

propriedade. Os valores de eosinófilo, tanto relativo quanto absoluto, foram maiores para o grupo positivo da Propriedade 2 quando comparadas aos grupos da Propriedade 1 e sem diferença quando comparado ao grupo negativo da mesma propriedade. O grupo negativo da Propriedade 1 apresentou média para basófilo relativo e absoluto maior que ambos os grupos da Propriedade 2, não havendo diferença ($p>0,05$) quando comparado ao grupo positivo da Propriedade 1. As médias e erro padrão das médias dos valores de leucograma encontram-se dispostos na Tab. 18.

Tabela 18: Valores médios absolutos (média \pm erro padrão) do leucograma de animais reativos e não reativos à RIFI, de acordo com a propriedade, em investigação da soroprevalência equina para *Anaplasma phagocytophilum* em duas regiões de Minas Gerais, Brasil

Parâmetro avaliado	Propriedade 1		Propriedade 2	
	Reativos (X \pm EP)	Não reativos (X \pm EP)	Reativos (X \pm EP)	Não reativos (X \pm EP)
Leucócitos	14965,61 \pm 1535,0 3	13780,00 \pm 1586,3 5	14257,64 \pm 796,65	15412,67 \pm 2909,3 2
Basófilo	243,83 \pm 39,78 ^a	136,36 \pm 38,37 ^{ab}	111,66 \pm 24,05 ^b	72,80 \pm 22,92 ^b
Eosinófilo	320,06 \pm 53,73 ^b	321,00 \pm 81,52 ^b	525,39 \pm 64,19 ^a	438,73 \pm 136,57 ^{ab}
Neutrófilo	6326,12 \pm 594,47	6231,15 \pm 383,51	5493,90 \pm 395,88	5782,03 \pm 955,06
Bastonete	105,42 \pm 29,74	64,84 \pm 28,12	98,25 \pm 34,87	47,06 \pm 37,64
Linfócito	7572,78 \pm 1060,91	6699,66 \pm 1196,86	7623,34 \pm 543,82	8322,13 \pm 1865,09
Monócito	428,39 \pm 67,80	394,46 \pm 90,53	432,26 \pm 54,84	765,98 \pm 197,53

X: Média; EP: Erro padrão; Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha ($p<0,05$). Valores de referência (Jain, 1993): Leucócitos Totais: 5200-13900 cels/ μ l; Basófilo absoluto: 0-290 cels/ μ l; Eosinófilo absoluto: 100-1000 cels/ μ l; Neutrófilo absoluto: 2200-8500 cels/ μ l; Bastonete absoluto: 0-1000 cels/ μ l; Linfócito absoluto: 1500-7000 cels/ μ l; Monócito absoluto: 0-1000 cels/ μ l; Relação Neutrófilo:Linfócito: 1:2-1:3.

O aumento observado nos valores de leucócitos e de linfócito absoluto em todas as propriedades, independente da reatividade ou não para a AGE, foram causados pelo estresse a que os animais foram submetidos durante a coleta e devido ao esforço físico realizado para serem encaminhados até o local da coleta. Equinos submetidos a excitação ou exercício apresentam liberação de epinefrina na circulação o que leva à migração de leucócitos marginais para o compartimento circulante. Normalmente são observados aumentos de leucócitos com

neutrofilia ou linfocitose (Thrall *et al.*, 2006), os animais não apresentaram neutrofilia, neste caso. Durante ambas as coletas na Propriedade 1 foram observados sintomas clínicos característicos de doença do trato respiratório superior, como garrotilho. Casos crônicos de garrotilho podem levar a um aumento nos valores de linfócitos e conseqüentemente nos valores de leucócitos totais. Provavelmente os animais que apresentavam a doença no momento das coletas foram responsáveis pelo aumento da média dos valores, tanto de

linfócitos quanto de leucócitos (Reed e Bayly, 2000).

Os animais da Propriedade 1 são manejados constantemente e não consideram ida ao curral, entrada no tronco e coleta de sangue tão estressante, por isso estes animais apresentaram diferença numérica nos valores de leucócitos quando comparados aos animais da Propriedade 2, os quais não são manejados frequentemente. Além disso, apenas os animais da Propriedade 2 apresentaram linfocitose, alteração característica da resposta à excitação.

Os animais do grupo positivo da Propriedade 1, que apresentaram valores maiores de basófilo, não apresentavam nenhuma alteração capaz de desencadear esse aumento. A basofilia é rara nos animais domésticos e foi considerado um achado acidental nesses animais. Já eosinofilia é uma alteração hematológica normalmente decorrente de parasitismo (Weiss e Wardrop, 2010). Os animais da Propriedade 2, que apresentaram valores mais altos eosinófilos quando comparados à outra propriedade, não são submetidos a um controle rigoroso da carga parasitária. A vermifugação não foi realizada em esquema correto de aplicações e, provavelmente, a carga parasitária são maiores que a da Propriedade 1, apresentando maiores concentrações de eosinófilos.

4.2.5.3. Bioquímica sérica

4.2.5.3.1. Perfil hepático

Os animais de ambas as propriedades apresentaram valores de GGT acima dos esperados. Como já discutido anteriormente a GGT é uma enzima com concentrações elevadas nas células dos canalículos biliares em equinos e apesar de ser considerada

essencialmente renal, no equino ela possui indicação para diagnóstico de afecções hepáticas, sendo a principal delas a colestase (Kaneko *et al.*, 2008). Apesar dos animais apresentarem elevação desta enzima não é possível avaliar a presença de colestase ou outra alteração utilizando apenas esse parâmetro. Os valores médios de GGT, quando comparados entre os grupos foram mais elevados ($p < 0,05$) na Propriedade 2 em relação à Propriedade 1, não havendo diferenças dentro das propriedades.

As demais enzimas hepáticas avaliadas encontram-se dentro do esperado para a espécie. Os valores médios e erro padrão da média para o perfil hepático, de acordo com a reatividade para a RIFI e com cada propriedade encontram-se na Tab. 19.

Quando comparados os grupos positivo e negativo, de acordo com a propriedade, houve diferença entre os valores de ALT, sendo a média dos animais negativos da Propriedade 1 maior que as médias do grupo positivo da Propriedade 1 e ambos os grupos de Propriedade 2.

As concentrações de ALT no fígado e músculo de equinos varia muito pouco, assim, não deve ser utilizada para diagnóstico de lesão hepática sem levar em consideração outras enzimas hepáticas consideradas mais sensíveis. Em seres humanos a anaplasose granulocítica leva ao aumento de ALT, juntamente com o aumento de AST (Aguero-Rosenfeld, 2002). Não se sabe as alterações que a doença pode causar nos valores dessa enzima em equinos, mas ao se extrapolar os dados presentes na literatura para a doença em seres humanos, os valores encontrados no presente estudo, estão em desacordo com o descrito pela literatura (Leipidi *et al.*, 2000; Aguero-Rosenfeld, 2002).

Tabela 19: Valores médios (média ± erro padrão) do perfil hepático entre os grupos de animais reativos e não reativos à RIFI de acordo com a propriedade, em investigação da soroprevalência equina para *Anaplasma phagocytophilum* em duas regiões do estado de Minas Gerais, Brasil

Parâmetro avaliado	Propriedade 1		Propriedade 2	
	Reativos (X±EP)	Não reativos (X±EP)	Reativos (X±EP)	Não reativos (X±EP)
ALT	8,18±0,54 ^b	9,68±0,75 ^a	7,06±0,53 ^{bc}	5,68±1,02 ^c
AST	320,98±6,12	328,64±10,83	332,73±7,59	317,06±17,85
GGT	16,05±1,02 ^b	14,72±2,13 ^b	22,98±4,11 ^a	20,12±1,26 ^a
FA	257,62±11,50	256,44±17,58	280,88±12,60	248,06±29,09

X: Média; SE: Erro padrão. Médias seguidas de letras distintas na mesma linha, diferem entre si (p<0,05) Valores de referencia (Meyer *et al.*, 1995; Kaneko *et al.*, 1997) GGT: 4-13,4 UI/l; AST: 226-366 UI/l; ALT: 3-23 UI/l; FA: 86-295 UI/l.

Apesar de apresentar concentrações mais elevadas no grupo negativo da Propriedade 1, o uso da ALT como ferramenta diagnóstica é limitado dentro da avaliação bioquímica em equinos, por isso não é possível afirmar que exista lesão hepática ou muscular nos animais apresentando maiores concentrações séricas da enzima. Além disso, mesmo com a significância estatística entre os grupos, todos os valores apresentaram-se dentro do limite de

referência para a espécie. Clinicamente, tal achado não possui significância.

4.2.5.3.2. Perfil Renal

Os animais de ambas as propriedades, independente do grupo, apresentaram ureia e creatinina, dentro dos valores de referência para a espécie. A Tab. 20 sumariza as médias encontradas para cada parâmetro.

Tabela 20: Valores médios (média ± erro padrão) do perfil renal entre os grupos de animais reativos e não reativos à RIFI de acordo com a propriedade, em investigação da soroprevalência equina para *Anaplasma phagocytophilum* em duas regiões do estado de Minas Gerais, Brasil

Parâmetro avaliado	Propriedade 1		Propriedade 2	
	Reativos (X±EP)	Não reativos (X±EP)	Reativos (X±EP)	Não reativos (X±EP)
Ureia	50,06±2,84	43,96±2,76	41,91±1,47	42,80±3,14
Creatinina	1,48±0,03 ^a	1,40±0,05 ^{ab}	1,30±0,03 ^b	1,46±0,11 ^{ab}

X: Média; EP: Erro padrão. Médias seguidas de letras distintas na mesma linha, diferem entre si (p<0,05) Valores de referencia: (Kaneko *et al.*, 1997) Uréia:21,4-51,5 mg/dl; Creatinina: 0,9-2,0 mg/dl.

Ao se avaliar os valores de creatinina, comparando os grupos, observou-se que o grupo positivo da Propriedade 1 apresentou média maior que o grupo positivo da Propriedade 2. A creatinina, por ser totalmente excretada pelos rins, é muito utilizada como parâmetro de avaliação da integridade glomerular tanto em medicina veterinária quanto na medicina humana.

Alguns animais da Propriedade 1 apresentavam hipertermia no momento da coleta, condição clínica que leva ao aumento da creatinina, pois animais febris diminuem a ingestão de água e conseqüentemente se tornam desidratados, aumentando os valores de creatinina. A avaliação da creatinina isoladamente não é informativa de lesão renal, sendo importante avaliação conjunta

com a ureia. Os animais de ambas as propriedades não apresentaram alterações nas concentrações de ureia sérica, o que nos permite afirmar que em nenhuma das propriedades há ocorrência de algum tipo de lesão renal.

Outra causa comum de aumento de creatinina são as piroplasmoses, que são consideradas causas extrarrenais de aumento do analito (Kaneko *et al.*, 2008). Um animal da Propriedade 1 e outro da Propriedade 2 apresentaram inclusões intra eritrocitárias sugestivas de theileriose, mas não

apresentaram elevação individual do analito capaz de elevar os valores médios dos grupos estudados, sendo a hipertermia e/ou desidratação as causas mais prováveis deste aumento.

4.2.5.3.3. Perfil proteico

Todos os grupos estudados apresentaram valores de globulina acima dos valores de referência. A relação albumina:globulina encontrou-se aumentada apenas para o grupo negativo da Propriedade 1.

Tabela 21: Valores médios (média \pm erro padrão) do perfil proteico entre os grupos de animais reativos e não reativos à RIFI, de acordo com a propriedade, em investigação da soroprevalência equina para *Anaplasma phagocytophilum* em duas regiões do estado de Minas Gerais, Brasil.

Parâmetro avaliado	Propriedade 1		Propriedade 2	
	Positivos (X \pm EP)	Negativo (X \pm EP)	Positivos (X \pm EP)	Negativo (X \pm EP)
Proteínas Plasmáticas	6,89 \pm 0,08 ^{bc}	6,62 \pm 0,12 ^c	7,52 \pm 0,06 ^a	7,16 \pm 0,13 ^b
Proteínas Séricas	7,23 \pm 0,18	7,16 \pm 0,29	7,00 \pm 0,18	7,48 \pm 0,43
Albumina	3,36 \pm 0,14	3,22 \pm 0,24	3,07 \pm 0,14	3,76 \pm 0,26
Globulina	3,86 \pm 0,18	3,93 \pm 0,35	3,93 \pm 0,19	3,17 \pm 0,36
Albumina:Globulina	1,10 \pm 0,10	2,51 \pm 1,20	1,20 \pm 0,21	1,24 \pm 0,17

X: Média; EP: Erro padrão. Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha, diferem ($p < 0,05$). Valores de referência (Robinson, 1997; Kaneko *et al.*, 2008); Albumina: 2,4-4,0 mg/dl; Proteínas totais: 5,2-7,9 mg/dl; Globulinas: 2,62-4,04 mg/dl; Albumina:Globulina: 0,62-1,46.

Ao se comparar os grupos reativos e não reativos, de acordo com cada propriedade, os animais positivos da Propriedade 2 apresentaram valor de proteínas plasmáticas maior que ambos os grupos da Propriedade 1 e maior que o grupo negativo dentro da mesma propriedade. Mesmo o grupo apresentando valor maior que o restante dos grupos, o valor encontrado está dentro do intervalo de referência não se caracterizando hiperproteinemia. Essa condição acontece quando há perda de fluidos pelo animal, levando a uma maior concentração das proteínas plasmáticas, então, a hiperproteinemia observada, na verdade, pode ser considerada como relativa, pois não há aumento na quantidade de proteínas

presentes na circulação (Kaneko *et al.*, 2008).

As globulinas são proteínas presentes no plasma dos animais domésticos e são divididas em alfa, beta e gama globulinas (Kaneko *et al.*, 2008). Para avaliação da concentração de cada fração das globulinas presentes na amostra seria interessante realização de eletroforese das proteínas, o que não foi realizado no estudo em questão.

O aumento das globulinas, de uma forma geral, pode ser devido ao aumento de uma ou de várias frações, mas normalmente está associado a quadros infecciosos, com aumento, principalmente das gama ou imunoglobulinas (Kaneko *et al.*, 2008).

Apesar de ser um bom preditor de quadros infecciosos, a avaliação dos valores de globulina não nos informa qual o agente causador da infecção que animal apresenta. O aumento observado em todos os grupos (Tab. 21) pode ser devido a anaplasmose granulocítica equina, mas também por outra causa não elucidada durante a avaliação dos animais.

4.2.7. Estudo da incidência cumulativa de anaplasmose granulocítica equina

Na população estudada, o número de animais com risco de adoecer foi estipulado, utilizando como critério a negatividade à RIFI na estação chuvosa (n=18). O número de casos novos, na estação seca foi de 15 animais. A incidência cumulativa encontrada foi de 83,3% em seis meses.

Apenas três animais foram negativos para a RIFI tanto na estação chuvosa quanto na seca e 26 apresentaram reatividade em ambas as coletas. Oito animais foram positivos na estação chuvosa, mas não apresentaram reatividade na seca. E, 15 foram positivos apenas na estação seca. Dos 26 animais positivos na sorologia pela RIFI, tanto na estação chuvosa quanto na seca, obteve-se 34,62% (9/26) com títulos mais elevados na seca em relação à estação chuvosa, 46,16% (12/26) com títulos mais baixos na seca em relação à chuva, e 19,24% (5/26) apresentaram títulos inalterados em ambas as coletas.

Neste grupo de animais (n=26), observou-se apenas seis positivos à avaliação de capa leucocitária, sendo dois na primeira coleta e quatro na segunda. Dois animais foram positivos para a PCR, sendo um na primeira coleta e o outro na segunda.

A incidência cumulativa encontrada foi considerada muito alta. Isto mostra que os animais das propriedades são susceptíveis à infecção por *A. phagocytophilum* e também, que há circulação ativa do mesmo entre eles,

evidenciada de três formas: manutenção, diminuição ou aumento da titulação.

A manutenção da titulação, observada em 19,24% (5/26) dos animais avaliados pode ser devido à constante exposição dos mesmos ao agente. Outra possibilidade é a manutenção dos títulos, sem nova exposição ao agente, por mais de seis meses. A diminuição da titulação, observada em 46,16% dos animais avaliados ocorreu porque os mesmos, provavelmente encontravam-se na fase de convalescença ou infectados há um período maior de tempo no momento da primeira coleta, havendo diminuição dos títulos nos seis meses entre uma e outra coleta. Os animais das propriedades podem ter sido expostos à nova infecção, após queda dos títulos a níveis não protetores, e no momento da segunda coleta ainda estavam apresentando ascensão nos valores dos títulos. Os animais que apresentaram aumento dos títulos (34,62%) provavelmente estavam com os títulos apresentados na primeira coleta diminuindo de uma infecção anterior e ao atingirem níveis não protetores os animais foram re-infectados e, no momento da segunda coleta apresentavam-se no pico de produção de IgG anti-*A. phagocytophilum*.

Houve alteração na quantidade de animais apresentando-se parasitados por carrapatos entre as estações avaliadas em ambas as propriedades, mas não houve diferença na soroprevalência nas duas estações. Zhang *et al.* (2008) relataram a transmissão do agente entre seres humanos através de secreção de um paciente infectado e internado para seus familiares que tiveram contato com o mesmo. Ainda não se sabe qual o vetor na doença no Brasil, sendo que outras formas de infecção podem estar envolvidas na epidemiologia da doença, como o contato com secreção ou a participação de outros vetores além do carrapato. Provavelmente, outras formas de transmissão da doença estão presentes nas propriedades já que, mesmo havendo alteração na infestação por

carrapatos entre as coletas não houve alteração no perfil epidemiológico encontrado.

4.3. Comparação clínica entre animais positivos e negativos para anaplasmoses granulocítica equina

Foram comparados os perfis hematológicos e bioquímicos destes animais. Observou-se

diferença ($p < 0,05$) entre os grupos nos parâmetros: Eritrócitos, VCM, HCM, Bastonete relativo e absoluto, Albumina, Globulina, relação albumina:globulina, ALT e AST. O número de plaquetas não apresentou diferença entre os grupos ($p = 0,0592$). Os valores dos parâmetros que diferiram entre os grupos estão apresentados na Tab. 22.

Tabela 22: Comparação de perfil hematológico e bioquímico de animais positivos na capa leucocitária ou PCR e animais negativos na capa leucocitária e PCR, sem alteração clínica aparente

Parâmetros avaliados	Negativos (X±EP)	Positivos (X±EP)
Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	8,19±0,29 ^a	7,42±0,27 ^b
VCM (fl)	38,30±0,92 ^b	45,91±4,70 ^a
HCM (pg)	13,80±0,40 ^b	16,50±1,42 ^a
Bastonete relativo (%)	0,27±0,14 ^b	0,81±0,22 ^a
Bastonete absoluto ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	31,96±16,20 ^b	133,60±60,36 ^a
Albumina	3,24±0,14 ^b	2,82±0,12 ^a
Globulina	3,57±0,17 ^b	4,07±0,15 ^a
Albumina:Globulina	1,19±0,19 ^a	0,77±0,08 ^b
ALT	8,56±0,65 ^a	7,10±0,60 ^b
AST	320,45±9,14 ^a	295,59±9,94 ^b
Plaquetas (células/ μl)	180726,38±19010,18	116687,89±16593,15

X: Média; EP: Erro padrão; Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$); Valores de referência: Eritrócitos: 5,5–9,5; Volume corpuscular médio (VCM): 37–58,5; Hemoglobina Corpuscular Média (HCM): 12,3–19,7; Bastonete absoluto: 0–1000 cels/ μl ; Bastonete relativo: 0–2%; AST: 226–366 UI/l; ALT: 3–23 UI/l; Albumina: 2,4–4,0 mg/dl; Globulinas: 2,62–4,04 mg/dl; Albumina:Globulina: 0,62–1,46; Plaquetas: 120000–256000. Fonte: Jain (1993); Meyer *et al.* (1995); Kaneko *et al.* (1997).

Animais em fase aguda da doença apresentam parasitemia detectável e apresentam alterações hematológicas e bioquímicas (Butler *et al.*, 2008). A anemia é uma das alterações observadas em equinos com AGE (Lepidi *et al.*, 2000). Apesar de ambos os grupos apresentarem valores normais para o número de eritrócitos, o grupo positivo apresentou média menor quando comparado ao grupo negativo. Há possibilidade de esta diminuição ser devido a maior destruição de eritrócitos pelo sistema monocítico fagocitário. Não se sabe qual o mecanismo específico que leva a maior hemocaterese nos animais infectados pelo agente (Lepidi *et al.* 2000).

O aumento de bastonetes relativo e absoluto (desvio a esquerda) demonstra que os animais positivos apresentaram, em algum momento do curso da doença clínica, neutropenia e responderam produzindo e liberando da medula óssea maior quantidade de células jovens para restabelecer os valores normais deste parâmetro. Apesar de a neutropenia com desvio a esquerda ser um achado importante nos casos de AGE (Aguero-Rosenfeld, 2002), os animais estudados poderia apresentar co-infecções não identificadas no momento das coletas que poderia reduzir os valores de neutrófilos, consequentemente aumentando os valores dos bastonetes.

Em relação ao perfil proteico, observou-se aumento nas concentrações de globulinas e diminuição na concentração de albumina e na relação albumina:globulina. Durante a fase aguda da doença há produção de imunoglobulinas, principalmente as imunoglobulinas M e A, consideradas de fase aguda. As imunoglobulinas são responsáveis pelo reconhecimento do agente pelas células apresentadoras de antígeno e pelas células de defesa (Abbas, 2008). Apesar de o *A. phagocytophilum* ser uma bactéria intracelular obrigatória, ele leva a alterações na membrana das células infectadas as tornando não-próprias ao organismo do animal e conseqüentemente havendo maior produção de imunoglobulinas no intuito de eliminar o agente (Kaneko *et al.*, 2008).

A albumina é a principal proteína presente na circulação, sendo a maior responsável pela manutenção da pressão oncótica sanguínea. Ela também é responsável pelo transporte de substâncias e em casos de maior consumo proteico, o animal a utiliza como fonte de proteína (Kaneko *et al.*, 2008). Durante a AGE há menor ingestão de alimentos, mas, em contrapartida, há maior exigência proteica para realização das funções celulares básicas e para produção de

anticorpos. Os animais, para suprirem o menor aporte proteico dietético, se utilizam das reservas de albumina na tentativa de manter a homeostase.

Os valores de AST e ALT foram menores no grupo positivo quando comparado ao grupo negativo, apesar de ambos os grupos apresentarem valores dentro da faixa de referência para a espécie. Esperava-se que essas enzimas estivessem elevadas no grupo positivo, pois há evidências de lesão hepática durante a fase aguda da AGE (Lepidi *et al.*, 2000; Agüero-Rosenfeld, 2002).

4.4. Casos clínicos de AGE atendidos no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais

Os equídeos atendidos no HV-EV/UFMG apresentaram alterações hematológicas caracterizadas por leucocitose com neutrofilia e desvio a esquerda (aumento no valor de bastonetes relativos) apenas na terceira coleta. Os valores médios dos perfis hematológicos e bioquímicos estão apresentados nas Tab. 23., Tab. 24 e Tab. 25.

Tabela 25: Perfil hematológico dos animais atendidos no HV-EV/UFMG nos anos de 2010 a 2013 apresentando AGE, com diagnóstico através de capa leucocitária ou PCR

Parâmetro avaliado	Coleta 1 Diagnóstico	Coleta 2 48-72h após início do tratamento	Coleta 3 96-144h após início do tratamento
Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	7,58	6,93	7,34
Hematócrito (%)	29,83	29,25	30,33
Hemoglobina (g/dl)	10,41	10,3	10,6
VCM (fl)	39,93	44,23	41,95
HCM (pg)	14,21	15,81	15,04
CHCM (g/dl)	35,43	36,15	35,88
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	108,80	135,50	190,00

Valores de referência: Hematócrito: 24-44; Hemoglobina: 8-14; Eritrócitos: 5,5-9,5; Volume glomerular médio (VGM): 37-58,5; Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM): 31-38; Hemoglobina Corpuscular Média (HCM): 12,3-19,7; Plaquetas: 120-256 $\times 10^3/\mu\text{l}$. Fonte: Jain (1993); Oliveira (2007).

À bioquímica, no momento do diagnóstico, foram observados: hiperfibrinogenemia, hipoalbuminemia, diminuição sérica da AST e aumento da ALT e GGT.

O hematócrito dos animais mesmo dentro dos valores de referência está baixo. Isso se deve ao fato de os animais apresentarem, além da AGE, outras afecções (doença neurológica, diarreia, politraumatismo, flebite de jugular e afecção do trato reprodutivo) que podem levar à queda do hematócrito devido a diversas causas. Além disso, dentre os animais atendidos, estão animais pertencentes ao Projeto Carroceiros, animais estes que recebem alimentação muitas vezes deficiente que pode levar à diminuição do número de eritrócitos e também do hematócrito. Um animal apresentou anemia normocítica

normocrômica. Os valores de eritrócito e de hematócrito voltaram aos valores de normalidade após a instituição do tratamento com oxitetraciclina longa ação (dose 15mg/kg, IM, durante cinco aplicações intervaladas de 48h entre a primeira e a segunda aplicações e 72h nas demais aplicações).

Os animais apresentaram trombocitopenia, no momento do diagnóstico, com retorno aos valores de referência 48-72 horas após instituição do tratamento. Em dois animais observou-se trombocitopenia grave durante a internação (15000 e 43000 células/ μ l). Ambos apresentaram melhora do número de plaquetas após o início do tratamento. Um deles, mesmo com tratamento, foi a óbito devido à afecção primária (quadro neurológico).

Tabela 24: Perfil leucocitário dos animais atendidos no HV-EV/UFGM nos anos de 2010 a 2013 apresentando AGE, com diagnóstico através de capa leucocitária ou PCR

Parâmetro avaliado	Coleta 1 Diagnóstico	Coleta 2 48-72h após início do tratamento	Coleta 3 96-144h após início do tratamento
Leucócitos (células/μl)	11993,33	12605,00	16166,66
Bastonete absoluto (células/μl)	84,25	433,50	1773,33
Segmentado absoluto (células/μl)	9193,00	7507,75	10096,96
Linfócito absoluto (células/μl)	2455,91	3577,45	3359,33
Monócito absoluto (células/μl)	259,75	709,00	926,66
Basófilo absoluto (células/μl)	0	97,06	0
Eosinófilo absoluto (células/μl)	0	609,00	1152,00
Relação Neutrófilo:Linfócito	3,71	2,09	3,01

Valores de referência (Jain, 1993): Leucócitos Totais: 5200-13900 cels/ μ l; Basófilo absoluto: 0-290 cels/ μ l; Eosinófilo absoluto: 100-1000 cels/ μ l; Neutrófilo absoluto: 2200-8500 cels/ μ l; Bastonete absoluto: 0-1000 cels/ μ l; Linfócito absoluto: 1500-7000 cels/ μ l; Monócito absoluto: 0-1000 cels/ μ l; Relação Neutrófilo:Linfócito: 1:2 – 1:3 .

Observou-se leucocitose apenas na terceira coleta, embora o aumento tenha sido evidenciado a partir da segunda coleta. De forma similar a contagem de bastonetes, tanto relativo quanto absoluto, acompanhou o aumento dos leucócitos. Provavelmente, a causa deste aumento é a afecção primária dos animais. Um animal havia sofrido politraumatismo e apresentava feridas infeccionadas em três regiões do corpo; outro animal foi encaminhado devido a

sintomatologia neurológica; dois animais apresentavam diarreia; um animal flebite de jugular grave e o último animal problemas reprodutivos.

A presença de formas jovens de neutrófilo indica que os animais apresentavam responsividade ao insulto e não havia alteração na granulocitopoiese. O aumento do número de neutrófilos observado explica o aumento na relação neutrófilo:linfócito

pois esta aumenta principalmente em casos de infecções agudas que leva ao aumento de neutrófilos observado (Trhall *et al.*, 2006).

As alterações observadas no perfil bioquímico destes animais é compatível de animais apresentando alterações, provavelmente de caráter infeccioso e agudo. O aumento das globulinas é um bom indicador de infecção, pois há aumento dos valores enquanto o organismo se mobiliza

para conter o agente e uma das formas é pela produção de imunoglobulinas. É difícil afirmar que a maior produção de globulinas apresentadas pelos animais seja devido a AGE, mas pode-se afirmar que a afecção contribuiu para esse aumento. Apesar do aumento, os valores da relação albumina:globulina se mantiveram dentro dos valores de referência.

Tabela 25: Perfil bioquímico dos animais atendidos no HV-EV/UFGM nos anos de 2010 a 2013 apresentando AGE, com diagnóstico através de capa leucocitária ou PCR

Parâmetro avaliado	Coleta 1 Diagnóstico	Coleta 2 48-72h após início do tratamento	Coleta 3 96-144 após início do tratamento
Proteína total (mg/dl)	6,68	7,13	7,60
Fibrinogênio (g/dl)	500,00	400,00	466,66
Albumina (mg/dl)	2,11	2,41	2,30
Globulina (mg/dl)	3,90	4,41	5,70
Relação albumina:globulina	0,58	0,58	0,40
AST (U/L)	203,82	271,76	121,00
ALT (U/L)	35,05	32,88	41,00
GGT (U/L)	34,71	10,77	17,00
FA (U/L)	251,26	167,82	134,00
Ureia (mg/dl)	33,66	32,94	33,00
Creatinina (mg/dl)	1,40	1,12	0,7

Valores de referência (Meyer *et al.*, 1995; Kaneko *et al.*, 1997): Uréia:21,4-51,5 mg/dl; Creatinina: 0,9-2,0 mg/dl; GGT: 4-13,4 UI/l; AST: 226-366 UI/l; ALT: 3-23 UI/l; FA: 86-295 UI/l; Albumina: 2,4-4,0 mg/dl; Proteínas totais: 5,2-7,9 mg/dl; Fibrinogênio: 200-400g/dl; Globulinas: 2,62-4,04 mg/dl; Albumina:Globulina: 0,62-1,46.

A alteração das concentrações séricas das enzimas hepáticas demonstra que em algum momento, no decorrer da internação e/ou da infecção, os animais apresentaram certo grau de lesão hepática. Sabe-se que o *A. phagocytophilum* leva a lesão hepática e consequentemente ao aumento de suas enzimas, principalmente ALT e AST (Lepidi *et al.*, 2000), mas também as afecções primárias, lesões musculares decorrente de decúbito prolongado ou aplicações medicamentosas podem ter sido responsáveis pelas alterações das enzimas hepáticas encontradas.

Todos os animais apresentaram sintomatologia clínica de AGE e presença de

inclusões intracitoplasmáticas após a internação por outras causas. Morbidades e internação são fatores de estresse, principalmente para equinos que costumam apresentar infecções secundárias ou reagudização de infecções crônicas após tais ocorrências, tal fato se deve pela imunodepressão causada pela maior liberação de corticosteroides endógenos (Abbas e Lichtman, 2008). Provavelmente, os pacientes internados apresentavam a infecção pelo agente, desenvolvendo sintomatologia clínica após o desenvolvimento da afecção primária e internação.

5. CONCLUSÕES

- A infecção por *A. phagocytophilum* está presente nos municípios de Belo Horizonte, Ataléia e São Vicente de Minas, Minas Gerais, Brasil;
- Não houve relação da infecção por *A. phagocytophilum* com sexo e idade entre os animais das propriedades de Ataléia e São Vicente de Minas;
- A maior prevalência da infecção em Belo Horizonte foi detectada na Regional Venda Nova;
- Não foram encontradas alterações nos perfis hematológicos e bioquímicos em animais sororreagentes para *A. phagocytophilum* nos animais de Belo Horizonte;
- A prevalência sorológica para *A. phagocytophilum* nos municípios de Ataléia e São Vicente de Minas, Minas Gerais, foi semelhante;
- A incidência cumulativa foi semelhante nas propriedades avaliadas nos municípios de Ataléia e São Vicente de Minas, Minas Gerais;
- As propriedades estudadas nos municípios de Ataléia e São Vicente de Minas encontram-se em equilíbrio enzoótico para a doença;
- Os animais de diferentes regiões de Minas Gerais estão susceptíveis a infecção, tanto clínica quanto subclínica, por *A. phagocytophilum*;
- Os animais com infecção aguda diagnosticada pela presença de inclusão intracitoplasmática ou PCR apresentaram hipoalbuminemia, hiperglobulinemia e diminuição nas concentrações de ALT e AST;
- A AGE ainda é sub-diagnosticada no estado de Minas Gerais;
- Até onde foi possível pesquisar na literatura disponível, este foi o primeiro registros de detecção molecular, com confirmação pelo sequenciamento nucleotídico, da infecção por *A. phagocytophilum* em equídeos, no Brasil.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Mais levantamentos sorológicos e moleculares, em equinos, devem ser realizados a fim de se entender melhor a dinâmica do agente na população equina brasileira;
- Cultivo *in vitro* e isolamento de cepas brasileiras para sua melhor descrição clínica e molecular, devem ser o foco dos pesquisadores;
- Mais ensaios clínicos devem ser realizados para entendimento das alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas, causadas pela infecção por *A. phagocytophilum* em equinos.

7. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.A.K.; LICHTMAN, S.H. Imunologia celular e molecular. 6ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 566p.
- ADASZEK, Ł; WINIARCZYK, S. Identification of *Anaplasma* spp. Rickettsia isolated from horses from clinical disease cases in Poland. *Zoonoses and Public Health*, v.58, p.514-518, 2011.
- ADASZEK, Ł; WINIARCZYK, S.; TUKASZEWSKA, J. A first case of ehrlichiosis in a horse in Poland. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, v.16, p.330-334, 2009.
- AGUERO-ROSENFELD, M.E. Diagnosis of human granulocytic Ehrlichiosis: State of art. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, v.2, p. 233-240, 2002.
- AGUIAR, D.M.; SAITO, T.B.; HAGIWARA, M.K. *et al.* Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. *Cienc. Rural*, v.37, p.796-802, 2007.
- ALMEIDA FILHO, N.; ROUQUAYROL, M. Z. Introdução à epidemiologia 4 ed. revisada e ampliada. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 282p.

- ARAGÃO, H., FONSECA, F. Notas de ixodologia VIII. Lista e chave para representantes da fauna ixodologica brasileira. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.59, p.115-129, 1961.
- ARTURSSON, K.; GUNNARSSON, A.; WIKSTRÖM, U. *et al.* A serological and clinical follow-up in horses with confirmed equine granulocytic ehrlichiosis. *Equine Veterinary Journal*, v. 31, p. 473-477, 1999.
- BAKKEN, J.S.; DUMLER, J.S.; CHEN, S. *et al.* Human Granulocytic Ehrlichiosis in the Upper Midwest United States. A new species emerging? *JAMA*, v.272, p.212-218, 1994.
- BAKKEN, J.S.; DUMLER, J.S. Human granulocytic ehrlichiosis. *Clin. Infect. Dis.*, v. 31, p. 554-560, 2000.
- BAKKEN, J.S.; KRUEH, J.K.; LUND, T. *et al.* Exposure to deer blood may be a cause of Human Granulocytic Ehrlichiosis. *Clin Infect Dis*, v. 23, p. 198, 1996.
- BELLO, A.C.P.P.; CUNHA, A.P.; LEITE, R.C. *et al.* Controle de *Anocentor nitens* (NEUMANN, 1897) (ACARI:IXODIDAE) em equinos. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 17, supl. 1, p. 59-63, 2008.
- BJÖERSDORFF, A.; BAGERT, B.; MASSUNG, R.F. *et al.* Isolation and characterization of two European strains of *Ehrlichia phagocytophila* of equine origin. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v.9, p.341-343, 2002.
- BRODIE, T.A.; HOLMES, P.H.; URQUHART, G.M. Prophylactic use of long-acting tetracycline against tick-borne (*Cytoecetes phagocytophila*) in sheep. *Vet. Res.*, v.122, p. 43-44, 1988.
- BUTLER, C.M.; NIJHOF, A.M. JONGEJAN, F. *et al.* *Anaplasma phagocytophilum* infection in the Netherlands. *The Vet. Rec.*, v.162, p.216-218, 2008.
- CABLE, R.G.; LEIBY, D.A. Risk and prevention of transfusion-transmitted babesiosis and other tick-borne diseases. *Curr. Opin. on Hematol.*, v.10, p.405-411, 2003.
- CARLYON, J. A.; FIRKING, E. Invasion and survival strategies of *Anaplasma phagocytophilum*. *Cellular Microbiol.*, v.5, p.743-754, 2003.
- CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. (CEPANZO). Procedimientos para estudios de prevalencia de enfermedades cronicas en el ganado. Ramos Mejia, Buenos Aires, 1973. 35p. (Nota Técnica, 18).
- CHAE, J.; FOLEY, J.E.; DUMLER, J.S. *et al.* Comparison of the nucleotide sequences of 16S rRNA, 444Ep-ank, and groESL heat shock operon genes in naturally occurring *Ehrlichia equi* and Human Granulocytic Ehrlichiosis agent isolates from Northern California. *J. Clin Microbiol*, v.38, p.1364-1369, 2000.
- CHOI, K.; WEBB, T.; OELKE, M. *et al.* Differential innate immune cell activation and proinflammatory response in *Anaplasma phagocytophilum* infection. *Infection and Immun.*, v.75, p.3124-3130, 2007.
- COSTA, M. C.; ISERNHAGEN, A. J.; MORAES, F. L. Z. *et al.* Ausência de diarreia em equídeos medicados com oxitetraciclina. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 25, p; 245-248, 2004.
- COWELL, R.L.; TYLER, R.D. Diagnostic cytology and hematology of the horse. 2 ed. Estados Unidos: Mosby, 2002. 241 p.
- CUNHA, A.P.; BELLO, A.C.P.P.; LEITE, R. C. *et al.* Avaliação de parâmetros clínicos e hematológicos de equinos submetidos a um programa de controle estratégico de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.60, p.113-120, 2008.

- DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.S.A.; VIDOTTO, O. Erliquiose nos animais e no homem. *Semina: Cienc. Agrárias*, v. 22, p. 191-201, 2001.
- DANTAS-TORRES, F.; ONOFRIO, V.C.; BARROS-BATTESTI, D.M. The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil. *Systematic and Appl. Acarol.*, v.14, p.30-46, 2009.
- DAVIES, R.S.; MADIGAN, J.E.; HODZIC, E. *et al.* Dexamethasone-induced cytokine changes associated with diminished disease severity in horses infected with *Anaplasma phagocytophilum*. *Clin Vaccine Immunol*, v.18, p.1962-1968, 2011.
- DE LA FUENTE, J.; NARANJO, V.; RUIZ – FONS, F. *et al.* Prevalence of tick-borne pathogens in ixodid ticks (Acari: Ixodidae) collected from European wild boar (*Sus scrofa*) and Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) in central Spain. *Eur J Wildl Res*, v.50, p. 187-196, 2004.
- DE LA FUENTE, J.; NARANJO, V.; RUIZ – FONS, F. *et al.* Potencial vertebrate reservoir hosts and invertebrate vectors of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in central Spain. *Vector – borne and zoonotic dis.*, v.5, p.390-401, 2005.
- DIAS, D.C.R. *Influência do exercício e da suplementação com vitamina E e Selênio sobre o hemograma, atividade de enzimas marcadoras de lesão muscular e índice de peroxidação de biomoléculas em cavalos de hipismo clássico submetidos à prova de saltos*. 2008. 101p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- DUGAN, V.G.; YABSLEY, M.J.; TATE, C.M. *et al.* Evaluation of White-Tailed deer (*Odocoileus virginianus*) as natural sentinels for *Anaplasma phagocytophilum*. *Vector-borne and Zoonotic Dis.*, v. 6, p. 192-207, 2006.
- DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.J. *et al.* Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and ‘HE agent’ as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *IJSEM*, v. 51, p. 2145-2165, 2001.
- DUMLER, J.S.; TRIGIANI, E.R.; BAKKEN, J. S. *et al.* Serum cytokine response during acute human granulocytic ehrlichiosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunol.*, v.7, p.6-8, jan., 2000.
- DZIEGIEL, B.; ADASZEK, Ł.; KALINOWSKI, M. *et al.* Equine granulocytic anaplasmosis. *Res. Vet. Sci.*, v.95, p.316-320, 2013.
- ERLICH, H. A. Polymerase chain reaction. *J Clinical Immunol.*, v.9, p.437-447, 1989.
- FERNANDÉZ-SOTO, P.; PÉREZ-SÁCHEZ, P.; ENCINAS-GRANDES, A. Molecular detection of *Ehrlichia phagocytophila* genogroup organisms in larvae of *Neotrombicula autumnalis* (Acari: Trombiculidae) captured in Spain. *J. Parasitol.*, v.87, p.1482-1483, 2001.
- FERREIRA, C.S.; CARVALHO, M.E. Reações de Imunofluorescência indireta: Algumas modificações de sua técnica. *Revista de Saúde Pública*, v.7, p.303-306, 1973.
- FERREIRA, R.F.; CERQUEIRA, A.M.F.; PEREIRA, A.M. *et al.* Avaliação da ocorrência de reação cruzada em cães positivos para *Anaplasma platys* testados em ELISA comercial para detecção de anticorpos de *Anaplasma phagocytophilum*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.17, supl. 1, p.5-8, 2008.
- FOGGIE, A. Preservation of the agent of tick-borne fever in frozen state. *J. Comparative Pathol.*, v.76, p.413-416, 1966.

- FOLEY, J.; NIETO, N.; MADIGAN, J. *et al.*, Possible differential host tropism in *Anaplasma phagocytophilum* strains in the western United States. In: Animal biodiversity and Emerging Diseases, 1149, 2008, New York. Annals of New York Academy Sciences. New York: 2008, p.94-97. (Resumo Expandido)
- FRANZÉN, P.; ASPAN, A.; EGENVALL, A. *et al.* Acute clinical, hematological, serologic, and polymerase chain reaction findings in horses experimentally infected with a European strain of *Anaplasma phagocytophilum*. *J. Vet. Intern. Med.*, v.19, p.232-239, 2005.
- FRANZÉN, P.; ASPAN, A.; EGENVALL, A. *et al.* Molecular evidence of persistence of *Anaplasma phagocytophilum* in the absence of clinical abnormalities in horses after recovery from acute experimental infection. *J. Vet. Intern. Med.*, v.23, p.636-642, 2009.
- GAVIÃO PRADO, L.; BASTOS, C.V.; PALHARES, M.S. *et al.* Light – weight draft equids seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in urban area of Minas Gerais, Brazil. TTP7: Ticks and Tick-borne pathogens International Conference. Zaragoza (Spain), 2011.
- GIUDICE, E.; GIANNETTO, C.; FURCO, V. *et al.* *Anaplasma phagocytophilum* seroprevalence in equids: a survey in Sicily (Italy). *Parasitol Res*, v. 111, p. 951-955, 2012.
- GOODMAN, J.L.; NELSON, C.; VITALE, B. *et al.* Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis. *The New England J. Med.*, v.334, 1996.
- GRANQUIST, E.G.; BÅRDSSEN, K. BERGSTRÖM, K. *et al.* Variant –and individual dependent nature of persistent *Anaplasma phagocytophilum* infection. *Acta Vet. Scand.*, v. 52, 2010a.
- GRANQUIST, E. G.; ALEKSANDERSEN, M.; BERGSTRÖM, K. *et al.* A morphological and molecular study of *Anaplasma phagocytophilum* transmission events at the time of *Ixodes ricinus* tick bite. *Acta Vet. Scand.*, v.52, 2010b.
- GRIBBLE, D.H. Equine Ehrlichiosis. *JAVMA*, v.155, p.462-469, 1969.
- HANSEN, M.G.B.; CHRISTOFFERSEN, M.; THUESEN, L.R. *et al.* Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in Danish horses. *Acta Vet. Scand.*, v.52, 2010.
- HOROWITZ, H.W.; KILCHEVSKY, E.; HABER, S. *et al.* Perinatal transmission of the agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis. *The New England J Med.*, v. 339, p.375-378, 1998.
- JAIN, N.C. Essentials of Veterinary Hematology. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417 p.
- JONGEJAN, F.; WASSINK, L.A.; THIELEMANS, M. J. C. *et al.* Serotypes in *Cowdria ruminantium* and their relationship with *Ehrlichia phagocytophila* determined by immunofluorescence. *Vet. Microbiol*, v.21, p.31-40, 1989.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. Clinical biochemistry of domestic animals. 6ed. Estados Unidos: Elsevier, 2008. 916p.
- KIM, H.; MOTT, J.; ZHI, N. *et al.* Cytokine gene expression by peripheral blood leucocytes in horses experimentally infected with *Anaplasma phagocytophila*. *Clinical and Diagnostic Lab. Immunol.*, v.9, p.1079-1085, 2002.
- KLEIN, M.B.; HU, S.; CHAO, C.C. *et al.* The agent of human granulocytic ehrlichiosis induces production of myelosuppressing chemokines without induction of proinflammatory cytokines. *J. Infect. Dis.*, v. 182, p. 200-205, 2000.

- KOWAL, R.J.; ALMOSNY, N.R.P.; CASCARDO, B. *et al.* Avaliação dos valores hematológicos em cavalos (*Equus caballus*) da raça Puro-Sangue-Inglês (PSI) submetidos a teste de esforço em esteira ergométrica. *Rev. Bras. Cienc. Vet.*, v.13, p.25-31, 2006.
- LABRUNA, M.B.; LEITE, R.C.; GOBESSO, A.A.O. *et al.* Controle estratégico do carrapato *Amblyomma cajennense* em equinos. *Cienc. Rural*, v. 34, p. 195-200, 2004.
- LEIBY, D.A.; GILL, J.E. Transfusion-transmitted Tick-borne infections: A cornucopis of threats. *Transfusion Medicine Reviews*, v. 18, p. 293-306, 2004.
- LEPIDI, H.; BUNNEL, J.E.; MARTIN, M.E. *et al.* Comparative pathology and immunohistology associated with clinical illness after *Ehrlichia phagocytophila*-group infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, v.62, p.29-37, 2000.
- LILLINI, E.; MACRÌ, G. PROIETTI, G. *et al.* New findings on Anaplasmosis caused by infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, Anais, p.360-370, 2006.
- MACHADO, R.Z.; ANDRÉ, M.R.; WERTHER, K. *et al.* Migratory and carnivorous birds in Brazil: Reservoirs of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species? *Vector-borne and Zoonotic dis.*, v.12, p.705-708, 2012.
- MADDER, M.; SPEYBROECK, N.; BRANDT, J. *et al.* Diapause induction in adults of three *Rhipicephalus appendiculatus* stocks. *Exp. Appl. Acarol.*, v. 23, p. 961-968, 1999.
- MADIGAN, J.E. Equine ehrlichiosis *Vet Clin. Equine*, v.9, p.423-428, 1993.
- MADIGAN, J.E.; BARLOUGH, J.E.; DUMLER, J. *et al.* Equine granulocytic ehrlichiosis in Connecticut caused by an agent resembling the human granulocytotropic ehrlichia. *J. Clin. Microbiol.*, v.34, p.434-435, 1996.
- MAGNARELLI, L.A.; WILLIAMS, S.C.; FIKRING, E. Seasonal prevalence of serum antibodies to whole cell and recombinant antigens of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in White-tailed deer in Connecticut. *J. Wildl. Dis.*, v.46, p.781-790, 2010.
- MASSUNG, R.F.; SLATER, K.; OWENS, J.H. *et al.* Nested PCR assay for detection of Granulocytic Ehrlichiae. *J. Clin. Microbiol.*, v.36, p.1090-1095, 1998.
- MASSUNG, R.F.; COURTNEY, J.W.; HIRATZKA, S.L. *et al.* *Anaplasma phagocytophilum* in White-tailed deer. *Emerg. Infect. Dis.*, v.11, p.1604-1606, 2005.
- MCQUISTON, J.H.; MCCALL, C.L.; NICHOLSON, W.L. Ehrlichiosis and related infections. *JAVMA*, v.223, p.1750-1756, 2003.
- MEYER, D.J.; COLES, E.H.; RICH, L.J. *Medicina de Laboratório Veterinária: Interpretação e diagnóstico.* São Paulo: Roca, 1995. 308 p.
- MEZERVILLE, V.H.; PADILLA-CUADRA, J.I. Choque séptico por ehrlichiosis. *Acta Medica Costarricense*, v.49, p.118-120, 2007.
- MORALES, A.; VILLORIA, D.; ROMERO, N. *et al.* Estudio comparativo de la eficacia terapéutica de oxitetraciclina, imidocarb y diminazeno, utilizados en El tratamiento de hemoparasitosis em equinos pura sangre de carrera. *Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol.*, v.71, p.78-82, 2012.


- MUNDERLOH, U.G.; MADIGAN, J.E.; DUMLER, J.S. *et al.* Isolation of the equine granulocytic ehrlichiosis agent, *Ehrlichia equi*, in tick cell culture. *J. Clin. Microbiol.*, v.34, p. 664-670, 1996.
- MUNDERLOH, U.G.; JAURON, S.D.; FINGERLE, V. *et al.* Invasion and intracellular development of the Human Granulocytic Ehrlichiosis Agent in tick cell culture. *J. Clin. Microbiol.*, v.37, p.2518-2524, 1999.
- MUNDERLOH, U.G.; LYNCH, M.J.; HERRON, M.J. *et al.* Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet. Microbiol.*, v.101, p.53-64, 2004.
- NIU, H.; YAMAGUCHI, M.; RIKIHISA, Y. Subversion of cellular autophagy by *Anaplasma phagocytophilum*. *Cell Microbiol.*, v.10, p.593-605, 2008.
- OLIVEIRA, J. *Adequação da hemodiálise em equinos hígidos: avaliação clínica e laboratorial.* 2007. 257f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- ONOFRIO, V.C.; BARROS-BATTESTI, D.M.; LABRUNA, M.B. *et al.* Diagnoses of and illustrated key to the species of *Ixodes* Latreille, 1975 (Acari: Ixodidae) from Brazil. *Systematic Parasitol.*, v.72, p.143-157, 2009.
- OTEO, J.A.; BROUQUI, P. Ehrlichiosis y anaplasmosis humana. *Enferm. Infecc. y Microbiol. Clin.*, v.23, p.375-380, 2005.
- PARK, J.; HEO, E.; CHOI, K. *et al.* Detection of antibodies to *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia caffeensis* antigens in sera of Korean patients by Western Immunoblotting and Indirect Immunofluorescence assays. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, v.10, p.1059-1064, 2003.
- PASSAMONTI, F.; FABRIZIA, V.; KATIA, C. *et al.* *Anaplasma phagocytophilum* in horses and ticks: A preliminary survey of Central Italy. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 33, p. 73-83, 2010.
- PAULIE, S.; PERLMANN, H.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay. *Encyclopedia of Life Science*, p. 1-4, 2005.
- POPOV, V.L.; HAN, V.C.; CHEN, S.M. *et al.* Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. *J. Med. Microbiol.*, v.47, p.235-251, 1998.
- PRASKOVA, I.; BEZDEKOVA, B.; ZEMAN, P. *et al.* Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in horses in the Czech Republic. *Ticks and Tick-borne dis.*, v.2, p.111-115, 2011.
- PUSTERLA, N.; LEUTENEGGER, C.M.; CHAE, J. *et al.* Quantitative evaluation of ehrlichial burden in horses after experimental transmission of Human granulocytic Ehrlichia Agent by intravenous inoculation with infected leucocytes and by infected ticks. *J. Clin. Microbiol.*, v.37, p.4042-4044, 1999.
- RANDOLPH, S.E. The impact of tick ecology on pathogen transmission dynamics. In: BOWMAN, A.S.; NUTALL, P.A. 1.ed. *Ticks: Biology, Disease and Control.* Inglaterra: Cambridge University Press, 2008. p.40-72.
- REED, S.M.; BAYLY, W.M. *Medicina Interna Equina.* 1.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 940p.
- RIKIHISA, Y.; LIN, M.; NIU, H. Type IV secretion in obligatory intracellular bacterium *Anaplasma phagocytophilum*. *Cell. Microbiol.*, v.12, p.1213-1221, 2010.
- ROBINSON, N.E. Normal agreement clinical data. In: ROBINSON, N.E. (Ed). *Current Therapy in Equine Medicine.* 4.ed. Philadelphia: Saunders Company, 1997. p.761-772.

- ROSSDALE, P.D.; BRUGUEZ, P.N.; CASH, R.S.G. Changes in blood neutrophil/lymphocyte ratio related to adrenocortical function in the horse. *Equine Vet. J.*, n.14, p. 293-298, 1982.
- SALVAGNI, C.A.; DAGNONE, A.S.; GOMES, T.S. *et al.* Serologic evidence of equine granulocytic anaplasmosis in horses from central West Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.19, p.135 – 140, 2010.
- SANTOS, H.A.; PIRES, M.S.; VILELA, J.A.R. *et al.* Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Brazilian dogs by real time polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest*, v. 23, p.770-774, 2011.
- SANTOS, H.A.; THOMÉ, S.M.G.; BALDANI, C.D. *et al.* Molecular epidemiology of the emerging zoonosis agent *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) in dogs and ixodid ticks in Brazil. *Parasites & Vectors*, v.6, p.348-357, 2013.
- SCAIFE, H.; WOLDEHIWET, Z.; HART, C.A. *et al.* *Anaplasma phagocytophilum* reduces neutrophil apoptosis in vivo. *Infection and Immunity*, v.71, p.1995-2001, 2003.
- SEN, E.; UCHISHIMA, T.; OKAMOTO, Y. *et al.* Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks from Istanbul metropolitan area and rural Trakya (Thrace) region of north-western Turkey. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v.2, p.94-98, 2011)
- SEVERINSSON, K.; JAENSON, T.G.; PETTERSON, J. *et al.* Detection and prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks in seven study areas in Sweden. *Parasites & Vectors*, v.3, p.66-73, 2010.
- SILAGHI, C.; LIEBISCH, G. PFISTER, K. Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* from 14 equine granulocytic anaplasmosis cases. *Parasites & Vectors*, v.4, p.161-169, 2011.
- SILAGHI, C.; WOLL, D. HAMEL, D. *et al.* *Babesia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in questing ticks, ticks parasitizing rodents and the parasitized rodents- Analuzing the host-pathogen-vector interface in a metropolitan area. *Parasites & Vectors*, v. 5, p. 191-204, 2012.
- SILVEIRA, J.A.G. *Ocorrência de hemoparasitos e ectoparasitos em veado-catingueiro (Mazama gouazoubira Fischer, 1814), veado-campeiro (Ozotocerus bezoarticus Linnaeus, 1758) e cervo-dopantanal (Blastocerus dichotomus Illiger, 1815): utilização de métodos parasitológicos e moleculares.* 2012. 131f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SISKA, W.D.; EMERSON TUTTLE, R. MESSICK, J.B. *et al.* Clinicopathologic characterization of six cases of equine granulocytic anaplasmosis in a nonendemic area (2008-2011). *J. Vet. Res.*, v.33, p.653-657, 2013.
- SOARES, I.R. *Avaliação clínica e laboratorial de equinos sororreagentes para Leishmania sp. no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.* 2012. 132p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SNOW, D.H.; RICKETTS, S.W.; MASON, D. K. Haematological response to racing and training exercise in Thoroughbred horses, with particular reference to the leucocyte response. *Equine Vet. J.*, n.15, p.149-154, 1983.
- STANNARD, A.A.; GRIBBLE. D.H.; SMITH, R.S. Equine Ehrlichiosis: A disease with similarities to tick-borne fever and bovine petechial fever. *The Vet. Rec.*, 1969.
- STUEN, S. *Anaplasma phagocytophilum* – the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. *Vet. Res., Commun*, v. 31, suppl. 1, p.79-64, 2007.


- STUEN, S.; BERGSTRÖM, K. The effect of two different oxitetracyclin treatments in experimental *Ehrlichia phagocytophila* infected lambs. *Acta Vet Scand*, v.42, p.339-346, 2001.
- STUEN, S.; ARTURSSON, K. Effects of the dose of *Ehrlichia phagocytophila* on the severity of experimental infections in lambs. *The Vet. Rec.*, v. 146, p. 669-672, 2000.
- STUEN, S.; ENEMARK, J.M.D.; ARTURSSON, K. *et al.* Prophylactic treatment with flumethrin, a pyrethroid (Bayticol®, Bayer), against *Anaplasma phagocytophilum* infection in lambs. *Acta Vet. Scand.*, v.54, p.31-35, 2012.
- STUEN, S.; GRØVA, L.; GRANQUIST, E.G. *et al.* A comparative study of clinical manifestations, haematological and serological responses after experimental infections with *Anaplasma phagocytophilum* in two Norwegian sheep breeds. *Acta Vet. Scand.*, v.53, 2011.
- STUEN, S.; SOLLI OPPEGAARD, A.; BERGSTRÖM, K. *et al.* *Anaplasma phagocytophilum* infection in north Norway. The first laboratory confirmed case. *Acta Vet Scand*, v. 46, p. 167-171, 2005.
- SWANSON, S.J.; NEITZEL, D.; REED, K.D. *et al.* Coinfections acquired from *Ixodes* ticks. *Clin Microbiol Rev*, v. 19, p. 708-727, 2006.
- TELFORD III, S.R.; GOETHERT, H.K. Emerging tick-borne infections: rediscovered and better characterized, or truly 'new'? *Parasitol.*, v.129, p.S301-S327, 2004.
- THRALL, M.A.; BAKER, D.C.; CAMPBELL, T.W. *et al.* Hematologia e bioquímica clínica veterinária. 1.ed. São Paulo: Rocca. 2006. 582p.
- TORRES, A.J.; FINGER, I.S.; FARIAS, N.A.R. *et al.* Aspectos epidemiológicos da theileriose equina e sua relação com o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em duas propriedades na região da campanha do Rio Grande do Sul – Brasil. *Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol.*, v.71, p.70-77, 2012.
- VON LOEWENICH, F.D.; STUMPF, G.; BAUMGARTEN, B.U. *et al.* A case of Equine Granulocytic Ehrlichiosis provides molecular evidence for the presence of pathogenic *Anaplasma phagocytophilum* (HE agent) in Germany. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.*, v.22, p.303-305, 2003.
- WALKER, D.H.; DUMLER, J.S. Emergence of the ehrlichiosis as human health problems. *Emerg Infect Dis*, v.2, p.18-29, 1996.
- WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. Schalm's Veterinary hematology. 6 ed. Estados Unidos: Wiley-Blackwell. 2010. 1206p.
- WOLDEHIWET, Z. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet Parasitol*, v.167, p.108-122, 2010.
- ZIMMERMAN, K.L.; CRISMAN, M.V. Diagnostic Equine Serology. *Vet Clin Equine*, v.24, p.311-334, 2008.

8. ANEXOS

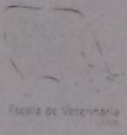
Anexo I

	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CERTIFICADO Certificamos que o Protocolo nº. 167 / 2013, relativo ao projeto intitulado "Avaliação clínica e laboratorial de equinos sororreagentes para Anaplasma phagocytophilum no estado de Minas Gerais, Brasil.", que tem como responsável Maristela Silveira Palhares, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 11/07/2013. Este certificado espira-se em 11/07/2018.	
CERTIFICATE We hereby certify that the Protocol nº. 167 / 2013, related to the Project entitled "Laboratorial and clinical evaluation of seropositive equids for Anaplasma phagocytophilum in the state of Minas Gerais, Brazil.", under the supervision of Maristela Silveira Palhares, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 11/07/2013. This certificates expires in 11/07/2018.	
FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS Coordenador(a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 11/07/2013.	
Atenciosamente.	
Sistema CEUA-UFMG https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/	
Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br	

Anexo II



Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de Veterinária
Hospital Veterinário
Clínica Médica de Equinos



**AUTORIZAÇÃO PARA USO DE DADOS E IMAGENS DE
PACIENTE PARA FINS ACADÊMICOS**

Eu _____, proprietário do
animal _____, FC: _____, autorizo o uso
de dados e imagens do animal de minha propriedade para fins acadêmicos.

Proprietário

Veterinário responsável, local e data