

Detecção de *Theileria equi* e *Babesia caballi* e anticorpos anti-*Ehrlichia* spp. em equídeos do Pantanal Mato-Grossense, Brasil

[Detection of *Theileria equi*, *Babesia caballi* and anti-*Ehrlichia* spp antibodies in equides from the Pantanal of Mato Grosso State]

E.M. Barros¹, Í.A. Braga¹, L.G.F. Santos², T.F. Ziliani², A.L.T. Melo¹,
A.M.C.M. Borges¹, L.G. Silva^{1,3}; D.M. Aguiar^{1,2*}

¹Aluna de pós-graduação – FAMEVZ – Universidade Federal de Mato Grosso – Cuiabá, MT

²Universidade Federal de Mato Grosso – Cuiabá, MT

³Associação Brasileira de Criadores do Cavallo Pantaneiro – Poconé, MT

RESUMO

O presente estudo avaliou equídeos de 19 fazendas da região do Pantanal Mato-Grossense, sendo 121 equídeos testados pela reação em cadeia pela polimerase (PCR), para detectar fragmentos dos genes dos seguintes gêneros: *Babesia*, *Theileria*, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, e *Neorickettsia*, e pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), para detectar anticorpos anti-*Ehrlichia* spp. Das amostras testadas na PCR, 17 (14,0%) animais de nove (47,3%) fazendas foram positivos. Das amostras positivas, 16 foram 100% idênticas a sequencias de *Theileria equi* e uma foi 99% similar à sequência de *Babesia caballi*, todas disponíveis no GenBank. Pela RIFI, 48 (39,6%) equídeos foram soropositivos para antígenos de *E. canis*, sendo 40 (83,3%) amostras com títulos de 40 e oito (16,6%) com títulos de 320. Todas as fazendas avaliadas (100%) apresentaram equídeos soropositivos. Os resultados do presente estudo demonstram que *T. equi* e *B. caballi* infectam equinos na região, e a presença de anticorpos anti-*Ehrlichia* spp. indica a circulação de espécies antigenicamente relacionadas aos gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma*, apesar de a negatividade nos exames de PCR indicar provável processo crônico desses agentes.

Palavras-chave: cavalo, carrapatos, PCR, RIFI, muares

ABSTRACT

The present study evaluated 121 equids from 19 ranches in the Pantanal region of Mato Grosso State through Polymerase Chain Reaction (PCR) to detect *Babesia*, *Theileria*, *Anaplasma*, *Ehrlichia* and *Neorickettsia* partial genes and the Immunofluorescent Antibody Test (IFAT) to evaluate anti-*Ehrlichia* spp. antibodies. From the total tested in PCR, 17 (14.0%) equids from 9 (47.3%) farms were positive, and 16 yielded amplicons 100% identical to *Theileria equi* and one presented 99% similarity to *Babesia caballi* available on GenBank. Forty eight (39.6%) equids were positive by IFAT and 40 showed titers of 40 (83.3%) and 8 showed titers of 320 (16.6%). All ranches (100%) presented seropositive equids. Our results showed that *T. equi* and *B. caballi* are infecting equids in the region and the presence of anti-*Ehrlichia* antibodies suggests that species closely related to the genera *Ehrlichia* and *Anaplasma* are circulating among the equid local population. Moreover, the negative results in PCR is possibly related to the chronic infection phase.

Keywords: horse, ticks, PCR, IFAT, mules

INTRODUÇÃO

Os carrapatos são importantes vetores de patógenos para animais domésticos e silvestres. Na espécie equina, os carrapatos *Dermacentor nitens*, *Amblyomma cajennense* e *Rhipicephalus*

microplus são associados à transmissão dos protozoários *Babesia caballi* e *Theileria equi*, agentes etiológicos da piroplasmose equina (Wise *et al.*, 2013). A piroplasmose se manifesta clinicamente desde uma forma aguda, em que os animais apresentam anemia hemolítica aguda, formação de trombos e coagulação intravascular

Recebido em 22 de agosto de 2014

Aceito em 7 de abril de 2015

*Autor para correspondência (corresponding author)

E-mail: danmoura@ufmt.br

Detecção de Theileria equi...

disseminada seguida de morte, até uma forma crônica, em que são apresentados sinais inespecíficos que incluem letargia, anorexia e perda de peso (Wise *et al.*, 2013).

Em áreas endêmicas, equinos em fase crônica podem se tornar portadores inaparentes e servem como reservatório para transmitir os patógenos via carrapatos ou pelas vias transplacentária ou iatrogênica (Ribeiro *et al.*, 1999). Dados soroepidemiológicos e a detecção direta de ambos agentes vêm sendo descritos com altas taxas de prevalência em diversas regiões do Brasil e do mundo (Heuchert *et al.*, 1999).

Além dos agentes supracitados, a família Anaplasmataceae agrupa importantes patógenos de equinos, sendo alguns deles transmitidos por carrapatos (Dumler *et al.*, 2001). *Ixodes scapularis* são carrapatos vetores de *Anaplasma phagocytophilum*, o agente etiológico da Erliquiose Granulocítica Equina (EGE). As manifestações clínicas da EGE incluem febre, apatia, anorexia, edemas e relutância em locomoção decorrente do envolvimento de artropatias (Silaghi *et al.*, 2011). Além do gênero *Anaplasma*, diferentes espécies do gênero *Ehrlichia* vêm sendo observadas em animais domésticos e silvestres no Brasil, especialmente no Pantanal Mato-Grossense, entre eles a *Ehrlichia canis* e os genótipos *Ehrlichia* sp. cepa jaguar e *Ehrlichia* sp. cepa UFMT (Widmer *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2013; Aguiar *et al.*, 2014).

Neorickettsia risticii, agente etiológico da Erliquiose Monocítica Equina (EME) e também pertencente à família Anaplasmataceae, tem sido incriminado a quadros febris, depressão, anorexia, diarreia, cólica, laminite e aborto em cavalos na região Sul do Brasil (Dumler *et al.*, 2001, Coimbra *et al.*, 2005). A transmissão da *N. risticii* não está envolvida com a presença de carrapatos, e sim com uma complexa cadeia epidemiológica envolvendo regiões úmidas ou alagadas, caramujos dos gêneros *Heleobia* e *Juga*, trematódeos dos gêneros *Acanthatrium* e *Lecithodendrium*, quirópteros e aves silvestres (Reuber *et al.*, 1998; Pusterla *et al.*, 2003; Gibson *et al.*, 2005). Nota-se que alguns gêneros de caramujos são comuns nas diversas regiões do Brasil, inclusive no Pantanal Mato-Grossense (Fellerhoff, 2002), tornando-o um ambiente propício para a ocorrência de *N. risticii*.

Objetivou-se avaliar a presença de anticorpos anti-*Ehrlichia* spp. pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) em amostras de soro sanguíneo e a presença de *Anaplasma* spp., *N. risticii*, *Ehrlichia* spp., *Theileria* spp. e *Babesia* spp. pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) em sangue de cavalos e muares do Pantanal Mato-Grossense.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal de Mato Grosso, em 19/08/2010, sob o nº 23108.017191/10-8. Foram avaliadas amostras de soro sanguíneo e de sangue total de 121 equídeos de dois municípios pertencentes à bacia do rio Paraguai, que são Poconé e Barra do Bugre, localizados na região sudoeste mato-grossense. O município de Poconé (16°15'12''sul 56°22'12''oeste) foi contemplado com 85 equídeos (52 equinos e 29 muares), provenientes de 18 propriedades rurais, coletados entre janeiro e julho de 2010. O município de Barra do Bugre (15°04'21''sul e 57°10'52''oeste), que está inserido em zona de transição dos biomas amazônicos e cerrado, foi contemplado com 40 amostras de equinos de uma propriedade rural visitada em outubro de 2011. Como as fazendas estudadas estão inseridas no complexo Pantanal/ Bacia do Alto Paraguai, a variável inundação foi avaliada entre as propriedades; dessa forma, nove (47,3%) foram inseridas em áreas alagáveis e 10 (52,7%) em áreas que não sofrem inundações.

As amostras de sangue foram submetidas ao protocolo de extração de DNA genômico, com kit comercial (Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega®), seguindo as instruções do fabricante. Elas foram testadas individualmente para *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. e *N. risticii*. Com exceção da reação para detectar DNA dos gêneros *Babesia/Theileria*, as outras reações consistiam em nestedPCR. Os respectivos oligonucleotídeos iniciadores e o tamanho do produto amplificado estão apresentados na Tab. 1. O DNA de cepa São Paulo de *E. canis*, *A. platys* e *B. canis*, oriundos de cães naturalmente infectados, e o da cepa Illinois de *N. risticii* (gentilmente cedida por R.Z. Machado da UNESP campus Jaboticabal, SP) foram utilizados como controle positivo em todas as reações.

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores usados em estudo de *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Neorickettsia risticii* e *Babesia/Theileria* spp., em equídeos do Pantanal

Patógenos	Primer*	Sequência (5' - 3')	Pares de bases	Referências
<i>Ehrlichia</i> spp.	dsb 330 (1 ^a)	GATGATGTTTGAAGATATSAAACAAAT CTATTTTACTTCTTAAAGTTGATAWATC ATTTTTAGRGATTTTCCAATACTTGG	349	ALMEIDA et al., 2013
	dsb 720 (1 ^a , 2 ^a)			
	dsb 380 (2 ^a)			
<i>Anaplasma</i> spp.	gE3a (1 ^a)	CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC GGCAGTATTAAGAGCAGCTCCAGG AACGGATTATTCCTTATAGCTTGCT	360	MASSUNG et al., 1998
	gE10R (1 ^a)			
	gE2 (2 ^a)			
	gE9F (2 ^a)			
<i>N. risticii</i>	ER3-F(1 ^a)	ATTTGAGAGTTTGATCCTGG GTTTTAAATGCAGTTCTTGG CTAGCGGTAGGCTTAAC CACACCTAACTTACGGG	527	CHAE et al., 2003
	ER2-R(1 ^a)			
	ER3a-F (2 ^a)			
	ER2a-R (2 ^a)			
<i>Babesia</i> spp.	BAB 143-167	CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATACA	551	SPOLIDORIO et al., 2011
<i>Theileria</i> spp.	BAB 694-667	GCTTGAAACACTCTARTTTTCTCAAAG		

*1^a = primeira reação (PCR); 2^a = segunda reação (nPCR).

As amostras que apresentaram fragmentos amplificados foram purificadas usando-se o *kit* Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification® (GE Healthcare Bio-Sciences), segundo instruções do fabricante e, em seguida, foram submetidas ao sequenciamento genético (ACTGene Análises Moleculares, Alvorada-RS) utilizando-se Big Dye Kit (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante, em sequenciador automático (ABI PRISM-3100 Genetic Analyzer). As sequências obtidas foram editadas no *software* BioEdit (Ibis Biosciences, Carlsband, CA.), e níveis de similaridade foram analisados por meio do programa *Basic Local Alignment Search Tool*, a fim de se verificar a identidade com demais sequências correspondentes disponíveis no GenBank.

Amostras de soro foram testadas pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) com antígenos da cepa Cuiabá #16 de *E. canis* cultivada em células DH82 (Aguiar et al., 2007). Os soros foram testados nas diluições de 1:40 até 1:5120 em PBS (pH 7,2) e aplicados em lâminas contendo antígeno previamente fixado. Em cada lâmina, foram incluídos soros controles

negativos e positivos (gentilmente cedido por R. Vieira). Para marcação do anticorpo equino, foi adicionado conjugado anti-IgG de equino (Sigma® Diagnostics, St. Louis, Mo) com diluição de 1:1000. Adicionou-se glicerina (pH 8,5) em cada lâmina, as quais foram avaliadas em microscópio (objetiva de 40x) de epifluorescência.

Foram analisadas pelo teste qui-quadrado ou exato de Fisher as variáveis sexo, idade, espécie animal e localização da fazenda (áreas alagáveis e não alagáveis). Considerou-se como significativo o valor de $P \leq 0,05$.

RESULTADOS

As amostras (n=121) foram representadas por 98 machos (80,9%) e 23 fêmeas (19,0%). Dos animais, 29 (23,9%) eram muare e 92 (76,03%) eram equinos. Nenhuma amostra foi positiva na PCR para *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., e *N. risticii*. Para *Babesia* spp., 17 (14,0%) equídeos foram positivos (Tab. 2). Após sequenciamento dos produtos amplificados, uma amostra de equino do município de Poconé apresentou-se

Detecção de Theileria equi...

99% similar à sequência de *Babesia caballi* (GenBank AB734392), enquanto amostras de 14 equinos e dois muares apresentaram-se idênticas (100%) entre si e com a sequência de *Theileria equi* disponível no Genbank (JX049129). As duas sequências geradas no presente estudo foram depositadas no GenBank sob os números de acesso KJ549665 (*B. caballi*) e KJ549664 (*T. equi*). A positividade, quando comparada por espécie animal (equino x muar), não apresentou diferença estatística ($P > 0,05$). Em relação à faixa etária, os resultados não foram associados à idade dos animais. Entre os positivos, 13,6%

(3/22) dos equídeos positivos na PCR estavam entre zero e quatro anos, 14,4% (12/83) entre maior que quatro e oito anos, 13,3% (2/15) entre maior que oito e 12 anos. Nenhum equídeo de faixa etária superior a 12 anos foi positivo na PCR. A amostra positiva para *B. caballi* foi de um equino macho de quatro anos de idade. Segundo o sexo, 14 (82,3%) animais positivos eram machos e três (17,7%) eram fêmeas ($P > 0,05$). Das 19 fazendas, 14 (73,6%) apresentaram pelo menos um animal positivo sendo seis (66,6%) em áreas inundáveis e oito (33,4%) em áreas não inundáveis ($P > 0,05$).

Tabela 2. Frequência de equinos e muares testados e positivos na reação em cadeia pela polimerase (PCR) para *Babesia* spp. e *Theileria* spp. e reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para *Ehrlichia* spp.

Animais	Testados	PCR		RIFI	
		Positivos	%*	Positivos	%*
Equinos	92	15	16,3	40	43,5
Muares	29	2	6,9	8	27,5
Total	121	17	14,0	48	39,6

* $P > 0,05$.

Os equídeos positivos pela RIFI foram 48 (39,6%) animais, sendo 40 (83,3%) amostras com títulos de 40, e oito (16,6%) com títulos de 320. Todas as fazendas avaliadas (100%) apresentaram equídeos soropositivos, e diferenças entre fazendas de áreas inundáveis e não inundáveis não foram associadas à soropositividade dos animais ($P > 0,05$). Em relação à faixa etária, não houve associação significativa: 31,8% (7/22) dos equídeos soropositivos estavam entre zero e quatro anos, 43,3% (36/83) entre maior que quatro e oito anos, 26,6% (4/15) entre maior que oito e 12 anos, e um equídeo entre dois de faixa etária superior a 12 anos foi positivo na RIFI. Segundo o sexo, dos animais positivos, 42 (42,8%) eram machos e seis (23,9%) eram fêmeas ($P > 0,05$).

DISCUSSÃO

O presente estudo relata, pela primeira vez, a detecção e a ocorrência da infecção por *B. caballi* e *T. equi* em equídeos do Pantanal Mato-Grossense por avaliação molecular, mediante a busca de DNA dos agentes na corrente sanguínea. A PCR tem sido frequentemente utilizada na investigação e no diagnóstico da

piroplasmose equina (Battsetseg *et al.*, 2002), inclusive em qualquer fase da infecção, seja ela aguda ou crônica (Posnett e Ambrosio, 1991).

Das propriedades avaliadas, 73,6% apresentaram pelo menos um animal positivo, ou seja, mais da metade das fazendas, representadas por 14% da população animal. Ambos, *T. equi* e *B. caballi*, têm sido relatados em outros estados do Brasil, como em algumas regiões de Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo (Battsetseg *et al.*, 2002; Kerber, *et al.*, 2009; Salvagni *et al.*, 2010). Além disso, a maior frequência de *T. equi* observada no presente estudo, quando comparado a *B. caballi*, assemelha-se a resultados de outros autores (Heuchert *et al.*, 1999; Kerber *et al.*, 1999). Por outro lado, dados de soroprevalência para piroplasmose equina no estado de São Paulo demonstraram maior ocorrência da *B. caballi*, quando comparado a *T. equi* (Kerber *et al.*, 2009). Nesse mesmo trabalho, Kerber *et al.* (2009) associaram a presença de anticorpos anti-*B. caballi* com o parasitismo por *D. nitens*, enquanto anticorpos anti-*T. equi* foram associados com parasitismo por *A. cajennense*. Não foi objetivo do presente estudo identificar as

espécies de carrapatos em fase de parasitismo nos animais, muito embora os gêneros *Dermacentor* e *Amblyomma* sejam frequentemente observados nos equinos da região (dados não apresentados).

Não houve reações positivas para *N. risticii*. No Brasil, os animais diagnosticados com o agente apresentavam-se sintomáticos, provavelmente passando por fase aguda da doença (Coimbra et al., 2006). Além dos resultados negativos, os animais avaliados no presente estudo apresentavam-se assintomáticos no momento da coleta. *N. risticii* tem sido detectado por meios moleculares em caramujo do gênero *Heleobia* no Rio Grande do Sul, onde a infecção foi diagnosticada também pela PCR em três equinos. Por outro lado, caramujos do gênero *Pomacea* testados no mesmo local foram negativos. Este gênero de caramujo é relatado na planície do Pantanal (Fellerhoff, 2002). Por outro lado, Machado et al. (2012) e Santos et al. (2013), ao avaliarem amostras de sangue de diferentes espécies de aves e morcegos no Pantanal, falharam em detectar a presença de DNA de *N. risticii*, deixando dúvidas sobre a circulação deste patógeno na região, mesmo com a presença de outros potenciais hospedeiros do agente.

Não houve detecção de DNA compatível com *A. phagocytophilum* ou *Ehrlichia* spp. nas amostras testadas pela PCR. Ao contrário de *N. risticii*, espécies filogeneticamente próximas ou idênticas a *A. phagocytophilum* já foram detectadas em cães, cervídeos e aves no Brasil (Santos et al., 2011; Machado et al., 2012; Secchi et al., 2012). Entretanto, não há disponível, na literatura consultada, relatos de infecção natural ou detecção de DNA erliquial em cavalos, mesmo considerando os estudos anteriores a 2001, quando Dumler et al. (2001) reorganizaram a família Anaplasmataceae, e as espécies do genótipo das erliquias granulocíticas (*E. equi*, *E. phagocytophila* e *Ehrlichia* Granulocítica Humana) foram transferidas ao gênero *Anaplasma*.

Além dos métodos moleculares, a presença de anticorpos contra antígenos de *A. phagocytophilum* também foi relatada em equinos da região Centro-Oeste do Brasil (Salvagni et al., 2010). No presente estudo, 39,6% dos animais foram reagentes a antígenos de *Ehrlichia* spp. Mesmo com os resultados

negativos na PCR para *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. e *N. risticii*, a presença de anticorpos sugere infecção passada por qualquer um dos agentes supracitados, uma vez que há reatividade cruzada entre ambos quando utilizada a RIFI com antígenos brutos de *Ehrlichia* para pesquisa de anticorpos (Shankarappa et al., 1992). Neste estudo, os equinos apresentaram baixos títulos de anticorpos (40 e 320), sugerindo início de infecção ou mesmo infecção tardia, pois, segundo Artursson et al. (1999), equinos naturalmente infectados por *A. phagocytophilum* apresentam queda nos títulos séricos de anticorpos após oito meses da fase aguda da infecção.

No Brasil, a presença de anticorpos anti-*Ehrlichia* em cavalos já foi observada por Vieira et al. (2013) no estado do Paraná, entretanto seus resultados corroboram os do presente estudo, pois as reações sugerem infecção anterior por diferentes espécies da família Anaplasmataceae. Em relação ao gênero *Ehrlichia*, pelo menos três espécies circulam na região de estudo. *E. canis* foi relatada infectando cães de áreas rural e urbana do município de Poconé (Santos et al., 2013), além de espécies detectadas em onças (*Phantera onca*) de vida livre (*Ehrlichia* sp. cepa Jaguar) e em bovinos (*Ehrlichia* sp. cepa UFMT-BV) (Widmer et al., 2011; Aguiar et al., 2014).

A idade, o sexo dos animais e a localização das fazendas não foram associados à presença de cavalos positivos pela PCR para *T. equi* e *B. caballi*, bem como a presença de anticorpos anti-*Ehrlichia* spp., significando que os agentes pesquisados não possuem predileção por essas variáveis e que o risco de infecção parece mesmo estar envolvido com a presença do vetor.

Com base nos resultados do presente estudo, conclui-se que os protozoários *T. equi* e *B. caballi* infectam equinos da região do Pantanal Mato-Grossense e a infecção por *T. equi* apresenta-se disseminada entre as fazendas avaliadas. A presença de anticorpos anti-*Ehrlichia* spp. sugere a presença de espécies antigenicamente relacionadas, como as pertencentes aos gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma*, entretanto a negatividade nos exames de PCR pode indicar provável processo crônico desses agentes.

AGRADECIMENTOS

Ao médico veterinário Luiz G.M. da Silva Filho, pelo auxílio na coleta das amostras; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (472206/2011-7), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT) (263287/2010) e à Estância Ecológica SESC Pantanal, pelos auxílios financeiro e logístico. Especial agradecimento à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e ao CNPq, pelas bolsas concedidas a I.A. Braga, A.L.T. Melo, L.G.F. Santos, T.F. Ziliani e D.M. Aguiar.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D.M.; SAITO, T.B.; HAGIWARA, M.K. *et al.* Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. *Ciênc. Rural*, v.37, p.796-802, 2007.
- AGUIAR, D.M.; ZILIANI, T.F.; ZHANG, X. *et al.* A novel *Ehrlichia* genotype strain distinguished by the TRP36 gene naturally infects cattle in Brazil and causes clinical manifestations associated with ehrlichiosis. *Ticks Tick Borne Dis.*, v.5, p.537-44, 2014.
- ALMEIDA, A.P.; SOUZA, T.D.; MARCILI, A. Novel *Ehrlichia* and *Hepatozoon* Agents Infecting the Crab-Eating Fox (*Cerdocyon thous*) in Southeastern Brazil. *J. Med. Entomol.*, v.50, p.640-646, 2013.
- ARTURSSON, K.; GUNNARSSON, A.; WIKSTROM, U.B. *et al.* A serological and clinical follow-up in horses with confirmed equine granulocytic ehrlichiosis. *Equine Vet J.*, v.6, p.473-477, 1999.
- BATTSETSEG, B.; LUCERO, S.; XUAN, X. *et al.* Detection of natural infection of *Boophilus microplus* with *Babesia equi* and *Babesia caballi* in Brazilian horses using nested polymerase chain reaction. *Vet. Parasitol.*, v.107, p.351-357, 2002.
- CHAE, J.S.; KIM, E.H.; KIM, M.S. *et al.* Prevalence and sequence analyses of *Neorickettsia risticii*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.990, p.248-256, 2003.
- COIMBRA, H.S.; SCHUCH, L.F.D.; VEITENHEIMER-MENDES, I.L. *et al.* *Neorickettsia (Ehrlichia) risticii* no Sul do Brasil: *Heleobia* spp (Mollusca: Hydrobilidae) e *Parapleurolophocecous cercariae* (Trematoda: Digenea) como possíveis vetores. *Arq. Inst. Biol.*, v.72, p.325-329, 2005.
- COIMBRA, H.; FERNANDES, C.; SOARES M. *et al.* Equine monocytic Ehrlichiosis in Rio Grande do Sul: clinical, pathological and epidemiological aspects. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.26, p.97-101, 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 HGE agent as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.51, p.2145-2165, 2001.
- FELLERHOFF, C. Feeding and growth of apple snail *Pomacea lineata* in the Pantanal Wetland, Brazil—a stable isotope approach. *Isot. Environ. Health. S.*, v.38, p.227-243, 2002.
- GIBSON, K.; RIKIHISA, Y.; ZHANG, C. *et al.* *Neorickettsia risticii* is vertically transmitted in the trematode *Acanthatrium oregonense* and horizontally transmitted to bats. *Environ. Microbiol.* v.7, p.203-212, 2005.
- HEUCHERT, C.M.S.; DE GIULLI, V. JR.; DE ATHAIDE, D.F. *et al.* Seroepidemiologic studies on *Babesia equi* and *Babesia caballi* infections in Brazil. *Vet. Parasitol.* v.85, p.1-11, 1999.
- KERBER, C.E.; FERREIRA, F.; PEREIRA, M.C. Control of equine piroplasmiasis in Brazil. *Onderstepoort J. Vet.*, v.66, p.123-127, 1999.
- KERBER, C.E.; LABRUNA, M.B.; FERREIRA, F. *et al.* Prevalence of equine Piroplasmiasis and its association with tick infestation in the State of São Paulo, Brazil. *Braz. J. Vet. Parasitol.*, v.18, p.1-8, 2009.
- MACHADO, R.Z.; ANDRÉ, M.R.; WERTHER, K. *et al.* Migratory and carnivorous birds in Brazil: reservoirs for *Anaplasma* and *Ehrlichia* species. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, v.12, p.705-708, 2012.

- MASSUNG, R.; SLATER, K.; OWENS, J. *et al.* Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. *J. Clin. Microbiol.*, v.4, p.1090-1095, 1998.
- POSNETT, E.S.; AMBROSIO, R.E. DNA Probes for the detection of *Babesia caballi*. *Parasitol.*, v.102, p.357-365, 1991.
- PUSTERLA, N.; JOHNSON, E.; CHAE, J. *et al.* Digenetic trematodes, *Acanthatrium* sp. and *Lecithodendrium* sp., as vectors of *Neorickettsia risticii*, the agent of Potomac horse fever. *J. Helminthol.*, v.77, p.335-339, 2003.
- REUBER, G.; BARLOUGH, J.; MADIGAN, J. Production and characterization of *Ehrlichia risticii*, the agent of Potomac horse fever, from snails (Pleuroceridae: *Juga* spp.) in aquarium culture and genetic comparison to equine strains. *J. Clin. Microbiol.*, v.6, p.1501-11, 1998.
- RIBEIRO, M.F.; COSTA, J.O.; GUIMARÃES, A.M. Epidemiological aspects of *Babesia equi* in horses in Minas Gerais, Brazil. *Vet. Res. Commun.*, v.23, p.385-390, 1999.
- SACCHI, A.B.V.; DUARTE, J.M.B.; ANDRÉ, M.R. *et al.* Prevalence and molecular characterization of *Anaplasmataceae* agentes in free-ranging Brazilian marsh deer (*Blastocercus dichotomus*). *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v.35 p.325-334, 2012.
- 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. *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, L.G.F.; OMETTO, T.; ARAÚJO, J. *et al.* Absence of *Anaplasmataceae* DNA in Wild Birds and Bats from a Flooded Area in the Brazilian Northern Pantanal. *Air Water Borne Dis*, v.2, p.113, 2013.
- SHANKARAPPA B, DUTTA SK, MATTINGLY-NAPIER BL. Antigenic and genomic relatedness among *Ehrlichia risticii*, *Ehrlichia sennetsu*, and *Ehrlichia canis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.42, p.127-32, 1992.
- SILAGHI, C.; LIEBISCH, G.; PFISTER, K. Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* from 14 equine granulocytic anaplasmosis cases. *Parasitic Vectors*, v.4, p.161-163, 2011.
- SPOLIDORIO, M.G.; TORRES, M.M.; CAMPOS, W.N.S. *et al.* Molecular Detection of *Hepatozoon canis* and *Babesia canis vogeli* in domestic dogs from Cuiabá, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.20, p.253-255-2011
- VIEIRA, R.F.C.; BIONDO, A.W.; GUIMARÃES, A.M.S. *et al.* Ehrlichiosis in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.20, p.12, 2011.
- WIDMER, C.E.; AZEVEDO, F.C.; ALMEIDA, A.P. *et al.* Tick-borne bacteria in free-living jaguars (*Panthera onca*) in Pantanal, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, v.11, p.1001-1006, 2011.
- WISE, L.N.; KAPPEMEYER, L.S.; MEALEY, R.H. *et al.* Review of equine piroplasmosis. *J. Vet. Intern. Med.*, v.27, p.1334-1346, 2013.