

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM  
CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SUSTENTABILIDADE  
AGROPECUÁRIA

**Parasitismo por *Borrelia* spp., agentes  
Anaplasmataceae e *Rickettsia* spp. em equinos em  
Mato Grosso do Sul: Implicações epidemiológicas e  
hematológicas**

Autor: João Bosco Vilela Campos  
Orientador: Dr. Heitor Miraglia Herrera  
Coorientador: Dr. Marcos Rogério André

"Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SUSTENTABILIDADE AGROPECUÁRIA, no Programa de Pós-Graduação *Strict Sensu* em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária da Universidade Católica Dom Bosco - Área de concentração: Saúde, Ambiente e Sustentabilidade".

Campo Grande  
Mato Grosso do Sul  
Março

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Universidade Católica Dom Bosco  
Bibliotecária Mourâmise de Moura Viana - CRB-1 3360

C198p Campos, João Bosco Vilela  
Parasitismo por *Borrelia* spp., agentes Anaplasmataceae  
e *Rickettsia* spp. em equinos em Mato Grosso do Sul:  
implicações epidemiológicas e hematológicas/ João  
Bosco Vilela Campos sob a orientação do profº Dr.  
Heitor Miraglia Herrera. -- Campo Grande, MS : 2021.  
162 p.: il.

Tese (Doutorado Ciências Ambientais e Sustentabilidade  
Agropecuária) -Universidade Católica Dom Bosco, Campo  
Grande-MS, 2021  
Inclui bibliografias

1. Agentes Anaplasmataceae. 2. Epidemiologia - Equinos  
- Mato Grosso do Sul. 3. *Borrelia* spp. 4. *Rickettsia*  
spp I.Herrera, Heitor Miraglia. II. Título.

CDD: Ed. 21 -- 630.072



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO  
*Inspira o futuro*

## **Parasitismo por *Borrelia* spp., agentes Anaplasmataceae e *Rickettsia* spp. em equinos em Mato Grosso do Sul: Implicações epidemiológicas e hematológicas**

**Autor:** João Bosco Vilela Campos

**Orientador:** Prof. Dr. Heitor Miraglia Herrera

**Coorientador:** Prof. Dr. Marcos Rogério André

**TITULAÇÃO:** Doutor em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária

**Área de Concentração:** Saúde, Ambiente e Sustentabilidade.

APROVADO em 26 de março de 2021

A presente defesa foi realizada por webconferência. Eu, Heitor Miraglia Herrera, como presidente da banca assinei a folha de aprovação com o consentimento de todos os membros, ainda na presença virtual destes.

Prof. Dr. Heitor Miraglia Herrera –UCDB

Prof. Dr. Marcos Rogério André – UNESP

Profa. Dra. Gisele Braziliano de Andrade – UCDB

Profa. Dra. Grasiela Edith de Oliveira Porfírio Petry – UCDB

Profa. Dra. Eliane Mattos Piranda – UFMS

Prof. Dr. Fernando de Almeida Borges - UFMS

*"Quando tudo está perdido, sempre existe um caminho. Quando tudo está perdido, sempre existe uma luz". Renato Russo!*

Dedico este trabalho primeiramente a “Deus”, por ter me proporcionado Força, Persistência e Coragem nesse desafio acadêmico final traçado.

Dedico a minha família por todo o apoio que me deste nos momentos de alegria e principalmente nos momentos de dificuldades que passamos juntos.

Ao meu pai “*Djair*” por servir de inspiração e base em todos os interesses que foram surgindo durante toda a minha caminhada. À minha mãe “*Alaíde*” pelo incentivo na hora de me dedicar a qualquer atividade, além do apoio total a quaisquer situações encontradas. À minha irmã mais velha “*Rita*”, pelo apoio e experiência profissional e as demais irmãs “*Mariana, Amanda*”, incluindo os meus sobrinhos “*Luana e Raul*” pela Alegria proporcionada em todos os momentos. Aos demais familiares que participaram diretamente ou indiretamente apoiando de alguma forma essa jornada.

Dedico também a todos os meus amigos que de alguma forma, estiveram ou não presentes, mas que colaboraram para que o meu objetivo final, que é a obtenção do título de *Doutor* pudesse ser concretizado.

A todos os docentes pesquisadores e alunos do programa pela atenção e dedicação para comigo.

## AGRADECIMENTOS

Quero agradecer à UCDB por todo apoio, incentivo e investimento no programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária.

Em especial ao meu orientador “*Dr. Heitor Miraglia Herrera*” por toda a atenção, dedicação e por aceitar me orientar desde o 2º ano da graduação, até a este momento de conclusão do doutorado.

Ao meu coorientador “*Dr. Marcos Rogério André*”, que apesar da distância entre nós, pôde proporcionar o seu tempo e dedicação em algumas etapas deste trabalho.

A professora “*Dra. Carina Elisei de Oliveira*”, por todo o conhecimento compartilhado desde o meu processo de graduação até o presente momento e, que apesar de não ser oficialmente minha coorientadora, mas exerceu essa função perfeitamente em todas as etapas do trabalho.

A “*Dra. Jania de Rezende*”, que apesar de não compor mais o nosso grupo de pesquisa, mas que com o passar dos anos em que trabalhamos juntos acabou tornando-se além de uma colega de trabalho, mas uma grande amiga especial, que sempre me acolheu e esteve presente.

Ao professor “*Dr. Marcelo Bahia Labruna*”, por me receber na Universidade de São Paulo - USP e disponibilizar-se de toda a sua atenção, conhecimento, estruturas laboratoriais e diversão rsrsrs...

Ao “*Dr. Matheus Dias Cordeiro*”, pela sua disponibilidade e total atenção em nos atender quando necessitávamos executar alguma etapa do trabalho. Além da parceria formada entre a Universidade Católica Dom Bosco e Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Aos demais professores que estiveram diretamente ou indiretamente participando desse sonho que está sendo concretizado. Em especial aos professores: Gisele Braziliano de Andrade, Eliane Piranda, Rosângela Zacarias, Aline Rosa, Alexandre, Paula Helena Santa Rita, Daniele Bier e Núbia Rodrigues.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado ao programa.

As técnicas, e que hoje tornaram grande amigas com o passar dos anos na rotina laboratorial, mas que sem elas grande parte do trabalho não seria possível à conclusão: *Maria Helena, Daiane, Mirian, Vânia, Kátia, Natália e Daniela*.

Aos meus companheiros que estiveram presentes desde o início até o término, onde pudemos compartilhar discussões e experiências já vivenciadas por cada um: *Grasiela E. Porfírio, Filipe Martins Santos, Jaire M. Torres, Wanessa Teixeira Gomes Barreto, Gabriel Carvalho de Macedo, Alanderson, Brenno Emanuel, Ana Carolina, William Oliveira, Andreza Rucco e Wesley Nantes*.

Aos alunos de Iniciação Científica (PIBIC) que estiveram sempre dispostos, seja em reuniões como nos momentos de necessidade para finalizar alguma atividade referente ao trabalho. Em especial destaque os alunos que participaram deste trabalho: *Amanda Alves, João Vitor, Diovana, Carol, John Lynno, Carla e João Roberto* que sempre estiveram presentes e preparados para me socorrer.

A Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP-SP, por sempre me receber da melhor forma possível. Em especial ao *Luiz Ricardo, Ana Claudia, Matheus, Renan, Priscila, Lívia, Inalda, Vitória, Natália, Marielle, Rafaela* e aos demais que não me recordo o nome, mas serão sempre lembrados.

A Universidade de São Paulo – USP/SP, pela estrutura e ótima recepção. Em especial: *Amália Barbieri, Maria Carolina, Lina Binder, Yara, Ruth, Luis (mexicano), Hermes, Hector, Renato, Danival* e a todos aqueles que tive o privilégio de conhecer, mas que não me recordo os nomes.

## **BIOGRAFIA**

João Bosco Vilela Campos nascido na cidade de Campo Grande, estado de Mato Grosso do Sul no dia 12 de junho de 1984, filho de Djair Campos Leite e Alaíde Afonso Vilela. O autor deste trabalho possui graduação em Medicina Veterinária que foi concluído no ano de 2014, pela Universidade Católica Dom Bosco. Durante a graduação participou de três ciclos do Programa de Iniciação Científica. Possui mestrado em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária concluído no ano de 2017, pela Universidade Católica Dom Bosco. Concluiu o Curso de Técnico em Radiologia Médica no ano de 2009. Ingressou no doutorado do programa em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária da Universidade Católica Dom Bosco, com área de concentração em: Saúde, Ambiente e Sustentabilidade, na primeira turma de março de 2017. Durante as atividades acadêmicas participou de vários projetos de pesquisa e extensão. Atualmente assina 14 artigos científicos publicados em revistas indexadas.



## SUMÁRIO

	Página
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
2.1 Objetivo Geral.....	3
2.2 Objetivos Específicos.....	3
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>4</b>
3.1 O Equino.....	4
3.2 Borreliose de Lyme Equina.....	6
3.2.1 Agente etiológico.....	6
3.2.2 Hospedeiros .....	10
3.2.3 Transmissão.....	11
3.2.4 Ciclo biológico .....	12
3.2.5 Patogenia da <i>Borrelia burgdorferi</i> (s.l.) .....	12
3.2.6 Sinais Clínicos.....	13
3.2.7 Epidemiologia.....	14
3.2.8 Métodos de diagnóstico.....	15
3.2.8.1 Diagnóstico sorológico .....	16
3.2.9.2 Diagnóstico direto.....	17
3.2.9.3 Diagnóstico molecular .....	18
3.3 Anaplasmosse Granulocítica Equina.....	19
3.3.1 Agente etiológico.....	19
3.3.2 Vetores.....	20
3.3.3 Hospedeiros .....	21

3.3.4 Transmissão.....	22
3.3.5 Ciclo Biológico .....	23
3.3.6 Patogenia da infecção por <i>A. phagocytophilum</i> nos equinos.....	24
3.3.7 Sinais clínicos .....	25
3.3.8 Epidemiologia.....	27
3.3.9 Métodos de diagnóstico.....	29
3.3.9.1 Diagnóstico direto.....	29
3.3.9.2 Diagnóstico molecular .....	29
3.3.9.3 Diagnóstico sorológico .....	30
3.4 Rickettsias do grupo Febre Maculosa em equinos .....	31
3.4.1 Agente etiológico.....	31
3.4.2 Vetores.....	33
3.4.3 Hospedeiros .....	34
3.4.4 Transmissão.....	35
3.4.5 Ciclo Biológico.....	36
3.4.6 Patogenia .....	37
3.4.7 Sinais clínicos.....	38
3.4.8 Epidemiologia.....	39
3.4.9 Métodos de diagnóstico.....	42
3.4.9.1 Diagnóstico sorológico .....	42
3.4.9.2 Diagnóstico molecular .....	43
3.4.9.3 Diagnóstico direto.....	44
<b>4. REFERENCIAS .....</b>	<b>45</b>
<b>5. Capítulo 1 .....</b>	<b>100</b>
<b>6. Capítulo 2.....</b>	<b>127</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>145</b>

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Espiroqueta em sangue periférico de equino. Esfregaço de sangue corado com Giemsa, aumento de 1.000x (MADUREIRA, 2007).....	8
<b>Figura 2.</b> Mórula de <i>Anaplasma phagocytophilum</i> em neutrófilos (seta) (LASCOLA et al., 2009). .....	20
<b>Figura 3.</b> Lâmina de cultivo celular positivo para <i>Rickettsia rickettsii</i> , corada com Giemsa (aumento de 1.000x) - isolamento a partir de carrapatos <i>A. cajennense</i> infectado (UENO, 2014) .....	33

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1.</b> Distribuição de tropas de cavalos por categorias entre os anos 2004 a 2013.....	4
<b>Tabela 2.</b> Renda e estimativa de pessoas ocupadas no complexo do agronegócio do cavalo no Brasil por categorias. ....	5
<b>Tabela 3.</b> Levantamento de ocorrência sorológica e molecular de <i>Anaplasma phagocytophilum</i> em equinos no mundo .....	28
<b>Tabela 4.</b> Levantamento de ocorrência sorológica de cavalos com <i>Rickettsia rickettsii</i> em locais notificados para Febre Maculosa brasileira.....	41
<b>Tabela 5.</b> Levantamento de ocorrência sorológica de cavalos com <i>Rickettsia rickettsii</i> em locais sem notificação de Febre Maculosa brasileira .....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS

AICs	Akaike Information Criterion
BLASTn	Nucleotide BLAST
BSK	Barbour-Stoenner-Kelly
CEUA	Comissão de Ética no uso de animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
cPCR	PCR Convencional
DL	Doença de Lyme
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio Imunosolvente ligado a Enzima
EUA	Estados Unidos da América
FIBRI	Fibrinogênio
FM	Febre Maculosa
HB	Hemoglobina
He/mm <sup>3</sup>	Contagem de hemácias
HGE	Ehrlíquiose Granulocítica Humana
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgG	Imunoglobulinas G
kDa	quilodalton
Kg	quilogramas
l.s.	lato sensu
mA	miliamperagem
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MG	Minas Gerais

mg	miligramas
ml	mililitros
ML	Maximum Likelihood
mm	milímetros
MS	Mato Grosso do Sul
MT	Mato Grosso
NJ	Neighbor Joining
OSPA	Lipoproteína de superfície externa
OSP's	Proteínas de superfície exteriores
pb	pares de base
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PNPP	Paranitra-fenil-fosfato de sódio
PPTs	Proteínas plasmáticas totais
qPCR	PCR em Tempo Real
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RJ	Rio de Janeiro
RMSF	Rocky Mountain spotted fever
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
rpm	rotações por minuto
SBY	Síndrome de Baggio-Yoshinari
SIRLS	Síndrome infecto-reacional Lyme símile
s.s	stricto sensu
UCDB	Universidade Católica Dom Bosco
UFMS	Universidade Federal do Mato Grosso do Sul
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
UNESP	Universidade Estadual Paulista

$\mu\text{L}$  microlitros

$\mu\text{m}$  micrômetro

USP Universidade de São Paulo

VG Volume globular

VPS Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

## RESUMO

O surgimento de doenças transmitidas por carrapatos tem sido relatado como um sério problema de saúde pública em todo o mundo. Este trabalho foi dividido em dois capítulos com o objetivo de realizar um estudo epidemiológico de bactérias zoonóticas transmitidas por carrapatos em equinos criados em diferentes regiões de Mato Grosso do Sul, bem como avaliar se *Borrelia* spp. e agentes Anaplasmataceae podem estar associadas a alterações hematológicas nos animais amostrados. No primeiro capítulo, animais de Campo Grande-MS foram avaliados clinicamente e amostras de sangue total, soro e carrapatos foram coletadas de 262 cavalos para posterior realização de análises hematológicas testes sorológicos e moleculares. Observou-se taxas de soropositividade de 20,6% para *Borrelia burgdorferi* (s.l.), 25,6% para *Rickettsia* spp. e 31,6% para *Anaplasma phagocytophilum*. Considerando os testes moleculares e sorológicos para *Borrelia* spp., a taxa de infecção foi de 48,0% (126/262). Nenhum dos cavalos testados apresentaram positividade molecular para *A. phagocytophilum*. Os cavalos amostrados apresentaram 7,2% de parasitismo por carrapatos ixodídeos em infestações simples e coinfeições com *Amblyomma sculptum*, *Dermacentor nitens* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Não encontramos DNA de nenhuma bactéria estudada nos carrapatos amostrados. Cavalos positivos para *Borrelia* spp. e agentes Anaplasmataceae exibiram leucopenia, monocitopenia e linfopenia. A região de Campo Grande-MS pode ser considerada enzoótica para bactérias transmitidas por carrapatos, visto que encontramos uma soropositividade geral de 59,9% dos cavalos amostrados, em uma única soroexposição (n= 112) e co-exposição (n= 45). No segundo capítulo objetivamos investigar a ocorrência de *Borrelia* spp. em equinos amostrados na região do Pantanal Sul Mato-grossense. Encontramos 46,2% (31/67) de soropositividade para *B. burgdorferi* (s.l.). Na detecção molecular foi observada positividade para *Borrelia* spp. em 60% (40/67) dos animais. Foi observado parasitismo por carrapatos em 64,2% (43/67) dos animais amostrados. Destes, 51,2% apresentaram infestações simples por *D.*



*nitens*, 9,3% por *A. sculptum*, 9,3% para *R. (B.) microplus* e 30,2% apresentaram infestações múltiplas. Os resultados encontrados mostram que cavalos podem atuar como hospedeiros-sentinelas para agentes bacterianos zoonóticos nas áreas estudadas. Além disso, as infecções simples e múltiplas por *Borrelia* spp. e os agentes Anaplasmataceae podem causar alterações em parâmetros hematológicos de cavalos em Mato Grosso do Sul.

**Palavras-chave:** Agentes Anaplasmataceae; *Borrelia* spp.; cavalos; infecção; *Rickettsia* spp.

## ABSTRACT

The emergence of tick-borne diseases has been reported as a serious public health problem worldwide. This work was divided into two chapters, with the objective of carrying out an epidemiological study of zoonotic bacteria transmitted by ticks in horses raised in different areas of Mato Grosso do Sul, as well as to evaluate if *Borrelia* spp. and Anaplasmatocae agents may be associated with hematological changes in the sampled animals. In the first chapter, animals from Campo Grande-MS were clinically evaluated and samples of whole blood, serum and ticks were collected from 262 horses for further hematological analysis, serological and molecular tests. Seropositivity rates of 20.6% were observed for *Borrelia burgdorferi* (s.l.), 25.6% for *Rickettsia* spp. and 31.6% for *Anaplasma phagocytophilum*. Considering the molecular and serological tests for *Borrelia* spp., the infection rate was 48.0% (126/262). None of the tested horses showed molecular positivity for *A. phagocytophilum*. The sampled horses showed 7.2% parasitism by ixodid ticks in simple and co-infestations with *Amblyomma sculptum*, *Dermacentor nitens* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. We did not find DNA from any bacteria studied in the sampled ticks. Positive horses for *Borrelia* spp. and Anaplasmatocae agents exhibited leukopenia, monocytopenia and lymphopenia. We conclude that Campo Grande-MS can be considered enzootic for tick-borne bacteria, since we found a general seropositivity of 59.9% of the sampled horses, in a single (n= 112) and co-exposure (n= 45). In the second chapter, we aim to investigate the occurrence of *Borrelia* spp. in horses borne at Pantanal Sul Mato-grossense region. We found 46.2% (31/67) of seropositivity for *B. burgdorferi* (s.l.). Molecular detection was positive for *Borrelia* spp. in 60% (40/67) of the animals. Tick parasitism was observed in 64.2% (43/67) of the sampled animals. Of these, 51.2% had simple infestations with *D. nitens*, 9.3% with *A. sculptum*, 9.3% with *R. (B.) microplus* and 30.2% with multiple infestations. Horses can act as sentinel hosts for zoonotic bacterial agents in the studied areas. In addition, single and multiple infections by *Borrelia* spp. and

Anaplasmataceae agents can cause changes in hematological parameters of horses in Mato Grosso do Sul.

**Keywords:** Anaplasmataceae agents; *Borrelia* spp.; horses; infection; *Rickettsia* spp.

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização dos equinos como animais de esporte, trabalho e lazer é inquestionável. Em algumas regiões do estado de Mato Grosso do Sul (MS), o uso desses animais não é só necessário, mas insubstituível (CEPEA, 2006). Além disso, esses animais são de fundamental importância no agronegócio do estado, com participação expressiva na economia. Ainda, as provas esportivas e comércio de equinos com elevado valor zootécnico, também contribuem com o recolhimento de impostos para o estado. Entretanto, a movimentação dos animais para diferentes provas equestres e feiras agropecuárias entre os municípios, pode provocar a disseminação de diversos agentes infecciosos (CEPEA, 2006).

Nesse rol, pode-se destacar *Rickettsia* spp. do grupo Febre Maculosa, *Anaplasma phagocytophilum* (Rickettsiales) e *Borrelia burgdorferi* (s.l.) (Spirochaetales), como importantes agentes infecciosos multihospedeiros transmitidos por carrapatos que infectam cavalos (SANGIONI et al., 2005; MORSHED et al., 2006; BERRADA; TELFORD, 2009; EISEN et al., 2009; HORTA et al., 2009; SCHARF et al., 2011; MACHADO et al., 2012). É importante ressaltar que esses agentes infecciosos são mundialmente conhecidos por também causarem doenças nos seres humanos, como a Febre Maculosa, a Síndrome de Baggio-Yoshinari e a Anaplasmoze Granulocítica Humana. Nesse sentido, os equinos parasitados podem ser considerados como hospedeiros sentinelas das infecções por *Rickettsia* spp., *B. burgdorferi* (s.l.) e *A. phagocytophilum* para os seres humanos (FONSECA et al., 1996; SKARDA, 2005; SANGIONI et al., 2005; HORTA et al., 2007; PINTER et al., 2008; PASSAMONTI et al., 2010; BARBIERI et al., 2014; CAMPOS et al., 2015; PRADO et al., 2017).

Embora os equinos sejam considerados refratários à infecção por *Rickettsia* spp. (UENO et al., 2016), o parasitismo por *B. burgdorferi* (s.l.) e *A. phagocytophilum* nos equinos resulta em doenças crônicas e assintomáticas influenciando negativamente em alguns parâmetros hematológicos,

resultando em queda do rendimento no trabalho e esporte (GEORGE et al., 1993; EGENVALL et al., 2001; SALLES et al., 2002; FRANZÉN et al., 2005; 2007; PASSAMONTI et al., 2010; CAMPOS et al., 2015).

Nesse sentido, devido à importância dos cavalos como animais de trabalho, esporte e lazer, estudos que objetivam conhecer, tanto as ocorrências regionais de *Borrelia* spp., agentes Anaplasmataceae e *Rickettsia* spp., nos equinos, como também a resultante das infecções simples e co-infecções por *Borrelia* spp. e agentes Anaplasmataceae podem servir de subsídio para a formulação ou melhoramento de programas de controle e sanidade equina.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Detectar a infecção por *Borrelia* spp., *Anaplasma* spp. e *Rickettsia* spp., em equinos localizados em Mato Grosso do Sul, bem como a resultante das infecções simples e múltiplas nas variáveis hematológicas dos animais parasitados.

### 2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Identificar as espécies de carrapatos nos animais amostrados;
- ✓ Verificar a ocorrência de *Borrelia* spp., *Anaplasma phagocytophilum* e *Rickettsia* spp. nos carrapatos coletados;
- ✓ Avaliar a exposição a *Borrelia burgdorferi* (s.l.), *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia rickettsii*, *R. parkeri* e *R. amblyommatis* nos equinos amostrados;
- ✓ Detectar a presença de *Borrelia* spp. e *A. phagocytophilum* nos equinos amostrados;
- ✓ Avaliar a influência das infecções simples e múltiplas por *Borrelia* spp. e agentes Anaplasmataceae nas variáveis hematológicas dos animais amostrados.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 O Equino

O cavalo (*Equus caballus*) possui uma posição de destaque tanto em países desenvolvidos como aqueles em desenvolvimento, desempenhando um importante papel na formação econômica, social e política. No Brasil, uma de suas principais funções está relacionada com as atividades agropecuárias, com um número superior a cinco milhões de animais utilizados, principalmente, para o manejo do gado bovino (Almeida, 2001). O aspecto social do equino no Brasil também é importante quando relacionado a atividades de esporte e lazer (CEPEA, 2006; LAGE, 2007; BAPTISTA, 2010) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Distribuição de tropas de cavalos por categorias entre os anos 2004 a 2013, no Brasil.

Classificação	Cabeças
Animais para esporte, lazer e criação:	1.100.00
Animais para lida (trabalho):	3.900.00
Total de animais:	5.000.00

Fonte: MAPA, (2016).

Segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), 2016, o Brasil possui o maior rebanho (8.000.000) de equídeos na América Latina, e, é o terceiro no mundo, atrás apenas da China e México. De acordo com o IBGE (2010), o rebanho de equinos permaneceu, entre 2009 e 2010, na faixa dos 5,5 milhões de cabeças, sendo 20,4% dos animais registrados no Centro-Oeste. O estado com o maior efetivo de equinos é Minas Gerais (MG), enquanto Mato Grosso do Sul (MS) ocupa a sexta posição. Além disso, dos 20 municípios brasileiros com os maiores efetivos, seis pertencem ao MS (Corumbá, Três Lagoas, Campo Grande, Ribas do Rio Pardo, Paranaíba e Aquidauana) (CEPEA, 2006).

As criações de equinos no Brasil envolvem diretamente 607.329 pessoas com a estimativa de 2.429.316 empregos indiretos (Tabela 2).

Ainda, estima-se que o valor total que envolve o complexo do agronegócio do cavalo no Brasil esteja em torno de 16 milhões anualmente (MAPA, 2016).

**Tabela 2.** Renda e estimativa de pessoas ocupadas no complexo do agronegócio do cavalo no Brasil por categorias.

Segmento	Valor (R\$ bilhões)	Pessoas Ocupadas
Lida	8,58	433.333
Esporte e Lazer	5,84	125.700
PSI e Turfe	0,79	5.452
Outros	0,94	42.844
<b>Total</b>	<b>16,15</b>	<b>607.329</b>

Fonte: MAPA, (2016).

É importante ressaltar que, desde a introdução do cavalo no Brasil, a forte associação com a pecuária bovina vem resultando em uma alta correlação entre os dois rebanhos (CEPEA, 2006; MAPA, 2016). Assim, estudos com relação a agentes infecciosos que podem causar algum transtorno na saúde dos animais, devem ser investigados.

De uma forma geral, os equinos são conhecidos por serem hospedeiros para importantes agentes infecciosos que comprometem sua saúde como, Tripanosomíase, Anemia Infecciosa Equina (AIE) (HERRERA et al., 2004; PARREIRA et al., 2016), Herpesvírus Equino (FIELDING et al., 2015; GIANNITTI et al., 2015), Estomatite Vesicular (MACLACHLAN et al., 2011) e Piroplasmose (CAMPOS et al., 2019). Devemos ainda considerar que os equinos podem ser acometidos por agentes causadores de importantes zoonoses como, Raiva (PEIXOTO et al., 2000; LIMA et al., 2005), Mormo (CSASP, 2007; SLATER, 2013), Febre Maculosa (SANGIONI et al., 2005; BARBIERI et al., 2014), Síndrome de Baggio-Yoshinari (MATHER et al., 1994; CAMPOS et al., 2015) e Anaplasmosse Granulocítica Humana (DUMLER; WALKER, 2001a; De La FUENTE et al., 2005; STUEN et al., 2013).



## 3.2 Borreliose de Lyme Equina

### 3.2.1 Agente etiológico

O médico reumatologista do Departamento de Medicina Interna da Universidade de Yale em New Haven, na comunidade de Lyme, Connecticut, EUA, acompanhou crianças com histórico de contato com carrapatos e com sinais de eritema e Artrite Reumatóide Juvenil, que mais tarde foi denominada como Artrite de Lyme (STEERE et al., 1977a; 1977b). Espiroquetas foram encontradas em carrapatos da espécie *Ixodes dammini* nas áreas consideradas endêmicas (BURGDORFER et al., 1982). Uma década após, *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s.) foi descrito como o agente causador da doença de Lyme por Johnson et al. (1984).

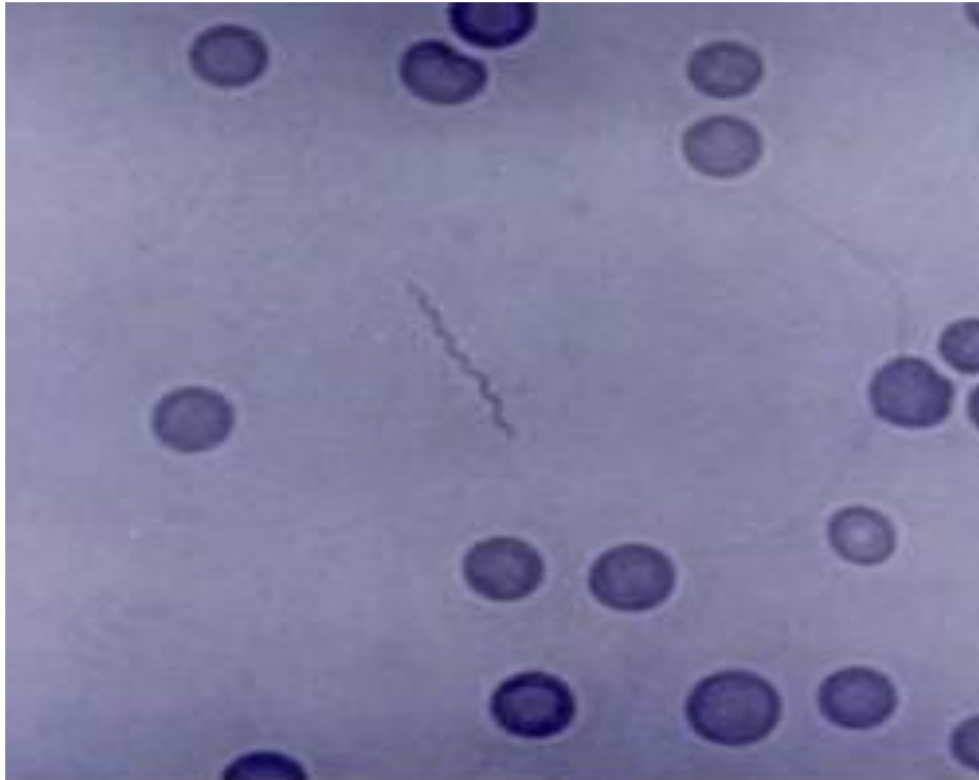
A Borreliose de Lyme é uma enfermidade infecciosa zoonótica, ocasionada por espécies de *Borrelia* transmitidas por carrapatos que infectam animais domésticos, silvestres e humanos. Espécies de *Borrelia* pertencem ao filo Spirochaetes, agrupados no complexo *B. burgdorferi* sensu lato (s.l.), com pelo menos 11 diferentes espécies associadas à Eurásia (*B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. garinii*, *B. japonica*, *B. lusitaniae*, *B. sinica*, *B. spielmanii*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. valaisiana* e *B. yangtze*), enquanto cinco estão restritas aos Estados Unidos (EUA) (*B. americana*, *B. andersonii*, *B. californiensis*, *B. carolinensis* e *B. kurtenbachii*), além de outras três espécies de distribuição mundial [*B. burgdorferi* (s.s.), *B. bissetti* e *B. carolinensis*] (SOARES et al., 2000; STEERE et al., 2004; TILLY et al., 2008; RUDENKO et al., 2011). Outras espécies de *Borrelia* descritas mundialmente em uma diversidade de animais vertebrados e invertebrados estão incluídas no grupo Febre Recorrente (WOUUDA et al., 1975, MATTON; VAN MELCKEBEKE, 1990; LEE et al., 2014; NIETO et al., 2014; MUÑOZ-LEAL et al., 2019), incluindo *B. theileri*, caracterizada em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no Brasil (CORDEIRO et al., 2018).

As espécies associadas a casos de borreliose nos seres humanos, (Doença de Lyme), são: *B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. bissetti*, *B. burgdorferi* (s.s.), *B. garinii*, *B. kurtenbachii*, *B. lusitaniae*, *B. spielmanii* e *B. valaisiana*. Enquanto nos EUA a espécie *B. burgdorferi* (s.s.) é considerada a principal causadora da doença em humanos, e na Europa a Doença de Lyme é

causada por *B. burgdorferi* (s.s.), *B. garinii* e *B. afzelii* (SAMUELS; RADOLF, 2010; RUDENKO et al., 2011; BASILE, 2017).

Recentemente nos EUA, após análises filogenéticas, uma nova espécie de *Borrelia* foi identificada, denominada Candidatus *Borrelia mayonii*, no qual também foi incluída no complexo *B. burgdorferi* (s.l.). Essa nova espécie foi observada apresentando uma alta espiroquetemia, não observada comumente nas infecções clássicas de doença de Lyme (PRITT et al., 2016).

Morfologicamente, as espécies de *Borrelia* são finas e alongadas, móveis e espiraladas variando de 3 a 500uM (Figura 1), e com uma membrana celular externa frágil que contém muitos polipeptídios, incluindo as proteínas de superfície exteriores (OSP's) (BUTLER et al., 2005). *Borrelia burgdorferi* possui o maior número de plasmídeos conhecidos em qualquer espécie de bactéria bem como de genes relacionados com patogenicidade, incluindo genes da proteína de superfície externa, localizados principalmente nestes plasmídeos (CASJENS et al., 2000; STEWART et al., 2005). Distinguem-se morfologicamente dos demais gêneros da família Spirochaetaceae por serem maiores, possuírem maior número de flagelos periplasmáticos (15 a 20) e menor número de espiras (PFISTER et al., 1994; QUINN et al., 1994).



**Figura 1.** Espiroqueta em sangue periférico de equino. Esfregaço de sangue corado com Giemsa, aumento de 1.000x (MADUREIRA, 2007).

Filgueira et al. (1989), observaram pela primeira vez no Brasil, *Borrelia* spp. em um paciente com eritema crônico migratório, cuja biópsia revelou organismos com morfologia compatível com espécies de *Borrelia*. A primeira publicação alertando para a possibilidade da existência da infecção por *Borrelia* spp. em seres humanos no Brasil, foi realizada por Yoshinari et al. em 1989. Posteriormente, foi observada a presença de possíveis vetores e da espiroqueta em pacientes no estado de São Paulo, sendo descritas as primeiras observações da doença em humanos, porém com algumas diferenças em relação a doença de Lyme clássica norte americana (YOSHINARI et al., 1992). Embora haja evidências da ocorrência de *B. burgdorferi* no Brasil por meio de testes de diagnósticos como sorologia, imuno-histoquímica e molecular (MANTOVANI et al., 2010; TALHARI et al., 2010; LOPES et al., 2017), a etiologia não é totalmente esclarecida, visto que no Brasil ainda não foi possível o isolamento do agente causador da doença em humanos (MANTOVANI et al., 2012). De fato, a ausência de crescimento em meio Barbour-Stoenner-Kelly (BSK), e a ausência de carrapatos do

complexo *Ixodes ricinus* (conhecidos vetores da doença de Lyme clássica) em áreas de risco (BARROS-BATTESTI et al., 2000, ABEL et al., 2000), deixam em dúvida a infecção por *Borrelia* spp. em seres humanos no Brasil (YOSHINARI et al., 2010).

As diferenças encontradas entre ambas as enfermidades conduziram a diferentes nomenclaturas para doença em humanos no Brasil, a qual já foi chamada de Doença de Lyme-símile, Síndrome infecto-reacional Lyme símile (SIRLS) e Doença de Lyme símile brasileira. Na década passada, recebeu nova denominação - Síndrome de Baggio-Yoshinari (SBY), definida como uma enfermidade de origem infecciosa, transmitida por carrapatos dos gêneros *Amblyomma* e/ou *Rhipicephalus*, causada por espiroquetas do complexo *Borrelia burgdorferi* (s.l.), capazes de causar complicações sistêmicas e recorrentes, incluindo desordens imunológicas, ao longo da evolução clínica (MANTOVANI et al., 2007; YOSHINARI et al., 2010).

Estruturas similares a espiroquetas, foram encontradas em amostras de sangue periférico de pacientes com SBY no Brasil. Esses organismos apresentaram morfologia compatível a bacteroides longos não flagelados na microscopia eletrônica, cistos e corpos densos. Foi então sugerido variações na morfologia de espiroquetas patogênicas adaptadas aos hospedeiros vertebrados e invertebrados. Diante dessas características, foi sugerido a descrição de espiroquetas de morfologia incompleta, não espiraladas e latentes, semelhantes a *Mycoplasma* spp. e *Chlamydia* spp. (MANTOVANI et al., 2007). Entretanto, por meio de análises microscópicas, sorológicas e moleculares, foi confirmado que esses agentes pertencem ao complexo *B. burgdorferi* (s.l.) com morfologia atípica e intracelular, com persistência e episódios de recorrência clínica nos seres humanos (MANTOVANI, 2010).

Embora não se tenha isolado *Borrelia* spp. de carrapatos no Brasil, espiroquetas morfologicamente similares às do gênero *Borrelia* foram observadas em *Amblyomma cajennense*, *A. aureolatum*, *Ixodes didelphidis*, *I. loricatus*, no Brasil (BARROS-BATTESTI, 1998; 2000; ABEL et al., 2000). Além destes, o carrapato *R. (B.) microplus* pode ser considerado um potencial vetor devido a observação de espiroquetas em cultivo de células embrionárias dessa espécie, que foram geneticamente semelhantes a

*Borrelia* spp. para um determinado gene (YOSHINARI, et al., 2003; MADUREIRA, 2007; RESENDE et al., 2008).

### 3.2.2 Hospedeiros

Os principais hospedeiros invertebrados de *B. burgdorferi* (s.l.), são os carrapatos: *I. scapularis* e *I. pacificus* nos EUA; *I. ricinus* na Europa e Ásia, *I. persulcatus* na Ásia, *I. ovatus*, *I. turdus* e *I. tanuki* no Japão e *I. ovatus* na China e Nepal (MASUZAWA, 2004). No entanto os gêneros *Ornithodoros* e *Amblyomma* têm sido considerados potenciais vetores na América do Sul (ABEL et al., 2000). Os carrapatos da espécie *R. (B.) microplus* tem sido relatados como possíveis vetores de *B. theileri* na África do Sul, Austrália, Brasil e México (CALLOW, 1967; MARTINS et al., 1996; VIVAS et al., 1996). Outras espécies também têm sido descritas como: *I. ricinus*, *Haemaphysalis cinnabarina punctata*, *R. (B.) annulatus*, *R. (B.) decoloratus* e *R. evertsi* no México (VIVAS et al., 1996).

O camundongo-de-patas-brancas (*Peromyscus leucopus*) no Leste e o esquilo cinzento (*Sciurus carolinensis*) no Oeste dos EUA, são os principais hospedeiros reservatórios para *B. burgdorferi*, servindo como fonte de infecção para todos os estádios de carrapatos. Enquanto que os cervos e outros grandes mamíferos selvagens mantém as formas adultas do gênero *Ixodes* na América do Norte (EISEN et al., 2009; RADOLF et al., 2012).

A espécie *B. theileri*, tem sido descrita como espiroquetas de bovinos, ovinos, equinos, cervídeos, impalas e outros ruminantes silvestres (IRVIN et al., 1973, WOUDA et al., 1975, MATTON; VAN MELCKEBEKE, 1990). Relatos mostram que o carrapato da espécie *R. (B.) microplus* está envolvido na transmissão desse agente (MARTINS et al., 1996; CORDEIRO et al., 2018).

Importante ressaltar que no Brasil, os vetores de *B. burgdorferi* (s.l.) ainda não estão totalmente definidos, no entanto relatos mostram carrapatos do gênero *Ixodes* spp. e *Amblyomma sculptum* (*A. cajennense*), infestando pequenos mamíferos no estado de São Paulo, e equinos na região norte do Paraná, sugerindo como potenciais vetores para o organismo (ABEL et al., 2000; GONÇALVES et al., 2013).

### 3.2.3 Transmissão

A transmissão ocorre por meio da alimentação das larvas, ninfas ou adultos infectados. As ninfas por sua vez, desempenham um papel fundamental na epidemiologia da doença por conta da alimentação por um período relativamente curto (ROLLEND et al., 2013). Ainda, têm sido relatados como modo de transmissão em humanos o contato com a urina de roedores, transfusão sanguínea, transplante de órgãos e congênita (BURGESS et al., 1986, HYDE et al., 1989, DORWARD et al., 1991, BURGDORFER, 1993, GUSTAFSON et al., 1993, KARCH et al., 1994).

O DNA de *B. burgdorferi* (s.l.) é detectado com maior frequência em carrapatos fêmeas, com menos frequência em ninfas e larvas, e raramente em carrapatos adultos machos (WODECKA, 2003; De MEEUS et al., 2004). Os machos da espécie *I. ricinus*, por exemplo, raramente se alimentam, e, portanto, o risco da infecção por *B. burgdorferi* se deve principalmente ao contato com os carrapatos fêmeas (De MEEUS et al., 2004). Os três estádios de carrapatos podem ser infectados através do repasto sanguíneo. Entretanto, como a transmissão transovariana das fêmeas adultas são raras, as larvas e as ninfas podem desempenhar um importante papel por manter as espiroquetas por transmissão transestadial (GERN; RAIS, 1996; HUMAIR; GERN, 2000). Cordeiro et al. (2018), relataram a ocorrência de transmissão transovariana de *B. theileri* em carrapatos da espécie *R. (B.) microplus*, sugerindo a necessidade de mais investigações sobre o envolvimento de *B. theileri* na etiologia da doença no Brasil.

O sucesso da transmissão de borrelias está fortemente relacionado a temperatura do ambiente no qual os vetores estão inseridos. Temperaturas elevadas acima de 27°C resultam em prejuízo no metabolismo das espiroquetas e nos processos digestivos dos carrapatos (HOOGSTRAAL, 1985; SHIH et al., 1995), podendo causar a morte ou diapausa do vetor (NAKAYAMA; SPIELMAN, 1989, ZUNG et al., 1989, FINGERLE et al., 1995, SHIH et al., 1995).

Ainda, tem sido descrita a importância de aves migratórias na disseminação de *Borrelia* spp. (STAFFORD III et al., 1995) como carreadoras de espécies de carrapatos que estejam infectados (TELFORD III et al., 1989; DURDEN et al., 2001; PACHECO et al., 2019). Da mesma forma, os animais

domésticos também podem servir como importantes reservatórios de espécies de *Borrelia*, podendo atuar como fontes de infecção no ambiente domiciliar (MATHER et al., 1994; CORREA, 2007). Como os equinos apresentam soroprevalências para *B. burgdorferi*, eles são considerados como hospedeiros sentinelas da infecção para os seres humanos (SOARES, 2013; PRADO et al., 2017; SOCOLOSKI et al., 2018).

### 3.2.4 Ciclo biológico

*Borrelia burgdorferi* possui ciclo heteroxênico parasitando mamíferos e carrapatos (METCALF et al., 2008). Os vetores são infectados devido a invasão das espiroquetas nas glândulas salivares durante o repasto sanguíneo. As bactérias migram pela hemocele e são encontrados em hemócitos, ovários, gânglio central e principalmente no intestino do carrapato, e, logo após, retornarão às glândulas salivares, inoculando-as aos animais durante o repasto sanguíneo (MARTINS et al., 1996; COOK, 2014). Nas mudanças de estádios, muitas espiroquetas podem acabar morrendo ou, quando em grande número, podem matar os carrapatos (PIESMAN et al., 1990; SCHWAN, 1996).

Após a fixação do carrapato é necessário um período superior a 48 horas para o sucesso da transferência das borrelias para o novo hospedeiro mamífero (PIESMAN et al., 1987; FALCO et al., 1996; PIESMAN et al., 2001; COOK, 2014). O tempo de fixação é importante, porque além de transferir a espiroqueta ao hospedeiro, o mesmo regula as lipoproteínas de membrana externa A (OspA), que são necessárias à sobrevivência da espiroqueta nos intestinos do vetor (PAL et al., 2001).

### 3.2.5 Patogenia da *Borrelia burgdorferi* (s.l.)

Os mecanismos de desenvolvimento da borreliose de Lyme em equinos após a infecção por *B. burgdorferi*, não está totalmente claro. Algumas lipoproteínas de superfície externa C (OspC) de *B. burgdorferi* são necessárias no estabelecimento de infecções agudas, enquanto que a proteína variável expressa (VLsE) é encontrada nas infecções crônicas (TILLY et al., 2008; CAINE; COBURN, 2016). A VLsE é geneticamente variável proporcionando um mecanismo de escape contra ações do sistema

imune do hospedeiro, persistindo a infecção (TILLY et al., 2013). Após a infecção inicial, *B. burgdorferi* tende a se espalhar pelo tecido conjuntivo e circulação sanguínea, podendo disseminar localmente e sistemicamente resultando em reações linfo-plasmocíticas em vários tecidos (CAINE et al., 2015; STEERE et al., 2016).

### 3.2.6 Sinais Clínicos

As manifestações clínicas apresentadas na borreliose de Lyme em equinos, coincidem com algumas observadas nos seres humanos, como: artrite (BURGESS et al., 1986; HAHN et al., 1996), claudicação (BROWING et al., 1993), sensibilidade muscular (DIVERS et al., 2003), uveíte anterior (BURGESS et al., 1986; HAHN et al., 1996), encefalite (BURGESS; MATTISON, 1987), aborto (SORENSEN et al., 1990), morte (BURGESS; MATTISON, 1987), febre e letargia (MAGNARELLI et al., 1988), perda de peso, aumento articular, enrijecimento muscular, depressão, mudança de comportamento, disfagia, balanço de cabeça e encefalite (BURGESS et al., 1986; COHEN; COHEN, 1990; PARKER; WHITE, 1992). Contudo, essas manifestações podem variar devido a associação de outros agentes transmitidos por carrapatos (MAGNARELLI et al., 2000).

Nas áreas consideradas endêmicas para a borreliose de Lyme nos EUA, animais positivos podem apresentar alergia na pele, queda de pelo com descamações nos locais onde os carrapatos se fazem presentes. Ainda, existe a possibilidade de haver animais assintomáticos (BOSLER et al., 1988; PARKER; WHITE, 1992). Em pôneis expostos a carrapatos infectados com *B. burgdorferi*, não foram observados sinais clínicos comuns associados à infecção. Nas análises microscópicas, foram observadas lesões restritas à pele e aos linfonodos periféricos próximos aos locais de fixação do carrapato, e em alguns animais observou-se sinovite leve e não supurativa, perineurite ou meningite (CHANG et al., 1999; 2000).

Em seres humanos, a fase aguda da doença é caracterizada pelo surgimento ou não do Eritema Migratório (EM) no local da fixação do vetor. Normalmente o EM se apresenta em um período de 10 dias (YOSHINARI et al., 1997; YOSHINARI et al., 1999a; COSTA et al., 2001), entretanto poderá surgir sinais inespecíficos que possam ser confundidos com outras afecções,



como febre baixa, calafrios, mialgia, artralgia, cefaleia, adenomegalia e elevação transitória de enzimas hepáticas. Ainda, nesse mesmo estágio, podem aparecer novas lesões, mas menos expansivas e disseminadas, como eritema anular secundário (ASCH et al., 1994).

No Brasil, a fase crônica da SBY, pelo desconhecimento da comunidade médica e consequente não início do tratamento convencional com antibióticos, evolui para complicações secundárias persistentes como artrite, artralgia, mialgia, dor radicular, fadiga intensa, Síndrome da Fadiga Crônica (SFC) (YOSHINARI et al., 1992; YOSHINARI et al., 1997; YOSHINARI et al., 1999a), sinais neurológicos (meningite linfomonocitária; neurite de nervos cranianos, paralisia facial, diplopia, surdez, disfagia, dislalia, nevralgia do trigêmeo, radiculopatias periféricas sensitivo-motoras; síndrome de Guillain-Barré; mononeurite multiplex, convulsões, encefalomielite, encefalopatia, disfunção esfíncteriana) (SHINJO et al., 2009) e cardíacos (arritmia, insuficiência cardíaca por cardiomegalia) (YOSHINARI et al., 1997b; YOSHINARI et al., 1999a; YOSHINARI et al., 1999b).

No território brasileiro, tem sido observado uma prevalência de apenas 5% de casos com complicações cardíacas, entretanto nas complicações articulares e neurológicas ocorrem em aproximadamente 35% dos casos (YOSHINARI et al., 1992; YOSHINARI et al., 1997; YOSHINARI et al., 1999a). Estes aspectos clínicos da SBY se dão devido ao aumento da frequência de recidivas, especialmente quando as pessoas não são diagnosticadas e tratadas precocemente durante a fase aguda. Vale ressaltar que as recorrências ocorridas, normalmente não são diagnosticadas pelos médicos, pois dados epidemiológicos que ocorreram não estão associados aos sinais recentes (YOSHINARI et al., 1999a; 2010).

### **3.2.7 Epidemiologia**

Trabalhos no território nacional vêm reportando a ocorrência de borreliose de Lyme em animais silvestres e domésticos, como também relatos isolados da SBY. Dentre esses estados, destaca-se: Rio Grande do Sul (CAMPOS et al., 2015), Paraná (GONÇALVES et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2016), São Paulo (SHINJO et al., 2009; BROOKS et al., 2012), Rio de Janeiro (MADUREIRA et al., 2007; CORRÊA, 2011;

CORDEIRO et al., 2012; SILVA et al., 2013; PRADO et al., 2014), Minas Gerais (MONTANDON et al., 2014), Mato Grosso do Sul (Naka et al., 2008; RESENDE et al., 2016), Mato grosso (SOARES, 2013), Pará (RODRIGUES et al., 2007; GALO et al., 2009), Amazonas (SANTOS et al., 2010; Santos et al., 2011), Santa Catarina e Rio Grande do Norte (BRASIL, 2010).

No estado do Mato Grosso do Sul, *Borrelia* spp. vêm sendo relatada infectando seres humanos, destacando a primeira ocorrência de Meningite de Lyme no Brasil (COSTA et al., 1996; NAKA et al., 2008; RESENDE et al., 2016; LOPES et al., 2017), e carrapatos da espécie *R. (B.) microplus* (RESENDE et al., 2008; 2016).

Estudos soroepidemiológicos mostram que os equinos podem participar dos ciclos enzoóticos de transmissão de *Borrelia* spp. causadoras da SBY, em algumas regiões do Brasil, atuando como hospedeiros reservatórios e como dispersores de carrapatos que possam estar infectados pelas espiroquetas (CAMPOS et al., 2015). Gonçalves et al. (2014), detectaram pela primeira vez no Brasil a presença de *B. burgdorferi* (s.s.) em carrapatos da espécie *D. nitens* infestando cavalos no estado do Paraná.

### **3.2.8 Métodos de diagnóstico**

O diagnóstico da borreliose de Lyme em animais, ou SBY em humanos, torna-se completo quando antes da realização de exames laboratoriais, sejam associadas análises clínicas dos pacientes e dados epidemiológicos a respeito da doença (MADUREIRA, 2004), apesar da enfermidade normalmente se apresentar de forma inespecífica, tanto em animais como nos seres humanos (CORRÊA, 2007; MANTOVANI et al., 2007). Apenas o uso de ferramentas laboratoriais pode implicar em resultados falsos positivo e negativo, uma vez que o período de espiroquetemia desses agentes, podem ou não se encontrar suficientemente circulantes para a detecção (MATTON; VAN MELCKEBEKE, 1990).

Algumas formas de diagnósticos laboratoriais estão disponíveis na tentativa de minimizar a ocorrência de diagnóstico errôneo:

### 3.2.8.1 Diagnóstico sorológico

Os ensaios imunológicos para detecção de *Borrelia* spp., têm sido optados por muitos centros de referências (MAGNARELLI et al., 2004), e no Brasil, Yoshinari et al. (2003), relataram que técnicas sorológicas para detectar anticorpos anti-IgG e anti- IgM, sejam em animais ou em seres humanos são muito utilizadas principalmente para confirmar casos suspeitos em áreas de risco para borreliose de Lyme e para o entendimento da situação epidemiológica no país.

O ensaio de Imunoabsorção Enzimática Indireto (ELISA), tem sido considerada a principal ferramenta mais utilizada para diagnóstico e levantamentos epidemiológicos de borreliose nas regiões descritas (STEERE, 1989). No Brasil, este método foi padronizado utilizando antígenos sonicados totais de *B. burgdorferi* (s.s.) cepa G39/40 para detecção em humanos (COSTA, 1998; BARROS, 2000), bovinos (ISHIKAWA et al., 1997) cães (SOARES et al., 1999) e equinos (SALLES et al., 2002).

Outro método sorológico utilizado, mas em triagens e com menor frequência, é a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Entretanto, o uso deste método tem sido bastante escasso, já que sua sensibilidade e especificidade são inferiores ao teste de ELISA (GOLIGHTLY, 1993), além dos resultados serem subjetivos e apenas utilizado quando casos clínicos suspeitos, ou informações epidemiológicas fortalecerem o diagnóstico (BENNETT, 1995; MAGNARELLI et al., 2004).

A imuno-deteção de proteínas pela técnica de Western Blot (WB) têm sido utilizada como método confirmatório de borreliose de Lyme utilizando-se OspC (SOARES et al., 2000; MAGNARELLI et al., 2000, 2004; DIVERS et al., 2012; FUNK et al., 2016). Entretanto, essa lipo-proteína é detectável somente entre três a cinco semanas e desaparece após quatro a cinco meses (WAGNER et al., 2011; FUNK et al., 2016). Este método de diagnóstico é pouco utilizado devido a demora na execução e custos elevados (CORRÊA, 2011).

Embora os testes de ELISA e WB, sejam os mais utilizados e confiáveis quando se trata de diagnóstico da SBY ou Borreliose de Lyme em animais, deve-se levar em consideração fatores como ocorrências de resultados falsos positivos e negativos (MANTOVANI, 2010), pois os títulos dos ensaios

apresentados em trabalhos realizados no país são considerados baixos e as metodologias sorológicas realizadas no Brasil são diferentes das utilizadas nos EUA e Eurásia (YOSHINARI et al., 2010).

Animais que recebem tratamentos para infecção por *B. burgdorferi* continuam a apresentar IgG detectáveis aos testes sorológicos por meses a anos (DIVERS et al., 2012; FUNK et al., 2016). Com isso, é possível confirmar a presença de infecções crônicas em cavalos (CHANG et al., 2005; JOHNSON et al., 2008; DIVERS et al., 2012; FUNK et al., 2016).

A detecção de espécies de *Borrelia* em tecidos de pacientes esbarra na falta de anticorpos policlonais (OWEN, 2006; EISENDLE et al., 2007; TALHARI et al., 2010). Nesse sentido, o ensaio Imunohistoquímico associado a Microscopia de Focagem Flutuante (MFF) vem sendo aplicado como alternativa de sucesso para o diagnóstico de espiroquetas de *Borrelia* spp. no Brasil (EISENDLE et al., 2007; TALHARI et al., 2010). Eisendle et al. (2007), demonstraram eficácia destes métodos em relação a testes moleculares para detecção de espiroquetas de *Borrelia* em cortes histológicos de tecidos de pacientes suspeitos. Ainda, Talhari et al. (2010), detectaram 22,7% de espiroquetas em biópsias de pele de pacientes na região Amazônica, utilizando a associação da técnica de Imunohistoquímica e MFF.

### 3.2.9.2 Diagnóstico direto

Algumas espécies de *Borrelia* podem ser detectadas de forma direta, como a impregnação de tecidos na prata (técnica de Warthin-Starry) (MELO et al., 2003; De ALMEIDA et al., 2005). Esta técnica também considerada como um método de coloração não verdadeiro, auxilia na visualização de algumas espécies de bactérias de forma espiralada e fina e que não se coram suficientes pela coloração de Gram, se apresentando na cor marrom-escuro ou negra em um fundo amarelo-castanho ou marrom claro (QUIN et al., 2002; MORENO et al., 2003; De ALMEIDA et al., 2005). Os esfregaços sanguíneos corados com Giemsa, também podem ser utilizados para a visualização das espiroquetas por meio da microscopia óptica (MADUREIRA, 2004). No entanto, a sensibilidade de ambos os testes é baixa, variando de 10% a 40%, quando comparadas com observações diretas em microscopia de campo escuro ou contraste de fase, além de ser necessário que o

paciente apresente espiroquetemias suficientes para detecção no momento da execução do teste, o que comumente não ocorre (MATTON; VAN MALCKEBEKE, 1990; MORENO et al., 2003).

Outro método utilizado de detecção direta das espiroquetas de *Borrelia* spp., é o isolamento em meio Barbour-Stoenner-Kelly (BSK) em temperatura entre 30°C a 35°C por até 12 semanas sob condições micro-aerofílicas (DICKINSON; BATTLE, 2000; LIVERIS et al., 2012). Materiais a partir de hemolinfa, saliva, tecidos de carrapatos, soros, fluídos articulares e tecidos de animais e seres humanos podem ser utilizados (EWING et al., 1994; DICKINSON; BATTLE, 2000; RUDENKO et al., 2009; ZHAN et al., 2009). Entretanto, algumas espécies de *Borrelia* são de difícil cultivo ou até mesmo incultiváveis ao meio BSK, além de demandar um longo período de crescimento (SMITH; ROGERS, 1998; OLIVEIRA et al., 2004).

No Brasil, até o momento não foi possível o isolamento de *B. burgdorferi* (s.l.) ao meio BSK, mesmo utilizando amostras de seres humanos diagnosticados com SBY e fluídos e tecidos de animais (YOSHINARI et al., 2010). Trabalhos mais recentes, tentam outra forma de isolar *B. burgdorferi* por meio do cultivo in vitro utilizando linhagens de células de carrapatos, na tentativa de esclarecer características da biologia das espiroquetas encontradas no nosso país dentro do vetor (TEIXEIRA, 2014).

Relatos mostram o sucesso de detecção de *Borrelia* spp. com o uso da ferramenta de Microscopia de Focagem Flutuante (MFF), onde consiste em analisar lâminas em diversos planos simultaneamente, ou seja, na horizontal e vertical, com movimento de aproximação e distanciamento da objetiva do microscópio, em aumento de até 400x, sob iluminação forte (EISENDLE et al., 2007; TALHARI et al., 2010).

### **3.2.9.3 Diagnóstico molecular**

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) têm sido a técnica molecular mais utilizada por alguns centros de referências, pois possui uma alta sensibilidade e especificidade, principalmente quando se trata de infecções agudas (WALLICH et al., 1992; LIENBLING et al., 1993; CHANG et al., 2000; ALBY; CAPRARO, 2015). Materiais como biópsias de pele de pacientes humanos com eritema migrans clássico, membrana sinovial, tecidos de

animais, saliva, hemolinfa ou tecidos de carrapatos são mais sensíveis do que amostras de sangue (ANDERSON et al., 1989; EWING et al., 1994; LANE et al., 1994; DICKINSON; BATTLE, 2000; CERAR et al., 2008; RUDENKO et al., 2009; ZHAN et al., 2009; LIVERIS et al., 2012).

Diversas pesquisas realizadas nos últimos anos, têm tentado amplificar amostras utilizando genes de superfície de proteínas (Osp) e flagelares de *B. burgdorferi*. Porém, não tem sido observado sucesso na amplificação destes genes com amostras brasileiras, já que essas bactérias possuem características distintas das encontradas na América do Norte e Eurásia como, morfologia atípica, sem flagelos e desprovida de inúmeros constituintes da membrana externa (BUTLER et al., 2005; MANTOVANI et al., 2007; 2010).

No Brasil foram desenhados primers para amplificar o gene flgE (SAL et al., 2008), demonstrando positividade molecular para *B. burgdorferi* em amostras de animais, carrapatos e seres humanos diagnosticados com SBY (MANTOVANI, 2010). Vale lembrar que este método não tem sido empregado na rotina clínica, pois trata-se de uma técnica de elevado custo e difícil detecção, uma vez que o período de espiroquetemia de *B. burgdorferi* é baixo (AGUERO-ROSENFELD et al., 2005; MANTOVANI, 2010).

No entanto, alguns marcadores moleculares em regiões bem conservadas estão disponíveis e são bem utilizados na identificação de *Borrelia* spp. no mundo, como os genes 16SrRNA, flaB (RICH et al., 2001) rpoB (ALEKSHUN et al., 1997) e 23SrRNA (BRETTSCHEIDER et al., 1998; RANKA et al., 2004).

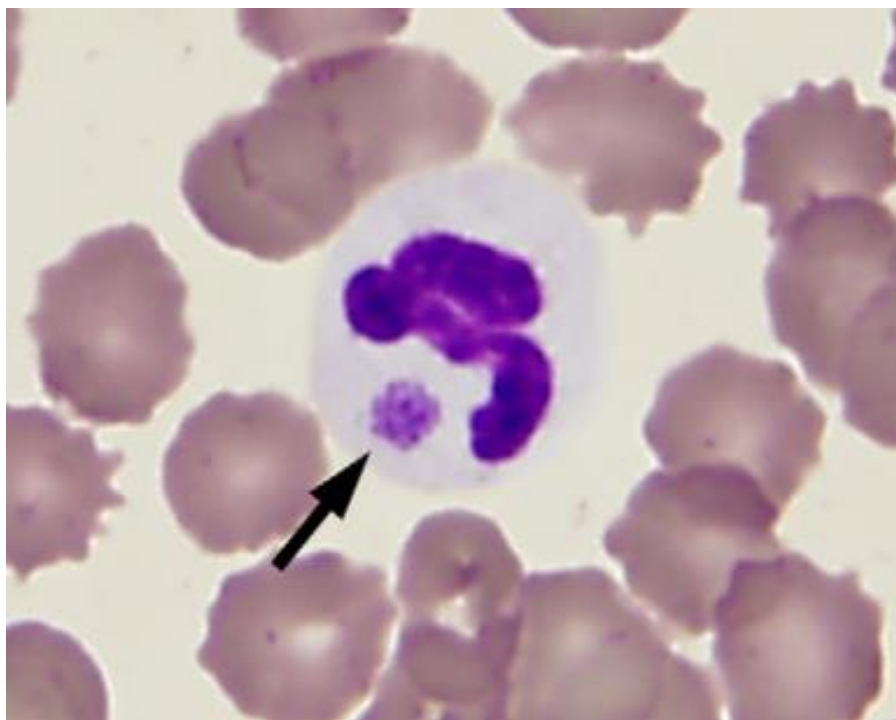
### **3.2.9 Anaplasmoses Granulocítica Equina**

#### **3.2.10 Agente etiológico**

Atualmente *Anaplasma phagocytophilum* reúne *Ehrlichia phagocytophila* (agente da febre do carrapato em bovinos, ovinos e caprinos), *E. equi* (agente da Erliquiose Granulocítica Equina) e *E. chaffeensis* (causadora da Erliquiose monocítica Humana) (DUMLER et al., 2001b). São bactérias gram negativas intracitoplasmáticas obrigatórias, pertencentes a família Anaplasmataceae (FOGGIE, 1949; GRIBBLE, 1969; CHEN et al., 1994;

DUMLER et al., 2001b), que compreende os gêneros: *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia* e *Wolbachia* (DUMLER et al., 2001b; ANDRÉ, 2018). Se reproduzem formando colônias, dando origem a mórulas (DUMLER et al., 2001b; RAR; GOLOVLJOVA, 2011). A anaplasmose é uma zoonose multisistêmica, associada principalmente ao quadro de trombocitopenia (CHEN et al., 1994; ISMAIL et al., 2010; WOLDEHIWET, 2010).

As mórulas citoplasmáticas e os vacúolos são de tamanhos variáveis; o último varia entre 1,5 mm e 6 mm de diâmetro (FOGGIE, 1951; POPOV et al., 1998). Essas bactérias são pleomórficas, mas geralmente possuem uma forma de cocóide a elipsoidal. Algumas aparecem como pequenas e densas estruturas, outras são corpos reticulados grandes e menos densos (TUOMI; VON BONSDORFF, 1966; WOLDEHIWET; SCOTT, 1982) (Figura 2).



**Figura 2.** Mórula de *Anaplasma phagocytophilum* em neutrófilos (seta) (LASCOLA et al., 2009).

### 3.2.11 Vetores

Os vetores principais de *A. phagocytophilum* são pertencentes ao complexo *Ixodes persulcatus* que incluem *I. scapularis* e *I. pacificus* nos EUA, *I. ricinus* na Europa Ocidental e *I. persulcatus* na Europa Oriental e Ásia (De LA FUENTE et al., 2004; ALLEMAN; WAMSLEY, 2008). Carrapatos dos gêneros *Ixodes*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Hyalomma* e *Haemaphysalis*

vem sendo reportados mundialmente como vetores de *A. phagocytophilum* (MADIGAN; GRIBBLE, 1987; BOWN et al., 2003; STUEN, 2007). De La Fuente et al. (2004), observaram a presença de *A. phagocytophilum* infectando diferentes espécies de carrapatos em mamíferos na região central da Espanha. Dentre essas espécies incluem: *Hyalomma m. marginatum*, *Rhipicephalus bursa* e *Dermacentor marginatum*, e nenhum carrapato do gênero *Ixodes*.

O Brasil ocupa a maior parte da região neotropical do hemisfério sul, no entanto os carrapatos pertencentes ao gênero *Ixodes* são escassos, pois das 240 espécies conhecidas em todo o mundo, apenas oito são encontradas no Brasil, mas nenhuma pertencente ao complexo *I. ricinus* (DANTAS-TORRES et al., 2009; ONOFRIO et al., 2009). Desse modo, não se conhece o vetor responsável pela transmissão de *A. phagocytophilum* no Brasil (SALVAGNI et al., 2010; GAVIÃO PRADO et al., 2011).

### 3.2.12 Hospedeiros

*Anaplasma phagocytophilum* possui uma grande variedade de hospedeiros silvestres e domésticos incluindo ruminantes, roedores, equídeos, canídeos, aves migratórias e carnívoras e seres humanos (DUMLER; WALKER, 2001a; De LA FUENTE et al., 2005; MASSUNG et al., 2005; DUGAN et al., 2006; MACHADO et al., 2012). Segundo Swanson et al. (2006), podemos encontrar diferentes tipos de hospedeiros vertebrados para *A. phagocytophilum*. Os hospedeiros susceptíveis desenvolvem a doença e apresentam altas bacteremias durante todo o curso da infecção; os hospedeiros reservatórios não desenvolvem a doença clínica, no entanto apresentam bacteremia significativa; e os hospedeiros finais, que não apresentam quantidades significativas do agente na circulação com capacidade para infectar o vetor (SWANSON et al., 2006).

As principais espécies de hospedeiros reservatório nos EUA para *A. phagocytophilum*, é o pequeno roedor *Peromyscus leucopus* e o veado da cauda branca (*Odocoileus virginianus*). Em ambas as espécies, indivíduos infectados por *A. phagocytophilum* não demonstram sintomatologia clínica. Ainda, *P. leucopus* e *O. virginianus* são encontrados naturalmente parasitados por carrapatos do gênero *Ixodes* (BAKKEN; DUMLER, 2000;



MASSUNG et al., 2005; DUGAN et al., 2006). Na Europa, as principais espécies consideradas reservatório do agente 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).

Os animais domésticos podem desenvolver doenças clínicas definidas, como a febre transmitida por carrapatos em bovinos e ovinos e Anaplasmoze Granulocítica Canina (AGC) (STUEN et al., 2013). Ainda, a bactéria pode infectar os seres humanos causando a Anaplasmoze Granulocítica Humana (AGH), podendo se apresentar de forma leve a grave (BAKKEN; DUMLER, 2015).

Após o primeiro relato por Gribble em 1969 da ocorrência de *A. phagocytophilum* em equinos no estado da Califórnia (EUA), alguns relatos mostraram que os equinos podem ser encontrados parasitados, entretanto pouco se conhece acerca da epidemiologia, patogenia e transmissão de *A. phagocytophilum* à essa espécie (SALVAGNI et al., 2010; WOLDEHIWET, 2010). E no Brasil, evidências sorológicas têm sido descritas a respeito dessa infecção (SALVAGNI et al., 2010).

### **3.2.13 Transmissão**

As bactérias são transmitidas durante o repasto sanguíneo e mantidas apenas por transmissão transtadial nos carrapatos, sendo necessário a presença de hospedeiros vertebrados para a manutenção (BOWN et al., 2003; DUNNING HOTOPP et al., 2006; NIETO; FOLEY, 2008). O sucesso na transmissão dessas bactérias está relacionado diretamente a densidade de carrapatos e da alimentação das ninfas e adultos em hospedeiros mamíferos com elevadas bacteremias (OGDEN et al., 2002a; RIKIHISA, 2011). Entretanto, a competência vetorial de algumas espécies de carrapatos por *A. phagocytophilum*, ainda está obscura.

Fatores abióticos podem interferir na quantidade de carrapatos disponíveis para manter o ciclo e em qual ciclo de vida tais vetores se encontram. Os carrapatos Ixodídeos podem passar por um processo conhecido como diapausa, onde indivíduos que acabaram de sofrer ecdise

para o estágio adulto não se alimentaram e adiam a busca por hospedeiros, até que as condições climáticas estejam favoráveis. Comumente, essa diapausa pode ser influenciada pelo fotoperíodo negativo, onde na estação de inverno os dias são mais curtos e as noites longas. Assim, os estágios que emergem da fase de ninfa nos meses de julho a setembro, nos países do hemisfério sul, tendem a adiar a busca por hospedeiros até os meses de chuva, de novembro a fevereiro (MADDER et al., 1999; RANDOLPH, 2008).

### 3.2.14 Ciclo Biológico

Pouco se sabe sobre os locais de replicação de *A. phagocytophilum* antes da infecção dos granulócitos do hospedeiro (WOLDEHIWET, 2010). Após a penetração na célula do hospedeiro, as bactérias desviam-se dos endossomos e se replicam em compartimentos da membrana citoplasmática. Esses compartimentos possuem características de autofagossomos, pois possuem bi-camada lipídica, onde os lisossomos não se fundem, favorecendo a infecção e replicação do agente no interior das células do hospedeiro, conseqüentemente, há formação de inclusões intracitoplasmáticas ou mórulas, observadas em microscopia óptica. Com isso, pode ser explicada a sobrevivência do agente no interior de neutrófilos, já que é uma célula de primeira linha de defesa contra patógenos (NIU et al., 2008).

Os neutrófilos são células que sobrevivem na corrente sanguínea de seis a 12 horas, no entanto com a presença de inflamação, sua meia vida aumenta (CARLYON; FIKRIG, 2003). Scaife et al. (2003), analisaram amostras de neutrófilos de ovelhas que estavam ou não infectadas e observaram que as células foram cultivadas por 22 horas. Os autores associaram esse fato à taxa de apoptose dos neutrófilos infectados significativamente menor que a dos neutrófilos não infectados. Esse retrocesso é fundamental para a replicação do agente, pois a bactéria possui uma baixa taxa de crescimento (CARLYON; FIKRIG, 2003).

Alguns trabalhos têm demonstrado o envolvimento de tecidos e órgãos como pulmão, baço e medula óssea no processo de replicação primária do agente e também durante o processo da doença (WALKER; DUMLER, 1996; LEPIDI et al., 2000). Munderloh et al. (2004), demonstraram a capacidade da

bactéria infectar células endoteliais de *Macaca mulatta* e bovinos in vitro. Com isso, levantou-se a hipótese de que essas células podem estar envolvidas no estabelecimento da infecção, tanto aquelas infectadas quanto as células apresentadoras de antígeno.

Por ocorrer apenas transmissão transestadial, os carrapatos se infectam durante o repasto sanguíneo nos hospedeiros mamíferos infectados. Esses organismos são disseminados pela hemolinfa dos vetores e mantidos pelos três estádios dos carrapatos (TELFORD et al., 1996; OGDEN et al., 1998; ZHI et al., 2002). Como não há registros de transmissão transovariana, as larvas não transmitem as bactérias aos hospedeiros vertebrados (ZHI et al., 2002; RIKIHISA, 2011).

### **3.2.15 Patogenia da infecção por *A. phagocytophilum* nos equinos**

Com base de que o equilíbrio das respostas imunes pró e anti-inflamatórias dos hospedeiros são responsáveis pelos sinais clínicos e por alterações hematológicas observadas na Anaplasmosse Granulocítica Equina (AGE), Davies et al. (2011), realizaram um estudo em equinos experimentalmente infectados divididos em dois grupos: tratados com Dexametasona 40 mg entre os dias 4 e 8 após a infecção e não tratados. Os animais de ambos os grupos, se apresentaram positivos para *A. phagocytophilum* pelos testes RT-PCR e microscopia óptica, a partir do quarto dia de infecção, permanecendo até o 12º dia. Apesar de não ter sido observadas diferenças nas contagens de células infectadas durante o pico de bacteremia entre os grupos, a carga bacteriana ao longo de todo o curso da doença foi maior para o grupo dos animais tratados. Foi observado que todos os animais apresentaram os mesmos sinais clínicos como: anorexia moderada, letargia, relutância em mover e icterícia, entretanto os animais que foram tratados apresentaram edema dos membros menos pronunciado e mais tardiamente.

É de conhecimento que a produção de citocinas pró-inflamatórias têm total participação no mecanismo de desenvolvimento de algumas alterações como hipertermia, neutropenia, trombocitopenia e lesão tecidual de animais e seres humanos infectados, devido a resposta pró-inflamatória modulada por

linfócitos Th1, com grande produção de interferon gama (INF- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interleucina 8 (IL-8) (LEPIDI et al., 2000; KIM et al., 2002; CHOI et al., 2007; DAVIES et al., 2011). Entretanto, Davies et al. (2011), não observaram alterações significativas das citocinas pró-inflamatórias em animais tratados. Já nos animais não tratados, observou-se redução das citocinas anti-inflamatórias apenas no sétimo dia pós-infecção. Levando em conta as citocinas (IL-10 e INF- $\gamma$ ), os animais que foram tratados apresentaram uma diminuição da resposta pró-inflamatória entre os dias quatro e nove. Esses achados mostram que a modulação da resposta inflamatória pelo uso de dexametasona não foi capaz de promover uma diminuição significativa das alterações hematológicas encontradas durante o curso da doença.

Um estudo realizado com 45 equinos soropositivos para *Ehlichia equi* (= *A. phagocytophilum*), durante aproximadamente um ano, demonstrou que na fase aguda da doença, uma primeira sorologia apresentou 20 animais negativos e 19 positivos. Após oito meses da fase aguda, os testes foram repetidos apresentando apenas seis soronegativos. Os animais foram monitorados até 15 meses após a fase aguda, onde verificou-se que todos apresentaram uma titulação mais elevada um mês após do pico de bacteremia, tornando-se soronegativos oito meses após a infecção, independente da duração dos sinais clínicos. Os animais que tiveram resultados soropositivos apresentaram infecção subclínica ou estado de coalescência (ARTURSSON et al., 1999).

Já em um estudo conduzido nos EUA, inoculou-se em um cavalo saudável, uma cepa que estava infectando um roedor silvestre, e observou-se que esta cepa não teve a capacidade de provocar doença clínica no animal. Pois, não foram encontradas mórulas nas células, o animal não apresentou sororeatividade e não foi detectado DNA de *A. phagocytophilum* no sangue (FOLEY et al., 2008).

### **3.2.16 Sinais clínicos**

A infecção por *A. phagocytophilum* nos equinos geralmente se apresenta de forma aguda e raramente subclínica. Quando a doença se apresenta de forma aguda, o período de incubação é de aproximadamente

10 dias, sendo que os primeiros sinais clínicos observados, são inespecíficos, como apatia, febre alta ou diminuição da temperatura corporal (GRIBBLE, 1969; MADIGAN, 1993; BARLOUGH et al., 1995). Logo após esse período, tem sido observado sinais voltados com a locomoção, como o andar rígido, claudicação, edema doloroso da articulação metacarpo e edema do tecido subcutâneo persistindo por 2 semanas após a regressão completa dos demais sinais (MADIGAN; GRIBBLE, 1987; ADASZEK et al., 2009; SILAGHI et al., 2011a).

Outros sinais comumente observados com a evolução da doença são: hemorragia de mucosas, perda de peso, taquicardia, taquipneia, diarreia, vômitos, artrite, e sinais neurológicos, como convulsões e paralisia. No entanto, a trombocitopenia é o distúrbio mais específico, que resulta no aparecimento de petéquias nas mucosas. Não se sabe ao certo, que mecanismo proporciona essa diminuição de plaquetas, mas sugere-se que seja por destruição imunomediada, fagocitose por macrófagos e diminuição da produção na medula óssea (LEPIDI et al., 2000; ADASZEK; WINIARCZYK, 2011).

Além disso, os valores hematológicos podem revelar leucocitose ou leucopenia com neutropenia e diminuição do volume globular, podendo acarretar em possíveis infecções secundárias (DUMLER et al., 2001a; DAVIES et al., 2011). Nas análises bioquímicas, o aumento da concentração de bilirrubina total, ureia e creatinina também foram observados (REUBEL et al., 1998; LEPIDI et al., 2000; ADASZEK et al., 2009; SILAGHI et al., 2011a).

Em equinos acima de três anos de idade tem sido observado sinais de febre por 6-12 dias e inchaço dos membros. Em animais jovens, a doença se apresenta com sinais inespecíficos, como falta de apetite e dificuldade em se mover. O desenvolvimento dos sinais clínicos, depende da idade dos animais que se infectam e das condições corporais que os animais se encontram (MADIGAN; GRIBBLE, 1987).

Os sinais clínicos nos seres humanos são similares aos equinos, caracterizado por um súbito início de hipertermia, cefaleia, mialgia e artralgia. Alguns pacientes apresentam tosse, náuseas, vômitos, diarreia, dores abdominais e anorexia. A infecção pode proporcionar maiores complicações como: coagulação intravascular disseminada (CID), dificuldade respiratória,

neuropatia periférica, pancreatite, rabdomiólise, além de choque séptico pela infecção (OTEO; BROUQUI, 2005; MEZERVILLE; PADILLA-CUADRA, 2007).

### 3.2.17 Epidemiologia

O entendimento da dinâmica da AGE é bem complexa, e deve ser compreendida devido a duas condições: (a) a presença de uma espécie de hospedeiro vertebrado susceptível ao agente, e que o mesmo tenha a capacidade de promover altas bacteremias suficientes para o vetor infectar-se durante o seu repasto sanguíneo; (b) capacidade do carrapato de se infectar e manter a infecção por longos períodos, mesmo em situações climáticas adversas, podendo disseminar o agente à novos hospedeiros vertebrados (SWANSON et al., 2006).

A intensa presença do homem ao meio natural em favor do crescimento populacional, pode levar à importantes alterações nos ciclos biológicos por afetar diretamente as comunidades de hospedeiros invertebrados e vertebrados silvestres (De LA FUENTE et al., 2004; SWANSON et al., 2006).

Interações entre vetores-patógenos-hospedeiros podem ser consideradas fatores de riscos para o desenvolvimento de doenças em determinadas localidades (De LA FUENTE et al., 2005; SWANSON et al., 2006). De fato, as alterações de origem antrópica podem modificar as relações parasita-hospedeiro resultando em variações antigênicas e no aumento da virulência de *A. phagocytophilum* (SWANSON et al., 2006; FOLEY et al., 2008). Essa variação antigênica, é considerada um dos principais mecanismos de evasão da resposta imunológica do hospedeiro (SWANSON et al., 2006; FOLEY et al., 2008). Ainda, considera-se como fator de risco a introdução de animais que já estejam infectados ou que já se encontram doentes, em grupos de animais saudáveis (ALMEIDA FILHO; ROUQUAYROL, 2006).

Esses fatores em conjunto, favorecem a emergência de doenças nos animais e seres humanos, como a anaplasiose granulocítica, podendo desencadear um problema de saúde pública nas diversas regiões onde o agente está presente (De LA FUENTE et al., 2004; TELFORD III & GOETHERT, 2004; FOLEY et al., 2008; GRANQUIST et al., 2010a).

Existem poucos trabalhos que relatam a prevalência de *A. phagocytophilum* em animais no Brasil. Santos et al. (2011), detectaram por meio de métodos moleculares, uma prevalência de 7,1% em cães no estado do Rio de Janeiro. Em equinos do centro-oeste, foi encontrada uma soroprevalência de 65% dos animais amostrados (SALVAGNI et al., 2010). Em ovinos, no estado do Rio de Janeiro, por meio da PCR, foi detectada a prevalência de 6,7% de animais infectados (VELHO, 2013), enquanto em Pernambuco, foi encontrada uma soroprevalência de 12,8% em pequenos ruminantes (RAMOS et al., 2008). De acordo com Santos et al. (2013), não se pode considerar o Brasil como um país endêmico para *A. phagocytophilum*, uma vez que os estudos realizados são isolados e a amostragem não é representativa.

Alguns levantamentos por detecção sorológica e molecular da ocorrência de *A. phagocytophilum* em equinos, podem ser observados na Tabela 3:

**Tabela 3.** Levantamento de ocorrência sorológica e molecular de *Anaplasma phagocytophilum* em equinos no mundo.

Países	Diagnóstico Sorológico	Diagnóstico Molecular	Referências
	<i>Anaplasma phagocitophilum</i>	<i>Anaplasma phagocitophilum</i>	
Polônia	-	2,63%	Slivinska et al. (2015)
Eslováquia	-	2,56%	Slivinska et al. (2015)
Centro da Itália	89%	14,76%	Veronesi et al. (2014)
Portugal	13%	-	Ribeiro et al. (2013)
Itália	13,7%	6,7%	Laus et al. (2013)
Sicília (Itália)	9,0%	4,7%	Giudice et al. (2012)
República Tcheca	73%	-	Praskova et al. (2011)
Centro da Itália	17,03%	8,14%	Passamonti et al. (2010)
Dinamarca	22,3%	-	Hansen et al. (2010)
Coréia	2,9%	0%	Lee et al. (2015)
Tunísia	16,3%	-	Ben Said et al. (2014)
Japão	3,4%	-	Ybañez et al. (2012)
Ilhas Jeju (Coréia)	2,2%	-	Chae et al. (2009)
Paraná (Brasil)	2,1%	-	Vieira et al. (2016)
Goiás (Brasil)	65%	0%	Salvagni et al. (2010)

### 3.2.18 Métodos de diagnóstico

O diagnóstico normalmente se dá pela análise do histórico clínico. Entretanto, os sinais clínicos apresentados pelos animais, nem sempre são específicos podendo ser confundidos com outras doenças. Portanto, faz-se necessária a associação com os testes laboratoriais de diagnósticos (AGUERO-ROSENFELD, 2002; AMUSATEGUI et al., 2006).

#### 3.3.9.1 Diagnóstico direto

Os esfregaços sanguíneos corados com Diff-Quick, Wright ou Giemsa detectam a presença de mórulas de *A. phagocytophilum* (corpos de inclusão de coloração azul escuro ou violeta) no segundo ao quarto dia após a infecção no citoplasma dos neutrófilos, e, às vezes, em eosinófilos (GRIBBLE, 1969; SELLS et al., 1976; BARLOUGH et al., 1995; PUSTERLA et al., 1998; DZIEGIEL et al., 2013). No entanto, tem sido descrito que mórulas em neutrófilos pode variar de 1 a 6%, podendo atingir até 16%, caracterizando desvantagem com o uso de esfregaços sanguíneos (BERRINGTON et al., 1996; ŁUKASZEWSKA et al., 2008; UEHLINGER et al., 2011). Além de também ocorrer o desenvolvimento de mórulas de outros patógenos nos neutrófilos como *Ehrlichia ewingii* e *E. ruminantum* (ŁUKASZEWSKA et al., 2008; O'NION et al., 2015).

Stuen et al. (2011), relataram a confecção de lâminas com capa leucocitária, coradas pela técnica de Romanovsky, Giemsa ou May-Grumwald-Giemsa, sendo lidas em aumento de 1.000 vezes. No entanto, Aguero-Rosenfeld (2002), afirma que o teste utilizando capa leucocitária pode apresentar baixa sensibilidade (~60%), apesar de possuir alta especificidade.

#### 3.3.9.2 Diagnóstico molecular

O método de diagnóstico molecular, por ser um teste mais sensível e que pode diferenciar *A. phagocytophilum* de outros possíveis patógenos, também permite que a doença seja diagnosticada na fase aguda (BARLOUGH et al., 1995; ADASZEK; WINIARCZYK, 2011). O material a ser utilizado no teste compreende o sangue total, capa leucocitária, medula óssea e fragmentos de baço, tecidos vasculares, hepáticos e pulmonares (GRANQUIST et al., 2010b; SEN et al., 2011; DZIEGIEL et al., 2013).



Os primers mais utilizados na detecção de *A. phagocytophilum* em equinos são aqueles direcionados ao gene 16S rRNA (mais conservado devido à infrequência de mutações) (ADASZEK et al., 2009; ADASZEK; WINIARCZYK, 2011). Entretanto, diversos autores têm ressaltado, que, assim como em outros genes (por exemplo, groEL, msp2, msp4 e Anka), o gene 16S rRNA apresenta variações, tanto entre as espécies de animais como também entre os carrapatos ixodídeos (VON LOEWENICH et al., 2003; ALBERTI et al., 2005; De LA FUENTE et al., 2005; SILAGHI et al., 2008; SCHARF et al., 2011; SILAGHI et al., 2011b).

### 3.3.9.3 Diagnóstico sorológico

Uma terceira alternativa para o diagnóstico são os métodos sorológicos, considerados menos significativos do que os outros dois métodos citados, mas que serve como um excelente suporte ao diagnóstico clínico (AGUERO-ROSENFELD et al., 2000). Tratando-se da detecção sorológica de anaplasose granulocítica podem ser utilizados o ensaio de ELISA e a RIFI (ZIMMERMAN; CRISMAN, 2008).

O método que tem sido mais utilizado por médicos veterinários, é o ELISA, entretanto possui como desvantagem a incapacidade de detectar o estágio agudo da infecção (MAGNARELLI et al., 2001). É o teste imunológico mais sensível e versátil que utiliza anticorpos conjugados a enzimas e antígenos ou anticorpos ligados a um suporte sólido. São observadas mudanças na atividade enzimática durante a reação que 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 RIFI é uma técnica que possui alta sensibilidade e especificidade, além de rápida execução. O teste se baseia na detecção de anticorpos contra epítomos dos agentes, podendo ser utilizadas culturas celulares de *A. phagocytophilum* oriundos de animais infectados natural ou experimentalmente (FERREIRA; CARVALHO, 1973; JONGEJAN et al., 1989; ARTURSSON et al., 1999; ZIMMERMAN; CRISMAN, 2008). Trabalhos soroepidemiológicos realizados para *A. phagocytophilum*, normalmente são utilizadas esta técnica, devido sua praticidade, rapidez e baixo custo

(ZIMMERMAN; CRISMAN, 2008; HANSEN et al., 2010; SALVAGNI et al., 2010; PRASKOVA et al., 2011).

### 3.2.19 Rickettsias do grupo Febre Maculosa em equinos

#### 3.2.20 Agente etiológico

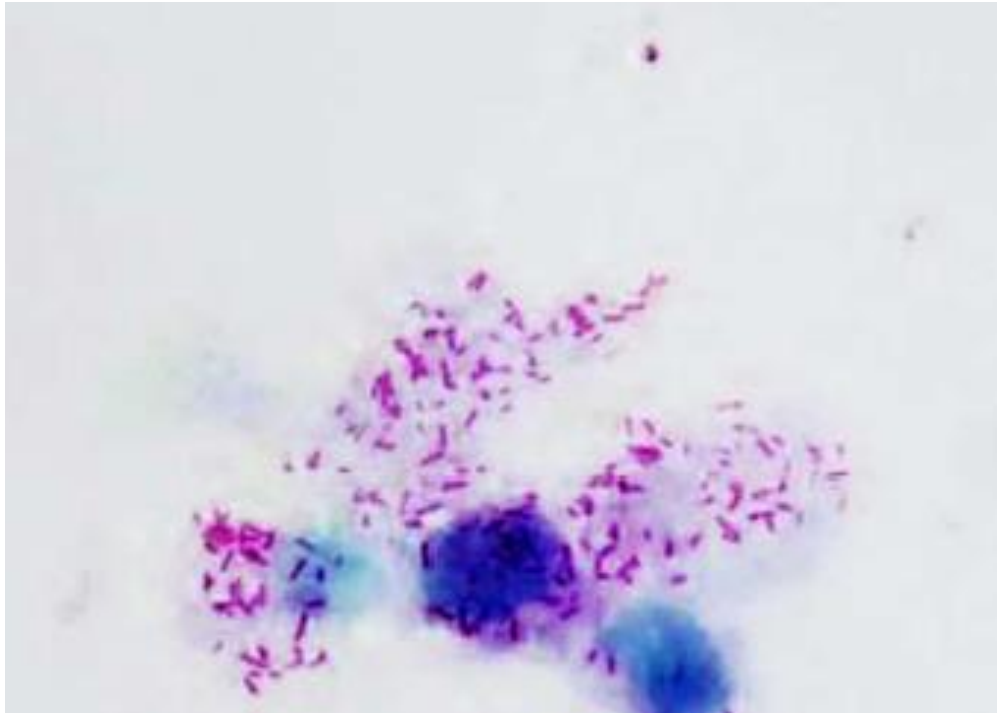
As doenças acometidas por organismos do gênero *Rickettsia* estão bem distribuídas por todo o mundo, seja em regiões endêmicas como não endêmicas (AZAD; BEARD, 1998). No continente americano, as principais espécies causadoras da Febre Maculosa (FM) em humanos, são: *Rickettsia rickettsii*, *R. africae* (espécie exótica), *R. akari* e *R. felis* (LABRUNA, 2006). A espécie *Rickettsia rickettsii* foi descrita pela primeira vez nos EUA, sendo conhecida como Rocky Mountain spotted fever (RMSF), e isolada no início do século XX pelo pesquisador Howard Taylor Ricketts, onde estabeleceu a importância do carrapato da espécie *Dermacentor andersoni* na transmissão (RICKETTS, 1909).

As riquetsias são bactérias intracelulares obrigatórias que se multiplicam no citoplasma das células de seus hospedeiros e, em se tratando do grupo da FM, podem ser encontradas no núcleo da célula. São pequenos cocobacilos Gram negativos de aproximadamente 0,3 x 1µm. Sua parede celular é semelhante à de outras bactérias, sendo constituída por lipopolissacarídeos. O genoma é extremamente conservado e formado por um único cromossomo circular e pequeno. Esses organismos possuem duas principais proteínas de superfície, OmpA, relacionada apenas ao grupo FM e OmpB, presente em todas as riquetsias. (WALKER, 2007; CHEN; SEXTON, 2008).

Até a década de 2004, apenas a espécie *R. rickettsii* foi incriminada como o agente etiológico da Febre Macula Brasileira (FMB) transmitida por carrapato no Brasil (LABRUNA, 2009), com ocorrências confirmadas de letalidade em alguns estados, especialmente na cidade de Campinas (ANGERAMI et al., 2006). Entretanto, nos últimos 15 anos, oito novas espécies transmitidas por carrapatos foram relatadas no Brasil (ALMEIDA et al., 2011; LABRUNA et al., 2011b; NIERI-BASTOS et al., 2014; 2018; KARPATY et al., 2016; MURRAY et al., 2016; LUZ et al., 2018).

As espécies de *Rickettsia* (Rickettsiaceae) estão classificadas em quatro grupos: (i) grupo da Febre Maculosa (FM), associados a carrapatos e compostos pelas espécies: *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyommatis*, *R. rhipicephali*, 'Candidatus *R. andeanae*', *Rickettsia* sp. cepa Colombianensi, *Rickettsia* sp. cepa Pampulha; (ii) grupo Tifo, composto por *R. prowazekii* e *R. typhi*, associado a piolhos e pulgas, respectivamente; (iii) o grupo de Transição, composto por agentes associados principalmente a pulgas, ácaros e carrapatos; e (iv) o grupo Basal, formado por organismos associados a uma variedade de hospedeiros, como carrapatos, sanguessugas, insetos, protozoários e plantas, e sendo representadas pelas espécies: *R. bellii* e *R. monteiroi* (ALMEIDA et al., 2011; LABRUNA et al., 2011b; NIERI-BASTOS et al., 2014; 2018; KARPATY et al., 2016; MURRAY et al., 2016; LUZ et al., 2018).

A espécie *R. rickettsii* é considerada o agente mais patogênico causador da RMSF nos EUA e FMB no Brasil (PAROLA et al., 2013) (Figura 3). No Brasil, a ocorrência de FM nos seres humanos, têm sido confirmadas nas regiões Sul e Sudeste e sendo transmitida por carrapatos da espécie *A. sculptum* (*A. cajennense*) (SZABÓ et al., 2013). No entanto, relatos recentes mostram que a espécie *R. parkeri* é outro agente patogênico associado a FMB, e está representado pelas cepas *R. parkeri* sensu stricto, associada aos carrapatos *A. triste* e *A. tigrinum*, e *R. parkeri* cepa da Mata Atlântica, associada ao *A. ovale* (FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2018; NIERI-BASTOS et al., 2018). A última cepa é considerada um agente emergente de FMB, sendo que três casos têm sido confirmados nos estados de São Paulo (SPOLIDORIO et al., 2010), Bahia (SILVA et al., 2011) e Santa Catarina (KRAWCZAK et al., 2016). Ainda, Faccini-Martínez et al. (2018), sugere que outros casos ocorridos em seres humanos por *R. parkeri*, possam estar sendo diagnosticados, pois tem sido observado essa espécie infectando carrapatos *A. ovale* em outras regiões do país.



**Figura 3.** Lâmina de cultivo celular positivo para *Rickettsia rickettsii*, corada com Giemsa (aumento de 1.000x) - isolamento a partir de carrapatos *A. sculptum* (*A. cajennense*) infectado (UENO, 2014).

### 3.2.21 Vetores

No Brasil, o carrapato *Amblyomma sculptum* (*Amblyomma cajennense*) é a principal espécie responsável pela transmissão de *R. rickettsii* aos animais domésticos e aos seres humanos (SZABÓ et al., 2013). No entanto, as espécies *A. aureolatum* e *Rhipicephalus sanguineus* também têm sido descritos como importantes vetores dos agentes na região metropolitana de São Paulo (LABRUNA, 2006; LABRUNA, 2009; PAROLA et al., 2013).

A espécie *A. sculptum* (*A. cajennense*) está distribuída apenas no continente americano. É um carrapato trioxeno que pode parasitar uma ampla diversidade de mamíferos domésticos e silvestres (ARAGÃO, 1936; ESTRADA-PEÑA et al., 2004). Possui uma predileção maior por equinos, capivaras, antas e eventualmente suídeos silvestres onde são considerados hospedeiros primários para os estágios dos carrapatos (LABRUNA et al., 2001; VERONEZ et al., 2010), além de ser uma espécie que mais têm infestado os seres humanos no Brasil (ARAGÃO, 1936; GUGLIELMONE et al., 2006).

Essa espécie realiza apenas uma geração por ano na região Sudeste do Brasil, sendo que larvas normalmente predominam entre a estação outono e inverno, as ninfas no inverno e primavera e os adultos se mantêm na primavera e verão (LABRUNA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2003). Essa sincronização dos estágios é regulada pelo comportamento de diapausa que as larvas realizam, ou seja, mesmo se a eclosão ocorra antes do previsto, elas esperam até o período de abril ou maio para a busca por hospedeiros. Pois na região sudeste há mudanças na temperatura e no fotoperíodo entre o primeiro e o segundo semestre (LABRUNA et al., 2002; CABRERA; LABRUNA, 2009).

Alguns fatores de risco relacionados as pastagens e a sanidade de equinos, podem contribuir favoravelmente a um aumento do parasitismo de *A. sculptum*, pois relatos mostram a presença de mais de 10.000 carrapatos infestando naturalmente apenas um animal (LABRUNA et al., 2001; 2002; PIRES et al., 2013).

Outras espécies de carrapatos estão associadas a transmissão das riquetsias em alguns países do continente americano, como: *D. andersoni*, *D. variabilis*, *A. americanum* nos EUA, *R. sanguineus* no Canadá, *D. andersoni* e *A. imitator* no México, *Haemaphysalis leporispalustris* na Costa Rica, *D. nitens* no Panamá, *R. sanguineus* e *A. sculptum* (*A. cajennense*) no Panamá, Colômbia, Argentina e Brasil (LABRUNA et al., 2011a; PAROLA et al., 2013).

### **3.2.22 Hospedeiros**

Nas áreas rurais do Brasil, os cães e os cavalos têm sido considerados como hospedeiros sentinelas para infecções por *R. rickettsii*, que são transmitidos por *A. sculptum* e *R. parkeri*, por *A. ovale* (SANGIONI et al., 2005; BARBIERI et al., 2014). Os equinos são os principais hospedeiros para todos os estágios do carrapato *A. sculptum*, já que essa espécie tem preferência maior por cavalos (LABRUNA et al., 2002). Especialmente os equinos são considerados refratários da infecção por *R. rickettsii*, por não apresentarem alterações clínicas, hematológicas ou bioquímicas, nem a bacteremia investigada por PCR em tempo real ou por inoculação de sangue de cavalo infectado em cobaias (UENO et al., 2016). Ainda, UENO et al. (2016), mostraram que os equinos experimentalmente infectados com *R.*

*rickettsii* apresentaram anticorpos anti-*R. rickettsii* até 2 anos após a infecção. Os autores concluíram que cavalos infectados por *R. rickettsii*, além de não manifestarem doença, não são hospedeiros amplificadores competentes de *R. rickettsii* para carrapatos da espécie *A. sculptum*.

Já os cães podem atuar como hospedeiros amplificadores de *R. rickettsii* para carrapatos da espécie *R. sanguineus*, pois em condições experimentais alguns cães rickettsêmicos apresentaram febre alta em um período de 6 a 11 dias, além de apresentarem titulações elevadas de *R. rickettsii* (32.768 a 65.536) (PIRANDA et al., 2008; 2011). Esses achados mostram que maiores concentrações de riquetsias no sangue dessa espécie, resulta em maiores taxas de infecção por carrapatos vetores (PIRANDA et al., 2011).

Quando se trata de animais silvestres, as capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) e gambás (*Didelphis aurita*) vem sendo reportados como hospedeiros amplificadores de *R. rickettsii* para os carrapatos vetores da espécie *A. sculptum*, encontrado frequentemente parasitando esses animais, em especial as capivaras (HORTA et al., 2009; SOUZA et al., 2009; LABRUNA, 2009). Entretanto, o papel dessas espécies de hospedeiros silvestres na epidemiologia dependerá de uma alta taxa de reprodução das mesmas garantindo uma disponibilidade constante de novas capivaras susceptíveis que desenvolverão ricketsemias (POLO et al., 2017; 2018).

### 3.2.23 Transmissão

Os reservatórios naturais para *R. rickettsii*, são os carrapatos da espécie *A. sculptum*, pois conseguem manter os agentes por sucessivas gerações em transmissão transtadial e transovariana (MCDADE; NEWHOUSE, 1986; SOARES et al., 2012). Entretanto, tem sido observado que o mecanismo de transmissão transovariana ocorre em menos de 50% das fêmeas ingurgitadas, além de ser ineficiente para a manutenção das bactérias na natureza (PIRANDA et al., 2011; SOARES et al., 2012; COSTA et al., 2020). Ainda, há evidências de que *R. rickettsii* é patogênica para o vetor, o que conseqüentemente diminui sua capacidade reprodutiva (SOARES et al., 2012). Essas características são evidenciadas pela diminuição de carrapatos infectados naturalmente, não atingindo 2% mesmo

presente nas regiões endêmicas (GUEDES et al., 2005; 2011; SANGIONI et al., 2005; PACHECO et al., 2009; KRAWCZAK et al., 2014; LABRUNA et al., 2017).

Alguns autores relatam que *A. sculptum*, é uma espécie refratária às infecções, pois parte dos vetores conseguem adquirir as bactérias quando se alimentam de animais que estejam riquetsêmicos, diferente do *A. aureolatum*, que sua taxa de infecção atinge 100% (LABRUNA et al., 2008; SOARES et al., 2012; GERARDI et al., 2019). Portanto, o sucesso na circulação dos agentes em algumas regiões, se dá devido a presença de algum hospedeiro vertebrado que apresente bacteremias satisfatórias para infectar outros carrapatos (MCDADE; NEWHOUSE, 1986; LABRUNA, 2009; SOUZA et al., 2009; SOARES et al., 2012; BARBIERI et al., 2014; POLO et al., 2017).

Apesar das causas serem desconhecidas, o período de maior incidência de casos de FMB ocorre no período de predominância das ninfas (DIAS; MARTINS, 1939; ANGERAMI et al., 2012; BRITES-NETO et al., 2013), e tem sido constatado que ninfas e adultos possuem uma capacidade maior de transmitir *R. rickettsii* do que as larvas (SOARES et al., 2012).

Ainda, tem sido relatados dois métodos de obtenção de riquetsias pelos carrapatos: Transmissão sexual dos machos às fêmeas que não estiverem infectadas. No entanto, este método não tem se propagado, uma vez que fêmeas infectadas de forma venérea não têm a capacidade de transmitir riquetsias de forma transovariana (SCHRIEFER et al., 1994; PAROLA et al., 2005). Um segundo método de obtenção de riquetsias pelos carrapatos, consiste na co-alimentação, ou seja, quando um alto número de carrapatos se alimenta em locais muito próximos em um mesmo hospedeiro, conforme demonstrado na espécie *R. rickettsii* pelo carrapato *D. andersoni* (PHILIP, 1959).

### **3.2.24 Ciclo Biológico**

Após o repasto sanguíneo, os organismos seguem até o lúmen do intestino do carrapato e invadem suas células epiteliais, onde ocorre as primeiras replicações. Entretanto, os intestinos são as primeiras barreiras para a aquisição dos patógenos (NUTTALL; LABUDA, 2004), pois apesar de ser considerado um ambiente desfavorável aos agentes, não sofrem ataques

de enzimas digestivas, porque são organismos intracelulares (BELMONTE et al., 2012; FOGAÇA et al., 1999; NAKAJIMA et al., 2002; SONENSHINE et al., 2005). De fato, o intestino é considerado o órgão mais importante para a sobrevivência dos organismos, pois necessitam persistir ainda que seja um ambiente hostil (HAJDUŠEK et al., 2013; SONENSHINE et al., 2005). Os agentes seguem invadindo a hemocele e por meio da hemolinfa, atinge todos órgãos do carrapato (BURGDORFER; BRINTON, 1975; MCDADE; NEWHOUSE, 1986; MACALUSO et al., 2001). Logo após, invadem as glândulas salivares e novamente se replicam pela última vez até a posterior transmissão dos patógenos pela saliva durante o repasto sanguíneo (FUTSE et al., 2003; LÖHR et al., 2002; PAROLA et al., 2005; SANTOS et al., 2002).

No hospedeiro vertebrado, os agentes infectam as células do endotélio e as paredes dos vasos sanguíneos (FLICEK, 2007; BLANTON, 2013) e invadem o citoplasma, secretando enzimas para que a membrana fagossomal seja rompida, e assim deixando-a livremente no citoplasma. A multiplicação das bactérias ocorre lentamente pelo mecanismo de fissão binária. O sucesso da disseminação dos agentes as células, ocorre por um mecanismo de indução da célula hospedeira a polimerizar actina, onde será utilizada pelas riquetsias para se deslocarem em direção ao núcleo ou as células próximas (WALKER, 2007; CHEN; SEXTON, 2008).

### **3.2.25 Patogenia das riquetsioses**

As bactérias causadoras da FMB, possui um tropismo por células endoteliais de pequenos ou médios vasos sanguíneos, e um baixo número dessas células podem ser livremente encontradas na circulação sanguínea, principalmente quando se trata de doença leve (GEORGE et al., 1993). Com a multiplicação desses organismos nas células, ocorrerá vasculites ou até mesmo a formação de trombos e necrose (WOLBACH, 1919), conseqüentemente dando início a possíveis alterações clínicas e laboratoriais (CHEN; SEXTON, 2008).

Comumente, tem sido observado o aparecimento de edemas e pontos hemorrágicos nos seres humanos e animais infectados (SAMMONS et al., 1976; CHEN; SEXTON, 2008). Entretanto, um dos principais sinais observados provocados pelas bactérias são, aumento da permeabilidade dos



vasos, provocada pela ruptura da junção entre as células do endotélio, formação de lacunas entre as células, formação de fibras de estresse e mudança do formato poligonal das células endoteliais para fusiforme. Os mecanismos de lesão, ainda não estão totalmente compreendidos, pois estima-se que pode estar relacionado com a liberação de citocinas, espécies reativas de oxigênio ou ações citotóxicas das células T (WALKER, 2007).

### 3.2.26 Sinais clínicos

Os sinais clínicos observados na RMSF e na FMB são similares, no entanto a doença de ocorrência nos seres humanos no Brasil, apresenta-se de maneira mais severa e com maiores chances de letalidade (ANGERAMI et al, 2006). Mas com o desenvolvimento e uso de antibióticos contra o agente, a taxa de letalidade caiu de aproximadamente 80% para 40% em São Paulo e Minas Gerais (DIAS; MARTINS, 1939; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014b). Angerami et al. (2012), observou uma maior taxa de letalidade em uma região onde há, a presença do carrapato *A. aureolatum* em relação a outra região onde o *A. sculptum* (*A. cajennense*), é o vetor, entretanto essas diferenças ainda não foram detectadas.

Os principais sinais clínicos observados nos seres humanos com FMB, são: vômito, dor de cabeça e abdominal, febre, mialgia, hemorragias, exantema, icterícia, dificuldade respiratória, alterações do sistema nervoso central e insuficiência renal aguda. Quando realizado hemograma completo e bioquímico, os sinais mais observados são: trombocitopenia e aumento das enzimas hepáticas alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase (ANGERAMI et al., 2006).

Cavalos infectados experimentalmente por via intraperitoneal e através de infestações com carrapatos infectados com *R. rickettsii* não apresentaram alterações clínicas, hematológicas ou bioquímicas no sangue. Esses animais se mostraram soropositivos entre 10 dias a 2 anos após a infecção. Interessantemente, apesar de alguns carrapatos que parasitavam esses animais se apresentarem positivos ao teste molecular, os mesmos não apresentaram competência vetorial para transmitir os agentes aos coelhos (UENO et al., 2016).

Em condições experimentais, foi observado que cães têm menos susceptibilidade em relação aos primatas, podendo desenvolver sinais moderados ou até mesmo uma cura espontânea. Entretanto têm sido observado em ambas as espécies, sinais de anorexia, febre, letargia, emagrecimento, desidratação, aumento de linfonodos, hiperemia, petéquias e equimoses em mucosas e pele, hiperemia de saco escrotal, edema, petéquias, máculas, necrose ou úlceras, edemas de epidídimo e prepúcio, secreção ocular, congestão de esclera, conjuntivite, hemorragias oculares, uveíte, opacidade de córnea, quemose, secreção nasal, tosse, epistaxe, broncopneumonia, oligúria ou anúria, constipação, melena, convulsão, inclinação de cabeça, coma, pulso acelerado, hipotermia, cianose e choque (SAMMONS et al., 1976; KEENAN et al., 1977; PIRANDA et al., 2008). Dentre as alterações hematológicas e bioquímicas, observou-se diminuição da contagem de hemácias, concentração de hemoglobina e volume globular, trombocitopenia, leucopenia no início da enfermidade evoluindo para leucocitose com desvio à esquerda, neutrofilia, linfopenia, eosinopenia, monocitose, granulação tóxica em neutrófilos, aumento de enzimas hepáticas (fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase), aumento de bilirrubinas, colesterol, ureia e creatinina e queda da proteína total (SAMMONS et al., 1976; KEENAN et al., 1977; PIRANDA et al., 2008).

As cobaias (*Cavia porcellus*) são espécies muito utilizadas em modelos experimentais, por se mostrarem bem suscetíveis a infecções por *R. rickettsii*, apresentar uma letalidade alta e manifestar alterações clínicas características da doença, como: febre, necrose de escroto, coxins e ponta de orelha, hiperemia e hemorragias cutâneas, lesões oculares, trombocitopenia e congestão esplênica (RICKETTS, 1909; MOE et al., 1976; COSTA et al., 2020). Já nos coelhos domésticos, sua letalidade diminui com relação as cobaias, entretanto são bastante utilizados em experimentos, já que os sinais clínicos são iguais às cobaias (WOLBACH, 1919; MOREIRA; MAGALHÃES, 1935; MAGALHÃES, 1952).

### **3.2.27 Epidemiologia**

No Brasil, desde a sua primeira descrição em 1932 por Piza, na ocorrência de “Tifo exantemático” no estado de São Paulo, a FMB tem sido

associada a alta letalidade em humanos. Um estudo de distribuição de casos, comparou áreas urbanas e suburbanas, sendo observado que 95% dos casos ocorreram nas áreas dominadas por florestas, mas casos nativos também têm sido relatados nos centros urbanos (SONENSHINE, 1972; PAROLA et al., 2005).

Desde que um número de ocorrência de casos da FMB aumentaram, a doença passou a ser de notificação obrigatória no Brasil, a partir de 2001. E, entre as décadas de 1997 a 2014, foram notificadas ocorrências em 16 estados de todas as regiões (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014a). No entanto, ainda não se pode afirmar que todos esses casos estão associados à infecção por *R. rickettsii*, já que o diagnóstico é com base em ensaios sorológicos (PAROLA et al., 2013). Mas a região Sudeste, é a grande responsável pelo maior número de casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014a). E comumente, os casos surgem de forma esporádica e isolada (DIAS & MARTINS, 1939).

*Rickettsia parkeri* é uma recente espécie descoberta que também está associada a FMB, podendo ser transmitida pelo *A. triste*, *A. tigrinum*, e *A. ovale* (FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2018; NIERI-BASTOS et al., 2018). Alguns estados brasileiros, têm registrado a ocorrência de FMB por *R. parkeri*, sugerindo que possíveis casos em seres humanos por essa espécie possam estar ocorrendo (SPOLIDORIO et al., 2010; SILVA et al., 2011; SILVEIRA et al., 2015; KRAWCZAK et al., 2016; FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2018).

Levantamentos epidemiológicos realizados com equinos mostraram que a letalidade é muito baixa, diferentemente do que é observado nos seres humanos, reforçando a ideia de que essa espécie pode ser considerada como reservatório e sentinela da infecção, como é o caso das capivaras, gambás e porquinhos-da-Índia (HORTA et al., 2009; LABRUNA, 2009; SOUZA et al., 2009; SOARES et al., 2012; BARBIERI et al., 2014; UENO et al., 2016). De fato, vários autores mostram que o cavalo pode ser considerado sentinela da infecção de *Rickettsia* spp. devido a sua longa e ótima resposta imunológica frente as bactérias, indicando a possível circulação das riquetsias em outras espécies de hospedeiros susceptíveis, como os humanos, nas regiões onde o vetor *A. sculptum* está presente (HORTA et al., 2004; SANGIONI et al., 2005, LABRUNA, 2009; UENO et al.,

2016). Os Tabelas 4 e 5 mostram, levantamentos soroepidemiológicos de equinos em regiões endêmicas e não endêmicas no Brasil, com altas e baixas soropositividades para *R. rickettsii*, respectivamente:

**Tabela 4.** Levantamento de ocorrência sorológica de cavalos com *Rickettsia rickettsii* em locais notificados para Febre Maculosa brasileira.

MUNICÍPIO	PREVALÊNCIA SOROLÓGICA	REFERÊNCIAS
Pedreira - SP	77,8%	Lemos et al. (1996)
Pedreira - SP	77,3%	Horta et al. (2004)
Pedreira - SP	90,0%	
Mogi das Cruzes - SP	40,0%	Horta et al. (2007)
Piracicaba - SP	85,0%	
São Paulo - SP	36,8%	
Caratinga - MG	16,7%	Cardoso et al. (2006)
Itabira - MG	100,0%	Vianna et al. (2008)
Pindo d'Água - MG	38,1%	Milagres et al. (2010)
Santa Cruz do Escalvado - MG	15,2%	
Juiz de Fora - MG	41,0%	Pacheco et al. (2011)
Colatina, Ecoporanga, Nova Venécia, Santa Leopoldina, São Mateus e Vila Valério - ES	25,9%	Spolidorio et al. (2010)
São José dos Pinhais – PR	9,3%	Freitas et al. (2010)

Adaptado por Ueno, (2014).

**Tabela 5.** Levantamento de ocorrência sorológica de cavalos com *Rickettsia rickettsii* em locais sem notificação de Febre Maculosa brasileira.

MUNICÍPIO	PREVALÊNCIA SOROLÓGICA	REFERÊNCIAS
Porto Feliz, Cotia e Pirassununga - SP	0,0%	Sangioni et al. (2005)
Pirassununga – SP	19,0%	Horta et al. (2007)
Almirante Tamandaré - PR	8,5%	Batista et al. (2010)
Londrina – PR	5,5%	Tamekuni et al. (2010)
Londrina – PR	38,5%	Toledo et al. (2011)
Douradina, Umuarama e Arapongas – PR	5,3%	Otomura et al. (2010)

Adaptado por Ueno, (2014).

### 3.2.28 Métodos de diagnóstico

Sabe-se que as riquetsias possuem um curto período de riquetsemia em alguns hospedeiros vertebrados, dificultando assim o diagnóstico final de FMB (LABRUNA, 2009; BLANTON, 2013; UENO et al., 2016). Entretanto, alguns testes de diagnóstico estão disponíveis, na tentativa de detectar possíveis suspeitas do agente infectando animais ou os seres humanos (LA SCOLA; RAOULT, 1997; DASH; EREMEEVA, 2006).

#### 3.4.9.1 Diagnóstico sorológico

O diagnóstico final da FMB na maioria das vezes, se dá por meio de ensaios sorológicos, como: Weil-Felix, fixação de complemento, teste de aglutinação, Imunoblot, ELISA e RIFI (LA SCOLA; RAOULT, 1997). Mas, vale lembrar que quando se trata de doenças riquetsiais, as evidências sorológicas das infecções ocorrerão a partir da segunda semana, quando forem analisadas em amostras pareadas. Desta forma, a detecção estará disponível após a recuperação ou até mesmo a morte do paciente (LA SCOLA; RAOULT, 1997; DASH; EREMEEVA, 2006).

RIFI é um método considerado padrão-ouro para o diagnóstico da FMB, sendo recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), pois, trata-se de anticorpos IgG reagirem com antígenos específicos de riquetsias (GALVÃO et al., 2005; FLICEK, 2007). Entretanto, o diagnóstico precoce da

doença pode ser limitado por esse teste, devido aos anticorpos não serem detectados em menos de 7 a 10 dias de infecção (GALVÃO et al., 2005; DANTAS-TORRES, 2007). Além de possíveis reações cruzadas entre as espécies de riquetsias ocorrerem, já que se trata de diagnóstico sorológico (PAROLA; RAOULT, 2001; GALVÃO et al., 2005; PAROLA et al., 2013).

Quando utilizado como diagnóstico final da FMB, alguns trabalhos mostram que para considerar a espécie específica de *Rickettsia*, a titulação deve apresentar pelo menos quatro vezes maior que o título para qualquer outro antígeno, ou genótipo intimamente relacionado (HORTA et al., 2004; PIRANDA et al., 2008). Sendo assim, a detecção em cavalos infectados em condições naturais, ocorrerão em raras ocasiões ou quando a titulação final for mais alta, sendo necessário o uso de outras técnicas para detectar as espécies envolvidas, como a absorção cruzada (HORTA et al., 2004; UENO et al., 2016).

Outra técnica pouco reconhecida, mas que pode ser utilizada, é a Imunohistoquímica, onde utilizam-se cortes de tecidos ligados a anticorpos anti-riquetsias. Um estudo avaliando uma série de casos com fatalidade, ocorridos no passado, mostra a importância desta ferramenta para diagnosticar FMB em pacientes humanos (PADDOCK et al., 1999).

#### **3.4.9.2 Diagnóstico molecular**

O uso da ferramenta molecular, no diagnóstico da FMB, é considerado limitada, pois apesar do ensaio de PCR em tempo real ser considerado mais sensível do que a PCR convencional, ambos os testes possuem baixa sensibilidade na detecção do DNA de *Rickettsia* spp. em amostras de sangue (BLANTON, 2013). Dessa forma, seu uso na detecção das bactérias, se restringe apenas a biópsias de pele, tecidos oriundos de necropsia ou carrapatos (PAROLA et al., 2005; DANTAS-TORRES, 2007; CHEN; SEXTON, 2008).

Os principais marcadores utilizados para diagnóstico das bactérias do grupo FM, são para os genes *ompA*, *ompB*, onde codificam proteínas de membrana externa; gene que codifica a proteína de 17kDa (*htrA*); para o fragmento que amplifica o gene citrato sintase (*gltA*) e para o gene D (*SCA4*) (TZIANABOS et al., 1989; REGNERY et al., 1991; EREMEEVA et al., 1994;

PAROLA; RAOULT, 2001; SANGIONI, 2003; LABRUNA et al., 2004; GUEDES et al., 2005; LABRUNA et al., 2005; PAROLA et al., 2005; SANGIONI et al., 2005).

### **3.4.9.3 Diagnóstico direto**

O isolamento das bactérias a partir do seu cultivo é o diagnóstico mais confiável para a detecção das bactérias do grupo FM. No entanto, além deste método ser mais complexo e demandar mais tempo até o isolamento, também possui limitações, como: Exigência de laboratórios com nível de biossegurança NB3 e a não possibilidade de um diagnóstico precoce (MARRERO; RAOULT, 1989; NASCIMENTO, 2003; PAROLA et al., 2005; BRASIL, 2009).

Desde a década de 30, este método é muito utilizado por possibilitar um aumento considerável do número de espécies de riquétsias e poder proporcionar grandes quantidades das bactérias, facilitando a confecção de antígenos para utilização nos métodos de diagnóstico indireto (NIGG & LANDSTEINER, 1932; LABRUNA, 2006).

O teste de hemolinfa nos carrapatos, utilizando a coloração verde Malaquita, também têm sido optados em muitos trabalhos epidemiológicos, principalmente na tentativa de isolamento de espécies de *Rickettsia* (GIMENEZ, 1964; BURGDORFER, 1970; LABRUNA et al., 2004; PINTER; LABRUNA, 2006).

#### 4. REFERENCIAS

ABEL, I. S.; MARZAGÃO, G.; YOSHINARI, N. H.; SCHUMAKER, T. T. S. *Borrelia*-like Spirochetes recovered from ticks and small mammal collected in the Atlantic Forest Reserve, Cotia county, state of Sao Paulo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 95 p. 621-624, 2000.

ADASZEK, L.; WINIARCZYK, S.; LUKASZEWSKA, J. A first case of ehrlichiosis in a horse in Poland. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, v. 116. p. 330–334, 2009.

ADASZEK, L.; WINIARCZYK, S. Identification of *Anaplasma* spp. *rickettsia* isolated from horses from clinical disease cases in Poland. Zoonoses Public Health, v. 58, p. 514–518, 2011.

AGUERO-ROSENFELD, M. E.; KALANTARPOUR, F.; BALUCH, M.; HOROWITZ, H. W.; MCKENNA, D. F.; RAFFALLI, J. T.; HSIEH, T. C.; WU, J.; DUMLER, J. S.; WORMSER, G. P. Serology of culture-confirmed cases of human granulocytic ehrlichiosis. Journal of Clinical Microbiology, v. 38, p. 635-638, 2000.

AGUERO-ROSENFELD, M. E. Diagnosis of human granulocytic Ehrlichiosis: State of art. Vector Borne and Zoonotic Diseases, v.2, p. 233-240, 2002.

AGUERO-ROSENFELD, M. E.; WANG, G.; SCHWARTZ, I.; WORMSER, G. P. Diagnosis of Lyme Borreliosis. CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, p. 484–509, July. 2005.

ALBERTI, A.; ZOBBA, R.; CHESSA, B.; ADDIS, M. F.; SPARAGANO, O.; PARPAGLIA, M. L. P.; CUPEDDU, T.; PINTORI, G.; PITTAU, M. Equine and Canine *Anaplasma phagocytophilum* strains isolated on the island of Sardinia



(Italy) are phylogenetically related to pathogenic strains from the United States. *Appl Env Microbiol*, v. 71, p. 6418-6422, 2005.

ALBY, K.; CAPRARO, G. A. Alternatives to Serologic Testing for Diagnosis of Lyme Disease. *Clin Lab Med*. 35(4):815-25, Dec. 2015.

ALEKSHUN, M.; KASHLEV, M.; SCHWARTZ, I. Molecular cloning and characterization of *Borrelia burgdorferi* rpoB. *Gene*, v. 186, n. 2, p. 227–235, 1997.

ALLEMAN, A. R.; WAMSLEY, H. L. An update on anaplasmosis in dogs. *Veterinary Medicine*, v.103, n.4, p.212-214, 2008.

ALMEIDA, H. B. Sincronização do estro e dinâmica folicular de éguas crioulas submetidas a tratamentos com Norgestomet, Acetato de Melengestrol e Altrenogest. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 100p. 2001.

ALMEIDA FILHO, N.; ROUQUAYROL, M. Z. Introdução à epidemiologia 4 ed. revisada e ampliada. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 282p. 2006.

ALMEIDA, A. P.; CUNHA, L. M.; BELLO, A. C.; DA CUNHA, A. P.; DOMINGUES, L. N.; LEITE, R. C.; LABRUNA, M. B. A novel *Rickettsia* infecting *Amblyomma dubitatum* ticks in Brazil. *Ticks Tick Borne Dis*. 2, 209–212. 2011.

ALVES ADA, S.; MELO, A. L.; AMORIM, M. V.; BORGES, A. M.; GAÍVA E SILVA, L.; MARTINS, T. F.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M.; PACHECO, R. C. Seroprevalence of *Rickettsia* spp. in Equids and Molecular Detection of 'Candidatus *Rickettsia amblyommii*' in *Amblyomma cajennense* Sensus Lato Ticks from the Pantanal Region of Mato Grosso, Brazil. *J Med Entomol*. 1;51(6):1242-7, Nov. 2014.

AMUSATEGUI, I.; SAINZ, A.; TESOURO, M. A. Serological evaluation of *Anaplasma phagocytophilum* infection in livestock in northwestern Spain. *Annals of the New York Academy of Science*, v. 1078, p. 487–490, 2006.

ANDERSON, J. F.; MAGNARELLI, L. A.; LEFEBVRE, R. B.; ANDREADIS, T. G.; MCANINCH, J. B.; PERNG, G. C.; JOHNSON, R. C. Antigenically variable *Borrelia burgdorferi* isolates from cottontail rabbits and *Ixodes dentatus* in rural and urban areas. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 27, p. 13-20, 1989.

ANDRÉ, M. R. Diversity of *Anaplasma* and *Ehrlichia/Neoehrlichia* Agents in Terrestrial Wild Carnivores Worldwide: Implications for Human and Domestic Animal Health and Wildlife Conservation. *Front Vet Sci*. 23; 5: 293, Nov. 2018.

ANGERAMI, R. N.; RESENDE, M. R.; FELTRIN, A. F. C.; KATZ, G.; NASCIMENTO, E. M.; STUCCHI, R. S. B.; SILVA, L. J. Brazilian Spotted Fever: A Case Series from an Endemic Area in Southeastern Brazil Clinical Aspects. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1078, p. 252-254, 2006.

ANGERAMI, R. N.; CÂMARA, M.; PACOLA, M. R.; REZENDE, R. C.; DUARTE, R. M.; NASCIMENTO, E. M.; COLOMBO, S.; SANTOS, F. C.; LEITE, R. M.; KATZ, G.; SILVA, L. J. Features of Brazilian spotted fever in two different endemic areas in Brazil. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, v. 3, n. 5-6, p. 346-348, Dec. 2012.

ARAGÃO, H. B. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrofes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 31, n. 4, p. 759-843, out. 1936.

ARTURSSON, K.; GUNNARSSON, A.; WIKSTRÖM, U. B.; ENGVALL, E. O. A serological and clinical follow-up in horses with confirmed equine granulocytic ehrlichiosis. *Equine Vet J*. 31(6):473-477, 1999.

ASCH, E. S.; BUJAK, D. I.; WEISS, M.; PETERSON, M. G.; WEINSTEIN, A. Lyme disease: an infectious and post infection syndrome. *J Rheumatol.* 21:454-461, 1994.

AZAD, A. F.; BEARD, C. B. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. *Emerging Infectious Diseases*, v. 4, p. 179-186, 1998.

BAKKEN, J. S.; DUMLER, J. S. Human granulocytic ehrlichiosis. *Clin. Infect. Dis.*, v. 31, p. 554-560, 2000.

BAKKEN, J. B. & DUMLER, J. S. Human granulocytic anaplasmosis. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 29, 341–355, 2015.

BARBIERI, A. R.; FILHO, J. M.; NIERI-BASTOS, F. A.; SOUZA JR, J. C.; SZABÓ, M. P.; LABRUNA, M. B. Epidemiology of *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest in a spotted fever-endemic area of southern Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.* 5(6):848-53, Oct. 2014.

BARLOUGH, J. E.; MADIGAN, J. E.; DEROCK, E.; DUMLER, J. S.; BAKKEN, J. S. Protection against *Ehrlichia equi* is conferred by prior infection with the Human granulocytotropic ehrlichia (HGE agent). *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, p. 3333–3334, 1995.

BARROS P. J. L. Caracterização clínica e laboratorial da doença de Lyme no Brasil, através de métodos imunológicos e reação em cadeia de polimerase. 2000. 163 f. Tese (Doutorado em Medicina) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2000.

BARROS-BATTESTI, D. M. Estudos de carrapatos e pequenos mamíferos silvestres naturalmente infectados com espiroquetas semelhantes à *Borrelia*, no município de Itapevi, estado de São Paulo. Tese Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP. 116p., 1998.

BARROS-BATTESTI, D. M.; YOSHINARI, N. H.; BONOLDI, V. L. N.; GOMES, A. C. Parasitism by *Ixodes didelphidis* and *I. loricatus* (Acari: Ixodidae) on Small Wild Mammals from an Atlantic Forest in the State of Sao Paulo, Brazil. *Journal of Medical Entomology*, v. 37, n. 6, p. 820-927, 2000.

BASILE, R. C.; YOSHINARI, N. H.; MANTOVANI, E.; BONOLDI, V. L. N.; MACORIS, D. G.; QUEIROZ-NETO, A. Brazilian borreliosis with special emphasis on humans and horses. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 48, n. 1, p. 167-172, Jan./Mar. 2017.

BAPTISTA, C. M. Diagnose de infecção pelo protozoário *Theileria equi* em cavalos no Açores por cELISA e nested- PCR. Dissertação. (Mestrado em engenharia zootécnica). Açores, Universidades dos Açores, 2010.

BATISTA, F. G.; Da SILVA, D. M.; GREEN, K. T.; TEZZA, L. B. L.; VASCONCELOS, S. P.; CARVALHO, S. G. S.; SILVEIRA, I.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M. B.; FORTES, F. S.; MOLENTO, M. B. Serological survey of *Rickettsia* sp. in horses and dogs in an non-endemic area in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 19, n. 4, p. 205-209, out.-dez. 2010.

BELMONTE, R.; CRUZ, C. E.; PIRES, J. R.; DAFFRE, S. Purification and characterization of Hb 98- 114: a novel hemoglobin-derived antimicrobial peptide from the midgut of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Peptides*. 2012; 37:120–7.

BEN SAID, M.; BELKAHIA, H.; HENI, M. M.; BOUATTOUR, A.; GHORBEL, A.; GHARBI, M.; ZOUARI, A.; DARGHOUTH, M. A.; MESSADI, L. Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in well maintained horses from northern Tunisia. *Tropical Biomedicine*, v. 31, p. 432–440, 2014.

BENNETT, C. E. Ticks and Lyme disease. *Advances in Parasitology*, v. 36, p. 343-405, 1995.

BERRADA, Z. L.; TELFORD, S. R. Burden of tick-borne infections on American companion animals. *Top Companion Anim Med.* 24(4):175-81. 3rd. Nov. 2009.

BERRINGTON, A.; MOATS, R.; LESTER, S. A case of *Ehrlichia equi* in an adult horse in British Columbia. *Canadian Veterinary Journal*, v. 37, p. 174–175, 1996.

BLANTON, L. S. Rickettsial infections in the tropics and in the traveler. *Curr Opin Infect Dis.* 26:435–40, 2013.

BOSLER, E. M.; COHEN, D. P.; SCHULZE, T. L.; OLSEN, C.; BERNARD, W.; LISSMAN, B. Host responses to *Borrelia burgdorferi* in dogs and horses. *Annals New York Academy of Sciences*, v. 539, p. 221-233, 1988.

BOWN, K. J.; BEGON, M.; BENNETT, M.; WOLDEHIWET, Z.; OGDEN, N. H. Seasonal dynamics of *Anaplasma phagocytophila* in a rodent-tick (*Ixodes trianguliceps*) system, United Kingdom. *Emerging Infectious Diseases*, v. 9, p. 63–70, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 7ed. Brasília: Ministério da Saúde, 816p, 2009.

BRASIL - Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. 8 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 444p. 2010.

BRITES-NETO, J.; NIERI-BASTOS, F. A.; BRASIL, J.; DUARTE, K. M.; MARTINS, T. F.; VERÍSSIMO, C. J.; BARBIERI, A. R.; LABRUNA, M. B. Environmental infestation and rickettsial infection in ticks in an area endemic for Brazilian spotted fever. *Rev Bras Parasitol Vet.* 22(3):367-72. Jul-Sep. 2013.

BRETTSCHEIDER, S.; BRUCKBAUER, H.; KLUGBAUER, N.; HOFMANN, H. Diagnostic value of PCR for detection of *Borrelia burgdorferi* in skin biopsy and urine samples from patients with skin borreliosis. J. Clin. Microbiol. 36:2658-2665. 1998.

BROOKS, J. B. B.; SILVA, C.; SOUZA, C. S.; XAVIER, G.; KAI, H. H.; KAI, M. R. Doença de Baggio-Yoshinari e acometimento neurológico. Relato de caso. Hansen Int. 37(1): 91-92. 2012.

BROWNING, A.; CARTER, S. D.; BARNES, A.; MAY, C.; BENNETT, D. Lameness associated with *Borrelia burgdorferi* infection in the horse. Veterinary Record, v. 132, p. 610-611, 1993.

BURGDORFER, W. The hemolymph test. Am. J. Trop. Med. Hyg. 19:1010–1014. 1970.

BURGDORFER, W.; BRINTON, L. P. Mechanisms of transovarial infection of spotted fever rickettsiae in ticks. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 266, p. 61-72, 1975.

BURGDORFER, W.; BARBUR, A. G.; HAYES, S. F. Lyme disease: a tick-borne spirochetosis? Science, v. 216, p. 1317-1319, 1982.

BURGDORFER, W. Discovery of *Borrelia burgdorferi*, p. 3-7. In: Coyle P.K. Lyme Disease. Mosby Year Book, Boston, 1993.

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

BURGESS, E. C.; MATTISON, M. Encephalitis associated with *Borrelia burgdorferi* infection in a horse. Journal of the American Veterinary Medical Association, v. 191, p. 1457-1458, 1987.

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

CABRERA, R. R.; LABRUNA, M. B. Influence of photoperiod and temperature on the larval behavioral diapause of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). Journal of Medical Entomology, v. 46, n. 6, p.1303-1309, Nov. 2009.

CAINE, J. A.; COBURN, J.; MORRISON, R. P. A short-term *Borrelia burgdorferi* infection model identifies tissue tropisms and blood stream survival conferred by adhesion proteins. Infect Immun 83:3184–3194, 2015.

CAINE, J. A.; COBURN, J. Multifunctional and redundant roles of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins in tissue adhesion, colonization, and complement evasion. Front Immunol 7:442–452, 2016.

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

CAMPOS, C. H. C.; PRADO, R. F. S.; CORDEIRO, M. D.; FONSECA, A. H.; MAFRA, C. L.; MASSARD, C. L. Soroprevalência de *Borrelia* spp. em equinos de uso militar do município de São Borja, Estado do Rio Grande do Sul. 2015. [http://www.infoteca.inf.br/conbravet/smarty/templates/arquivos\\_template/upload\\_arquivos/acervo/525.pdf](http://www.infoteca.inf.br/conbravet/smarty/templates/arquivos_template/upload_arquivos/acervo/525.pdf). Accessed 20 Out 2016.

CAMPOS, J. B. V.; ANDRÉ, M. R.; GONÇALVES, L. R.; FRESCHI, C. R.; SANTOS, F. M.; De OLIVEIRA, C. E.; PIRANDA, E. M.; De ANDRADE, G. B.; MACEDO, G. C.; MACHADO, R. Z.; HERRERA, H. M. Assessment of equine piroplasmids in the Nhecolândia sub-region of Brazilian Pantanal wetland using serological, parasitological, molecular, and hematological approaches. Ticks Tick Borne Dis. 10(3):714-721, Apr, 2019.

CARDOSO, L. D.; FREITAS, R. N.; MAFRA, C. L.; NEVES, C. V. B.; FIGUEIRA, F. C. B.; LABRUNA, M. B.; GENNARI, S. M.; WALKER, D. H.; GALVÃO, M. A. M. Caracterização de *Rickettsia* spp. circulantes em foco silencioso de febre maculosa brasileira no Município de Caratinga, Minas Gerais, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 22, n. 3, p. 495-501, mar. 2006.

CARLYON, J. A.; FIRKING, E. Invasion and survival strategies of *Anaplasma phagocytophilum*. *Cellular Microbiol.*, v.5, p.743-754, 2003.

CASJENS, S.; PALMER, N.; VAN VUGT, R. A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Molecular Microbiology*, v. 35, p. 490-516. 2000.

Centro de Segurança Alimentar e Saúde Pública. Fichas técnicas: Glanders. [Acessado em 20 de junho de 2008]; URL de 2007: <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo>.

CEPEA. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. Estudo do Complexo do Agronegócio Cavalos. Piracicaba. 2006.

CERAR, T.; RUZIC-SABLJIC, E.; GLIZEK, U.; ZORE, A.; STRLE, F. Comparison of PCR methods and culture for the detection of *Borrelia* sp. in patients with erythema migrans. *Clin Microbiol Infec.* 14: 653-8, 2008.

CHAE, J. S.; HEO, E. J.; PARK, J. H.; CHOI, K. S.; DUMLER, J. S.; LEE, S. S.; KANG, T. Y.; YANG, J. H.; KIM, D. Y.; KIM, J. G. Detection of antibodies reacting with *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis* from cats, horses and cattle in Korea. *Journal of Veterinary Clinics*, v. 26, p. 515–519, 2009.

CHANG, Y.; NOVOSOL, V.; MCDONOUGH, S. P.; CHANG, C. F.; JACOBSON, R. H.; DIVERS, T.; QUIMBY, F. W.; SHIN, S.; LEIN, D. H.



Vaccination against lyme disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface protein A (rOspA) in horses. *Vaccine*. 14;18(5-6):540-8, Oct. 1999.

CHANG, Y. F.; NOVOSOL, V.; MCDONOUGH, S. P.; CHANG, C. F.; JACOBSON, R. H.; DIVERS T.; QUIMBY, F. W.; SHIN, S.; LEIN, D. H. Experimental infection of ponies with *Borrelia burgdorferi* by exposure to Ixodid ticks. *Veterinary Pathology*, v. 37, p. 68-76, 2000.

CHANG, Y. F.; KU, Y. W.; CHANG, C. F.; CHANG, C. D.; MCDONOUGH, S. P.; DIVERS, T.; POUGH, M.; TORRES, A. Antibiotic treatment of experimentally *Borrelia burgdorferi*-infected ponies. *Vet Microbiol*. 20;107(3-4):285-94, May. 2005.

CHEN, S. M.; DUMLER, J. S.; BAKKEN, J. S.; WALKER, D. H. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 32, p. 589–595, 1994.

CHEN, L. F.; SEXTON, D. What's new in Rock Mountain spotted fever? *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 22, n. 3, p. 415-432, Sept. 2008.

CHOI, K. S.; WEBB, T.; OELKE, M.; SCORPIO, D. G.; DUMLER, J. S. Differential innate immune cell activation and proinflammatory response in *Anaplasma phagocytophilum* infection. *Infect Immun*. 75(6):3124-3130, 2007.

COHEN, N. D.; COHEN, D. Borreliosis in horses: a comparative review. *The Compendium*, v. 12, p. 1449-1458, 1990.

COOK, M. J. Lyme borreliosis: a review of data on transmission time after tick attachment. *Int J Gen Med*. 19; 8:1-8, Dec. 2014.

CORDEIRO, M. D.; De MEIRELES, G. S.; Da SILVA, J. B.; De SOUZA, M. M. S.; DA FONSECA, A. H. Soroprevalência para *Borrelia* spp. em cães no

município de Seropédica, estado do Rio de Janeiro. Rev. Bras. Med. Vet., 34(3):251-256, jul/set 2012.

CORDEIRO, M. D.; BAHIA, M.; MAGALHÃES-MATOS, P. C.; CEPEDA, M. B.; GUTERRES, A.; FONSECA, A. H. Morphological, molecular and phylogenetic characterization of *Borrelia theileri* in *Rhipicephalus microplus*. Rev Bras Parasitol Vet. 27(4):555-561, Oct-Dec. 2018.

CORRÊA F. N. Pesquisa de Anticorpos Homólogos anti-*Borrelia burgdorferi* em Búfalos (*Bubalus bubalis*) do Estado do Pará. 2007. 51f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2007.

CORRÊA, F. N. Estudo Epidemiológico de *Borrelia burgdorferi*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em Búfalos (*Bubalus bubalis*) do Estado do Rio de Janeiro. 2011. 116f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2011.

COSTA, I. P.; YOSHINARI, N. H.; BARROS, P. J.; BONOLDI, V. L.; LEON, E. P.; ZEITUNE, A. D.; COSSERMELLI, W. [Lyme disease in Mato Grosso do Sul State, Brazil: report of three clinical cases, including the first of Lyme meningitis in Brazil]. Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo. 51(6):253-7, Nov-Dec. 1996.

COSTA, I. P. Pesquisa de anticorpos anti-*Borrelia* e do agente etiológico, em soro e líquido de pacientes com manifestações clínicas compatíveis com a Doença de Lyme, no Estado de Mato Grosso do Sul. 1998. 125f. Tese (Doutorado em Medicina) – Universidade de São Paulo, São Paulo. 1998.

COSTA, I. P.; BONOLDI, V. L. N.; YOSHINARI, N. H. Perfil clínico e laboratorial da Doença de Lyme-símile no Estado de Mato Grosso do Sul: análise de 16 pacientes. Rev Bras Reumatol 41: 142-150, 2001.

COSTA, F. B.; GERARDI, M.; BINDER, L. C.; BENATTI, H. R.; SERPA, M. C. A.; LOPES, B.; LUZ, H. R.; FERRAZ, K. M. P. M. B.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia rickettsii* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Infecting *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) Ticks and Capybaras in a Brazilian Spotted Fever-Endemic Area of Brazil. J Med Entomol. 9;57(1):308-311, Jan. 2020.

DANTAS-TORRES, F. Rocky Mountain spotted fever. Lancet Infect. Dis. 7:724–32, 2007.

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.

DASH, G. A.; EREMEEVA, M. E. Laboratory diagnosis of rocky mountain spotted fever and other rickettsioses in the Americas: contemporary approaches and prospects for future improvements. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA E II SIMPÓSIO LATINOAMERICANO DE RICKETTSIOSE, 14., 2006, Ribeirão Preto-SP. Anais... Ribeirão Preto: 2006.

DAVIES, R. S.; MADIGAN, J. E.; HODZIC, E.; BORJESSON, D. L.; DUMLER, J. S. Dexamethasone-induced cytokine changes associated with diminished disease severity in horses infected with *Anaplasma phagocytophilum*. Clin Vaccine Immunol. 18(11):1962-1968, 2011.

De ALMEIDA, E. A.; Dos SANTOS, M. A. A.; AFIUNE, J. B.; SPADA, D. T. A.; DE MELO, F. A. F. Sputum culture yield: comparing an automated diagnostic system to Löwenstein-Jensen medium in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. J Bras Pneumol 31(3): 231-6, 2005.

De LA FUENTE, J.; NARANJO, V.; RUIZ-FONS, F.; VICENTE, J.; ESTRADA-PEÑA, A.; ALMAZÁN, C.; KOCAN, K. M.; MARTÍN, M. P.; GORTÁZAR, C. 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. *European Journal of Wildlife Research*, v. 50, p. 187–196, 2004.

De LA FUENTE, J.; MASSUNG, R. F.; WONG, S. J.; CHU, F. K.; LUTZ, H.; MELI, M.; VON LOEWENICH, F. D.; GRZESZCZUK, A.; TORINA, A.; CARACAPPA, S.; MANGOLD, A. J.; NARANJO, V.; STUEN, S.; KOCAN, K. M. Sequence analysis of the *msp4* gene of *Anaplasma phagocytophilum* strains. *J Clin Microbiol*, v. 43, p. 1309-1317, 2005.

De MEEUS, T.; LORIMIER, Y.; RENAUD, F. Lyme borreliosis agents and the genetics and sex of their vector, *Ixodes ricinus*. *Microbes and Infection*, v. 6, p. 299-304, 2004.

De OLIVEIRA, P. B.; HARVEY, T. V.; FEHLBERG, H. F.; ROCHA, J. M.; MARTINS, T. F.; Da ACOSTA, I. C. L.; LABRUNA, M. B.; FACCINI, J. L. H.; ALBUQUERQUE, G. R. Serologic and molecular survey of *Rickettsia* spp. in dogs, horses and ticks from the Atlantic rainforest of the state of Bahia, Brazil. *Exp Appl Acarol*. 78(3):431-442, Jul. 2019.

DIAS, E.; MARTINS, A. V. Spotted fever in Brazil: a summary. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 19, n.2, p.103-108, Mar. 1939.

DICKINSON, F. O.; BATTLE, M. C. Lyme borreliosis. *The Infections Diseases Review*, v.2, p.23-26, 2000.

DIVERS, T.; CHANG, Y. F.; MCDONOUGH, P. L. Equine Lyme disease: a review of experimental disease production, treatment efficacy, and vaccine protection. In: 49th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, November, 2003. New Orleans, Louisiana: American Association of Equine Practitioners, 2003.

DIVERS, T. J.; GRICE, A. L.; MOHAMMED, H. O.; GLASER, A. L.; WAGNER, B. Changes in *Borrelia burgdorferi* ELISA antibody over time in

both antibiotic treated and untreated horses. *Acta Vet Hung.* 60(4):421-9, Dec. 2012.

DORWARD, D. W.; SCHWAN, T. G.; GARON C. F. Immune capture and detection of *Borrelia burgdorferi* antigens in urine, blood, or tissue from infected ticks, mice, dogs and humans. *J. Clin. Microbiol.*, v. 26, p. 1162-1170, 1991.

DUMLER, J. S.; WALKER, D. H. Tick-borne ehrlichioses. *Lancet Infect Dis.* 1:21–8, 2001a.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 51, p. 2145–2165, 2001b.

DUGAN, V. G.; YABSLEY, M. J.; TATE, C. M.; MEAD, D. G.; MUNDERLOH, U. G.; HERRON, M. J.; STALLKNECHT, D. E.; LITTLE, S. E.; DAVIDSON, W. R. Evaluation of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) as natural sentinels for *Anaplasma phagocytophilum*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 6(2):192-207, Summer. 2006.

DUNNING HOTOPP, J. C.; LIN, M.; MADUPU, R.; CRABTREE, J.; ANGIUOLI, S. V.; EISEN, J. Á.; SESHADRI, R.; REN, Q.; WU, M.; UTTERBACK, T. R.; SMITH, S.; LEWIS, M.; KHOURI, H.; ZHANG, C.; NIU, H.; LIN, Q.; OHASHI, N.; ZHI, N.; NELSON, W.; BRINKAC, L. M.; DODSON, R. J.; ROSOVITZ, M. J.; SUNDARAM, J.; DAUGHERTY, S. C.; DAVIDSEN, T.; DURKIN, A. S.; GWINN, M.; HAFT, D. H.; SELENGUT, J. D.; SULLIVAN, A. S.; ZAFAR, N.; ZHOU, L.; BENAHMED, F.; FORBERGER, H.; HALPIN, R.; MULLIGAN, S.; ROBINSON, J.; WHITE, O.; RIKIHISA, Y.; TETTELIN, H.

Comparative genomics of emerging human ehrlichiosis agents. PLoS Genet, v. 2, e21, 2006.

DURDEN, L. A.; OLIVER, J. H.; KINSEY, A. A. Ticks (Acari: Ixodidae) and spirochetes (Spirochaetaceae: Spirochaetales) recovered from birds on a Georgia Barrier Island. Journal of Medical Entomology, v. 38, p. 231-236, 2001.

DZIEGIEL, B; ADASZEK, Ł; KALINOWSKI, M; WINIARCZYK, S. Equine granulocytic anaplasmosis. Res Vet Sci, v. 95, p. 316-20, 2013.

EGENVALL, A.; FRANZÉN, P.; GUNNARSSON, A.; ENGVALL, E. O.; VÅGSHOLM, I.; WIKSTRÖM, U. B.; ARTURSSON, K. Cross-sectional study of the seroprevalence to *Borrelia burgdorferi* sensu lato and granulocytic Ehrlichia spp. and demographic, clinical and tick-exposure factors in Swedish horses. Prev Vet Med. 1;49(3-4):191-208, May. 2001.

EISEN, L.; EISEN, R. J.; MUN, J.; SALKELD, D. J.; LANE, R. S. Transmission cycles of *Borrelia burgdorferi* and *B. bissettii* in relation to habitat type in northwestern California. J Vector Ecol. 34(1):81-91, Jun. 2009.

EISENDLE, K.; GRABNER, T.; ZELGER, B. Focus Floating Microscopy "Gold Standard" for Cutaneous Borreliosis? Am J Clin Pathol. 127:213-22, 2007.

EREMEEVA, M.; YU, X.; RAOULT, D. Differentiation among Spotted Fever Group Rickettsiae Species by Analysis of Restriction Fragment Length Polymorphism of PCR-Amplified DNA. Journal of Clinical Microbiology, v. 32, p. 803-810, 1994.

ESTRADA-PEÑA, A.; GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J. The distribution and ecological 'preferences' of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae), an ectoparasite of humans and other mammals in the Americas. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, v. 98, n. 3, p. 283-292, Apr. 2004.

EWING, C.; SCORPIO, A.; NELSON, D. R.; MOTHER, T. N. Isolation of *Borrelia burgdorferi* from saliva of the tick vector, *Ixodes scapularis*. Journal of Clinical Microbiology, v. 32, n. 3, p. 755-758, 1994.

FACCINI-MARTÍNEZ, A. A.; OLIVEIRA, S. V.; CERUTTI, C. JR.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia parkeri* spotted fever in Brazil: epidemiological surveillance diagnosis and treatment. J Health Biol Sci 6:299–312. 2018.

FALCO, R. C.; FISH, D.; PIESMAN, J. Duration of tick bites in a Lyme disease endemic area. Am J Epidemiol. 143(2):187–192, 1996.

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.

FIELDING, C. L.; HIGGINS, J. K.; HIGGINS, J. C.; MCINTOSH, S.; SCOTT, E.; GIANNITTI, F.; METE, A.; PUSTERLA, N. Disease associated with equine coronavirus infection and high case fatality rate. J Vet Intern Med. 29(1):307-10, jan. 2015.

FILGUEIRA, A. L.; TROPPE, B. M.; GONTIJO FILHO, P. P. Borreliose de Lyme. Rio Dermatol., 2: 4-5, 1989.

FINGERLE, V.; HAUSER, U.; LIEGL, G.; PETKO, B.; PREAC-MURSIC, V.; WILSKE, B. Expression of outer surface proteins A and C of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*. J Clin Microbiol. 33(7):1867-9, Jul. 1995.

FLICEK, B. F. Rickettsial and other tick-borne infections. Crit Care Nurs Clin North Am. 19:27–38, 2007.

FOGAÇA, A. C.; Da SILVA, P. I.; MIRANDA, M. T.; BIANCHI, A. G.; MIRANDA, A.; RIBOLLA, P. E.; DAFFRE, S. Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. J Biol Chem. 274:25330–4, 1999.

FOGGIE, A. Studies on tick-borne fever. Journal of General Microbiology. III: Proceedings, v–vi. 1949.

FOGGIE, A. Studies on the infectious agent of tick-borne fever. J. Pathol. Bacteriol, v. 63, p. 1–15, 1951.

FOLEY, J.; NIETO, N. C.; MADIGAN, J.; SYKES, J. Possible differential host tropism in *Anaplasma phagocytophilum* strains in the Western United States. Ann N Y Acad Sci. 1149:94-97, 2008.

FONSECA, A. H.; ISHIKAWA, M. M.; SOARES, C. O.; MASSARD, C. L.; YOSHINARI, N. H. Lyme borreliose serology in cattle in Brazil. Revista da Universidade Rural, Série Ciência da Vida, v. 18, n. 1/2, p.85-89, 1996.

FRANZÉN, P.; ASPAN, A.; EGENVALL, A.; GUNNARSSON, A.; ABERG, L.; PRINGLE, J. Acute clinical, hematologic, serologic, and polymerase chain reaction findings in horses experimentally infected with a European strain of *Anaplasma phagocytophilum*. J. Vet. Intern. Med. 9, 232–239, 2005.

FRANZÉN, P.; BERG, A. L.; ASPAN, A.; GUNNARSSON, A.; PRINGLE, J. Death of a horse infected experimentally with *Anaplasma phagocytophilum*. Vet Rec. 27;160(4):122-5, Jan. 2007.

FREITAS, M. C.; GRYCAJUK, M.; MOLENTO, M. B.; BONACIN, J.; LABRUNA, M. B.; PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; DECONTO, I.; BIONDO, A. W. Brazilian spotted fever in cart horses in a non-endemic area in Southern Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 19, n. 2, p. 130-131, Apr. June 2010.

FUNK, R. A.; PLEASANT, R. S.; WITONSKY, S. G.; REEDER, D. S.; WERE, S. R.; HODGSON, D. R. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* in Horses Presented for Coggins Testing in Southwest Virginia and Change in Positive Test Results Approximately 1 Year Later. J Vet Intern Med. 30(4):1300-4, Jul. 2016.



FUTSE, J. E.; UETI, M. W.; KNOWLES, D. P.; PALMER, G. H. Transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus microplus*: retention of vector competence in the absence of vector pathogen interaction. J Clin Microbiol. 41:3829–34, 2003.

GALO, K. R.; FONSECA, A. H.; MADUREIRA, R. C.; NETO, B. J. D. Frequência de anticorpos homólogos anti-*Borrelia burgdorferi* em equinos na mesorregião metropolitana de Belém, Estado do Pará. Pesq. Vet. Bras, v. 29, p. 229-232, 2009.

GALVÃO, M. A. M.; SILVA, L. J.; NASCIMENTO, E. M. M.; CALIC, S. B.; SOUSA, R.; BACELLAR, F. Riquetsioses no Brasil e Portugal: ocorrência, distribuição e diagnóstico. Revista Saúde Pública. v. 39, n. 5, p. 850-6, 2005.

GAVIÃO PRADO, L.; BASTOS, C. V.; PALHARES, M. S.; RIBEIRO, M. F. B.; SILVA, R. F.; SOUZA, C. C.; ZWEYGARTH, E.; SILVA FILHO, J. M. 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.

GEORGE, F.; BROUQUI, P.; BOFFA, M. C.; MUTIN, M.; DRANCOURT, M.; BRISSON, C.; RAOULT, D.; SAMPOL, J. Demonstration of *Rickettsia conorii*-induced endothelial injury in vivo by measuring circulating endothelial cells, thrombomodulin, and von Willebrand factor in patients with Mediterranean spotted fever. Blood. 1;82(7):2109-16, Oct. 1993.

GERARDI, M.; RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, A.; BINDER, L. C.; KRAWCZAK, F. S.; GREGORI, F.; LABRUNA, M. B. Comparative susceptibility of different populations of *Amblyomma sculptum* to *Rickettsia rickettsii*. Front. Physiol. 10: 653. 2019.

GERN, L.; RAIS, O. Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between cofeeding *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). Journal of Medical Entomology, v. 33, p. 189-192, 1996.

GIANNITTI, F.; DIAB, S.; METE, A.; STANTON, J. B.; FIELDING, L.; CROSSLEY, B.; SVERLOW, K.; FISH, S.; MAPES, S.; SCOTT, L.; PUSTERLA, N. Necrotizing Enteritis and Hyperammonemic Encephalopathy Associated with Equine Coronavirus Infection in Equids. *Vet Pathol.* 52(6):1148-56, Nov. 2015.

GIMENEZ, D. F. Staining Rickettsiae in yolk-sac cultures. *Stain Technology*, v. 39, p. 135-140, May. 1964.

GIUDICE, E.; GIANNETTO, C.; FURCO, V.; ALONGI, A.; TORINA, A. *Anaplasma phagocytophilum* seroprevalence in equids: a survey in Sicily (Italy). *Parasitol Res*, v. 111, p. 951-955, 2012.

GOLIGHTLY, M. G. Antibody assays. In: COYLE, P.K. (Ed.) *Lyme Disease*. Mosby Year Book: Boston, p.115-120, 1993.

GONÇALVES, D. D.; BENITEZ, A.; LOPES-MORI, F. M.; ALVES, L. A.; FREIRE, R. L.; NAVARRO, I. T.; SANTANA, M. A.; Dos SANTOS, L. R.; CARREIRA, T.; VIEIRA, M. L.; De FREITAS, J. C. Zoonoses in humans from small rural properties in Jataizinho, Parana, Brazil. *Braz J Microbiol.* 5;44(1):125-31, Apr. 2013.

GONÇALVES, D. D.; CARREIRA, T.; NUNES, M.; BENITEZ, A.; LOPES-MORI, F. M.; VIDOTTO, O.; De FREITAS, J. C.; VIEIRA, M. L. First record of *Borrelia burgdorferi* B31 strain in *Dermacentor nitens* ticks in the northern region of Parana (Brazil). *Braz J Microbiol.* 15;44(3):883-7, Jan. 2014.

GRANQUIST, E. G.; BÅRDSSEN, K.; BERGSTRÖM, K.; STUEN, S. Variant - and individual dependent nature of persistent *Anaplasma phagocytophilum* infection. *Acta Vet Scand.* 52(1):25, 2010a.

GRANQUIST, E. G.; ALEKSANDERSEN, M.; BERGSTRÖM, K.; DUMLER, S. J.; TORSTEINBØ, W. O.; STUEN, S. A morphological and molecular study of

*Anaplasma phagocytophilum* transmission events at the time of *Ixodes ricinus* tick bite. *Acta Vet Scand.* 52(1):43, 2010b.

GRIBBLE, D. H. Equine ehrlichiosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 155, p. 462–469, 1969.

GUEDES, E.; LEITE, R. C.; PRATA, M.C.A.; PACHECO, R.C.; WALKER, D.H.; LABRUNA, M.B. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.100, n.8, p.841-845, 2005.

GUGLIELMONE, A. A.; BEATI, L.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; NAVA, S.; VENZAL, J. M.; MANGOLD, A. J.; SZABÓ, M. P.; MARTINS, J. R.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; ESTRADA-PEÑA, A. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. *Experimental and Applied Acarology*, v. 40, n. 2, p. 83-100, nov. 2006.

GUSTAFSON, J. M.; BURGESS, E. C.; WACHAL, M. D.; STEINBERG, H. Intrauterine transmission of *Borrelia burgdorferi* in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, v. 54, p. 882- 890, 1993.

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

HAJDUŠEK, O.; SÍMA, R.; AYLLÓN, N.; JALOVECKÁ, M.; PERNER, J.; De LA FUENTE, J.; KOPÁČEK, P. Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. *Front Cell Infect Microbiol.* 3:26, 2013.

HANSEN, M. G.; CHRISTOFFERSEN, M.; THUESEN, L. R.; PETERSEN, M. R.; BOJESEN, A. M. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in Danish horses. *Acta Vet Scand*, v. 18, p. 52-53. 2010.

HERRERA, H. M.; DÁVILA, A. M.; NOREK, A.; ABREU, U. G.; SOUZA, S. S.; D'ANDREA, P. S.; JANSEN, A. M. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. *Vet Parasitol.* 10;125(3-4):263-75, Nov. 2004.

HOOGSTRAAL, H. Argasid and nuttalliellid ticks as parasites and vectors. *Advances in Parasitology*, v. 24, n. 1, p. 135-238, 1985.

HORTA, M. C.; LABRUNA, M. B.; SANGIONI, L. A.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C. L.; VIDOTTO, O.; SCHUMAKER, T. T. S.; WALKER, D. H. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian Spotted Fever-endemic area in the state of São Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group *Rickettsia*. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 71, p. 93-97, 2004.

HORTA, M. C.; LABRUNA, M. B.; PINTER, A.; LINARDI, P. M.; SCHUMAKER, T. T. S. *Rickettsia* infection in five areas of the state of São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 102, p. 793-801, 2007.

HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; CASAGRANDE, R. A.; SAITO, T. B.; ROSA, S. C.; OGRZEWALSKA, M.; MATUSHIMA, E. R.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of opossums *Didelphis aurita* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 9(1):109-18, Feb. 2009.

HUMAIR, P.; GERN, L. The wild hidden face of Lyme borreliosis in Europe. *Microbes and Infection*, v. 2, p. 915-922, 2000.

HYDE, F. W.; JOHNSON, R. C.; WHITE, T. J.; SHELBURNE, C. E. Detectin of antigens in urine of mice and humans infected with *Borrelia burgdorferi*, etiologic agent of Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.*, v. 27, p. 58-61, 1989.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Pecuária Municipal. IBGE, 38: 39, 2010.

IRVIN, A. D.; OMWOYO, P.; PURNELL, R. E.; PIERCE, M. A.; SCHIEMANN, B. Blood parasites of the impala (*Aepyceros melampus*) in the Serengeti National Park. *The Veterinary Record*, v. 93, n. 7, p. 200-203, 1973.

ISHIKAWA, M. M.; FONSECA, A. H.; SOARES, C. O.; MASSARD, C. L.; YOSHINARI, N. H. Padronização de ensaio imunoenzimático ELISA indireto para pesquisa de anticorpos IgG contra *Borrelia burgdorferi* em bovinos. *Revta Bras. Med. Vet.* 19(4):166-168. 1997.

ISMAIL, N.; BLOCH, K. C.; MCBRIDE, J. W. Human ehrlichiosis and anaplasmosis. *Clinics in Laboratory Medicine*. v. 30, p. 261–292, 2010.

JOHNSON, R. C.; SCHIMID, G. P.; HYDE, F. W.; STEIGERWALT, A. G.; BRENNER, D. J. *Borrelia burgdorferi* sp. Nov.: etiologic agent of Lyme disease. *Journal of Systematic Bacteriology*, v. 34, p. 496, 1984.

JOHNSON, A. L.; DIVERS, T. J.; CHANG, Y. F. Validation of an in-clinic enzyme-linked immunosorbent assay kit for diagnosis of *Borrelia burgdorferi* infection in horses. *J Vet Diagn Invest.* 20:321–324, 2008.

JONGEJAN, F.; WASSINK, L. A.; THIELEMANS, M. J.; PERIE, N. M.; UILENBERG, G. Serotypes in *Cowdria ruminantium* and their relationship with *Ehrlichia phagocytophila* determined by immunofluorescence. *Vet Microbiol.* 21(1):31-40, 1989.

KARCH, H.; HUPPERTZ, H. I.; BÖHME, M.; SCHMIDT, H.; WIEBECKE, D.; SCHWARZKOFF, A. Demonstration of *Borrelia burgdorferi* DNA in urine samples from healthy humans whose sera contain *B. burgdorferi*-specific antibodies. *J. Clin. Microbiol*, v. 32, p. 2312-2314, 1994.

KARPATY, S. E.; SLATER R, K. S.; GOLDSMITH, C. S.; NICHOLSON, W. L.; PADDOCK, C. D. *Rickettsia amblyommatis* sp. nov., a spotted fever group rickettsia associated with multiple species of *Amblyomma* ticks in North and South America. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 5236–5243. 2016.

KEENAN, K. P.; BUHLES, W. C. JR.; HUXSOLL, D. L.; WILLIAMS, R. G.; HILDEBRANDT, P. K. Studies on the pathogenesis of *Rickettsia rickettsii* in the dog: clinical and clinicopathologic changes of experimental infection. *American Journal of Veterinary Research*, v. 38, n. 6, p. 851-856, June. 1977.

KIM, H. Y.; MOTT, J.; ZHI, N.; TAJIMA, T.; RIKIHISA, Y. Cytokine gene expression by peripheral blood leukocytes in horses experimentally infected with *Anaplasma phagocytophila*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 9(5):1079-1084, 2002.

KRAWCZAK, F. S.; NIERI-BASTOS, F. A.; NUNES, F. P.; SOARES, J. F.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in *Amblyomma cajennense* ticks and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in a Brazilian spotted fever-endemic area. *Parasit. Vectors* 7: 1–7. 2014.

KRAWCZAK, F. S.; AGOSTINHO, W. C.; POLO, G.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M. B. Comparative evaluation of *Amblyomma ovale* ticks infected and noninfected by *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest, the agent of an emerging rickettsiosis in Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.* 7(3):502-507, 2016.

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

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

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M. C.; BOUYER, D. H.; MCBRIDE, J.W.; PINTER, A.; POPOV, V.; GENNARI, S. M.; WALKER, D.H. *Rickettsia* Species Infecting *Amblyomma cooperi* Ticks from an Area in the State of São Paulo, Brazil, Where Brazilian Spotted Fever Is Endemic. *Journal of Clinical Microbiology*. v.42, n.1, p.90–98, 2004.

LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; CAMARGO, E. P.; WALKER, D. H. Detection of a spotted fever group *Rickettsia* in the tick *Haemaphysalis juxtakochi* in Rondonia, Brazil. *Veterinary Parasitology*. v.127, p.169–174, 2005.

LABRUNA, M. B. Epidemiologia da Febre Maculosa no Brasil e nas Américas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ACAROLOGIA, 1., 2006a, Viçosa-MG. Anais. Viçosa: 2006.

LABRUNA, M. B.; OGRZEWALSKA, M.; MARTINS, T. F.; PINTER, A.; HORTA, M. C. Comparative susceptibility of larval stages of *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma cajennense*, and *Rhipicephalus sanguineus* to infection by *Rickettsia rickettsii*. *Journal of Medical Entomology*, v. 45, n. 6, p. 1156-1159, Nov. 2008.

LABRUNA, M. B. Ecology of *Rickettsia* in South America. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1166, p. 156-166, May. 2009.

LABRUNA, M. B.; SOARES, J. F.; MARTINS, T. F.; SOARES, H. S.; CABRERA, R. R. Cross-mating experiments with geographically different populations of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*, v. 54, n. 1, p. 41-49, May. 2011a.

LABRUNA, M. B.; MATTAR, S. V.; NAVA, S.; BERMUDEZ, S.; VENZAL, J. M.; DOLZ, G.; ABARCA, K.; ROMERO, L.; SOUSA, R. de; OTEO, J.; ZAVALA-CASTRO, J. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. *Revista MVZ Córdoba*, v. 16, n. 2, p. 2435-2457, may-agosto. 2011b.

LABRUNA, M. B.; KRAWCZAK, F. S.; GERARDI, M.; BINDER, L. C.; BARBIERI, A. R. M.; PAZ, G. F.; RODRIGUES, D. S.; ARAÚJO, R. N.; BERNARDES, M. L.; LEITE, R. C. Isolation of *Rickettsia rickettsii* from the tick *Amblyomma sculptum* from a Brazilian spotted fever-endemic area in the Pampulha Lake region, southeastern Brazil. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports* 8: 82–85. 2017.

LAGE, R. A. Perfil citológico vaginal de éguas da raça quarto de milha criadas no semi-árido nordestino do Brasil. Monografia de graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, Rio Grande do Norte. 38p. 2007.

LANE, R. S.; BROWN, R. N.; PIESMAN, J.; PEAVEY, C. A. Vector competence of *Ixodes pacificus* and *Dermacentor occidentalis* (Acari: Ixodidae) for various isolates of Lyme disease spirochetes. *Journal of Medical Entomology*, v. 31, n. 3, p. 417-424, 1994.

LA SCOLA, B.; RAOULT, D. L. Laboratory diagnosis of Rickettsioses: Current approaches diagnosis of old and new Rickettsial Diseases. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 35, p. 2715-2727, 1997.

LASCOLA, K.; VANDIS, M.; BAIN, P.; BEDENICE, D. Concurrent infection with *Anaplasma phagocytophilum* and *Mycoplasma haemolamae* in a young alpaca. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.23, n.2, p.379-382, 2009.

LAUS, F.; VERONESI, F.; PASSAMONTI, F.; PAGGI, E.; CERQUETELLA, M.; HYATT, D.; TESEI, B.; FIORETTI, D. P. Prevalence of tick-borne pathogens in horses from Italy. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 75, p. 715–720, 2013.

LEE, K.; TAKANO, A.; TAYLOR, K.; SASHIKA, M.; SHIMOZURU, M.; KONNAI, S.; KAWABATA, H.; TSUBOTA, T. A relapsing fever group *Borrelia* sp. similar to *Borrelia lonestari* found among wild sika deer (*Cervus nippon*



*yesoensis*) and *Haemaphysalis* spp. ticks in Hokkaido, Japan. Ticks Tick Borne Dis. 5(6):841-7, Oct. 2014.

LEE, S. H.; KIM, K. T.; YUN, S. H.; CHOI, E.; LEE, G. H.; PARK, Y. S.; CHO, K. H.; YI, S.; KWON, O. D.; KIM, T. H.; KWAK, D. Serological and molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in horses reared in Korea. Veterinarni Medicina, v. 60, p. 533–538, 2015.

LEMO, E. R. S.; MACHADO, R. D.; COURA, J. R.; GUIMARÃES, M. A. A. M.; CHAGASI, N. Epidemiological aspects of the Brazilian Spotted Fever: Serological survey of dogs and horses in an endemic área in the state of São Paulo, Brazil. Revista Instituto de Medicina Tropical, v. 38, p. 427-430, 1996.

LEPIDI, H.; BUNNELL, J. E.; MARTIN, M. E.; MADIGAN, J. E.; STUEN, S.; DUMLER, J. S. Comparative pathology and immunohistology associated with clinical illness after *Ehrlichia phagocytophila*-group infections. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 62, p. 29–37, 2000.

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

LIMA, E. F.; RIET-CORREIA, F.; De CASTRO, R. S.; GOMES, A. A. B.; LIMA, F. S. Sinais clínicos, distribuição das lesões no sistema nervoso e epidemiologia da raiva em herbívoros na região Nordeste do Brasil. Pesq. Vet. Bras. vol.25 no.4 Rio de Janeiro Oct. /Dec. 2005.

LIVERIS, D.; SCHWARTZ, I.; MCKENNA, D.; NOWAKOWSKI, J.; NADELMAN, R.; DEMARCO, J.; IYER, R.; BITTKER, S.; COOPER, D.; HOLMGREN, D.; WORMSER, G. P. Comparison of five diagnostic modalities for direct detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with early Lyme disease. Diagn Microbiol Infect Dis. 73(3):243-5, Jul. 2012.

LÖHR, C. V.; RURANGIRWA, F. R.; MCELWAIN, T. F.; STILLER, D.; PALMER, G. H. Specific expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 salivary gland variants occur in the midgut and is an early event during tick transmission. *Infect Immun.* 70: 114– 120, 2002.

LOPES, F. A.; REZENDE, J.; SILVA, D. B. D. S.; ALVES, F. C. G.; OLIVEIRA, C. E.; COSTA, I. P. D. Molecular evidence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in patients in Brazilian central-western region. *Rev Bras Reumatol Engl Ed.* 57(6):641-645, Nov – Dec. 2017.

LUKASZEWSKA, J.; ADASZEK, L.; WINIARCZYK, S. Hematological changes in granulocytic anaplasmosis in dogs and horses. *Zycie Weterynaryjne*, v. 83, p. 827– 831, 2008.

LUZ, H. R.; SILVA-SANTOS, E.; COSTA-CAMPOS, C. E.; ACOSTA, I.; MARTINS, T. F.; MUÑOZ-LEAL, S.; MCINTOSH, D.; FACCINI, J. L. H.; LABRUNA, M. B. Detection of *Rickettsia* spp. in ticks parasitizing toads (*Rhinella marina*) in the northern Brazilian Amazon. *Exp. Appl. Acarol.* 75, 309–318. 2018.

MACALUSO, K. R.; SONENSHINE, D. E.; CERAUL, S. M.; AZAD, A. F. Infection and transovarial transmission of rickettsiae in *Dermacentor variabilis* ticks acquired by artificial feeding. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 1:45–53, 2001.

MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R.; WERTHER, K.; De SOUSA, E.; GAVIOLI, F. A.; ALVES JUNIOR, J. R. Migratory and carnivorous birds in Brazil: reservoirs for *Anaplasma* and *Ehrlichia* species? *Vector Borne Zoonotic Dis.* 12(8):705-8, Aug. 2012.

MACLACHLAN, N. J.; DUBOVI, E. J.; FENNER, F. Fenner's Veterinary Virology 4th edn, London: Academic Press. 2011.

MADDER, M.; SPEYBROECK, N.; BRANDT, J.; BERKVEN, D. Diapause induction in adults of three *Rhipicephalus appendiculatus* stocks. *Exp Appl Acarol.* 23(12):961-968, 1999.

MADIGAN, J. E.; GRIBBLE, D. Equine ehrlichiosis in northern California: 49 cases (1968–1981). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 190, p. 445–448, 1987.

MADIGAN, J. E. Equine ehrlichiosis. *Veterinary Clinics of North America*, v. 9, p. 423–428, 1993.

MADUREIRA, R. C. Frequência de anticorpos homólogos anti-*Borrelia burgdorferi* em equinos dos municípios de Três Rios, Vassouras e Valença, estado do Rio de Janeiro. Dissertação (Mestrado em Parasitologia Veterinária), Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 46p, 2004.

MADUREIRA, R. C.; CORRÊA, F. N.; CUNHA, N. C.; GUEDES, J. R. D. S.; FONSECA, A. H. Ocorrência de anticorpos homólogos anti-*Borrelia burgdorferi* em eqüinos de propriedades dos municípios de Três Rios e Vassouras, estado do Rio de Janeiro. *Revta Bras. Ciênc. Vet*, v. 14, p. 43-47, 2007.

MAGALHÃES, O. Contribuição ao conhecimento das doenças do grupo tifo exantemático. Monografias do Instituto Oswaldo Cruz, n. 6. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 968 p. 1952.

MAGNARELLI, L. A.; ANDERSON, J. F.; SHAW, E.; POST, J. E.; PALKA, F. C. Borreliosis in equids in northeastern United States. *American journal of Veterinary Research*, v. 49, p. 359-362, 1988.

MAGNARELLI, L. A.; IJDO, J. W.; VAN ANDEL, A. E.; WU, C.; PADULA, S. J.; FIKRIG, E. Serologic confirmation of *Ehrlichia equi* and *Borrelia burgdorferi*

infections in horses from the northeastern United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 217, p. 1045-1050, 2000.

MAGNARELLI, L. A.; IJDO, J. W.; VAN ANDEL, A. E.; WU, C.; FIKRIG, E. Evaluation of a polyvalent enzyme-linked immunosorbent assay incorporating a recombinant p44 antigen for diagnosis of granulocytic ehrlichiosis in dogs and horses. *American Journal of Veterinary Research*, v. 62, p. 29–32, 2001.

MAGNARELLI, L. A.; BUSHMICH, S. L.; SHERMAN, B. A.; FIKRIG, E. A comparison of serologic tests for the detection of serum antibodies to whole-cell and recombinant *Borrelia burgdorferi* antigens in cattle. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 45, n. 8, p. 667-674, 2004.

MANTOVANI, E.; COSTA, I. P.; GAUDITANO, G.; BONOLDI, V. L. N.; HIGUCHI, M. L.; YOSHINARI, N. H. Description of Lyme disease-like syndrome in Brazil. Is it a new tick-borne disease or Lyme disease variation? *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40, 443–456, 2007.

MANTOVANI, E.; MARANGONI, R. G.; GAUDITANO, G.; BONOLDI, V. L. N.; YOSHINARI, N. H. Identification of the etiologic agent of Brazilian Lyme disease-like syndrome (Baggio-Yoshinari Syndrome): an emerging and original zoonosis of interest to multidisciplinary Brazilian medical society. *Clinics [S.l.: s.n.]*, 2010.

MANTOVANI, E.; MARANGONI, R. G.; GAUDITANO, G.; BONOLDI, V. L.; YOSHINARI, N. H. Amplification of the flgE gene provides evidence for the existence of a Brazilian borreliosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 54(3):153-7, May-Jun. 2012.

MARRERO, M.; RAOULT, D. Centrifugation-shell vial technique for rapid detection of Mediterranean spotted fever *Rickettsia* in blood culture. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 40, p.197-9, 1989.

MARTINS, J. R.; CERESÉR, V. H.; CORRÊA, B. L.; SMITH, R. D. *Borrelia theileri*: Observação em carrapatos do gênero *Boophilus microplus* no município de Guaíba, RS, Brasil. *Ciência Rural*, v. 26, p. 447-450, 1996.

MASUZAWA, T. Terrestrial distribution of the Lyme borreliosis agent *Borrelia burgdorferi* sensu lato in east Asia. *Japan Journal of Infectious Diseases*, v. 57, p. 229-235, 2004.

MASSUNG, R. F.; COURTNEY, J. W.; HIRATZKA, S. L.; PITZER, V. E.; SMITH, G.; DRYDEN, R. L. *Anaplasma phagocytophilum* in white-tailed deer. *Emerg Infect Dis.* 11(10):1604-6, Oct. 2005.

MATHER, T. N.; FISH, D.; COUGHLIN, R. T. Competence of dogs as reservoirs for Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*). *Journal of American Veterinary Medicine Association*, v. 205, p. 186-188, 1994.

MATTON, P.; VAN MALCKEBEKE, H. Bovine borreliosis: comparison of simple methods for detection of the spirochaete in the blood. *Tropical Animal Health Production*, v. 22, p. 147-152, 1990.

MCDADE, J. E.; NEWHOUSE, V. F. Natural history of *Rickettsia rickettsii*. *Annual Review of Microbiology*, v. 40, p. 287-309, Oct. 1986.

MELO, I. S.; GADELHA, A. R.; FERREIRA, L. C. L. Estudo histopatológico de casos de eritema crônico migratório diagnosticados em Manaus. *An. Bras. Dermatol.* 78, 169–177. 2003.

METCALF, K. B.; LILLEY, C. S.; REVENAUGH, M. S.; GLASER, A. L.; METCALF, E. S. The Prevalence of Antibodies against *Borrelia burgdorferi* Found in Horses Residing in the Northwestern United States. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 28, p. 587-589, 2008.

MEZERVILLE, V. H.; PADILLA-CUADRA, J. I. Choque séptico por ehrlichiosis. *Acta Medica Costarricense*, v.49, p.118-120, 2007.

MILAGRES, B. S.; PADILHA, A. F.; BARCELOS, R. M.; GOMES, G. G.; MONTANDON, C. E.; PENA, D. C. H.; NIERI BASTOS, F. A.; SILVEIRA, I.; PACHECO, R.; LABRUNA, M. B.; BOUYER, D. H.; FREITAS, R. N.; WALKER, D. H.; MAFRA, C. L.; GALVÃO, M. A. M. *Rickettsia* in synanthropic and domestic animals and their hosts from two areas of low endemicity for Brazilian spotted fever in the Eastern region of Minas Gerais, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 83, n. 6, p. 1305-1307, Dec. 2010.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2016. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo>. Acesso em: 04 maio 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Casos confirmados de febre maculosa. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1997 a 2014. Ministério da Saúde, 2014a. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/26/anexo-FebreMaculosa.pdf>. Acesso em: 04 maio 2020.

MINISTERIO DA SAUDE. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Óbitos de febre maculosa. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990-2014. Ministério da Saúde, 2014b. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/26/anexo-2-FebreMaculosa.pdf>. Acesso em: 04 maio 2020.

MOE, J. B.; MOSHER, D. F.; KENYON, R. H.; WHITE, J. D.; STOOKEY, J. L.; BAGLEY, L. R.; FINE, D. P. Functional and morphologic changes during experimental Rocky Mountain spotted fever in guineapigs. *Laboratory investigation*, v. 35, n. 3, p. 235-245, Sept. 1976.

MONTANDON, C. E.; YOSHINARI, N. H.; MILAGRES, B. S.; MAZIOLI, R.; GOMES, G. G.; MOREIRA, H. N.; PADILHA ADE, F.; WANDERLEY, G. G.; MANTOVANI, E.; GALVÃO, M. A.; LANGONI, H.; MAFRA, C. Evidence of *Borrelia* in wild and domestic mammals from the state of Minas Gerais, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 23(2):287-90, Apr-Jun. 2014.

MORSHED, M. G.; SCOTT, J. D.; FERNANDO, K.; GEDDES, G.; MCNABB, A.; MAK, S.; DURDEN, L. A. Distribution and characterization of *Borrelia burgdorferi* isolates from *Ixodes scapularis* and presence in mammalian hosts in Ontario, Canada. J Med Entomol. 43(4):762-73, jul. 2006.

MOREIRA, J. A.; MAGALHÃES, O. Typho exanthemático em Minas Gerais (8a comunicação). Brasil-médico, v. 44, p. 465-470, 1935.

MORENO C.; HEINZ, K.; PALMEDO, G. Interstitial granulomatous dermatitis with histiocytic pseudorosettes: a new histopathologic pattern in cutaneous borreliosis. J Am Acad Dermatol. 48:376-84, 2003.

MUNDERLOH, U. G.; LYNCH, M. J.; HERRON, M. J.; PALMER, A. T.; KURTTI, T. J.; NELSON, R. D.; GOODMAN, J. L. Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum*. Vet Microbiol. 101(1):53-64, 2004.

MUÑOZ-LEAL, S.; LOPES, M. G.; MARCILI, A.; MARTINS, T. F.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; LABRUNA, M. B. Anaplasmataceae, *Borrelia* and *Hepatozoon* agents in ticks (Acari: Argasidae, Ixodidae) from Chile. Acta Trop. 192:91-103, Apr. 2019.

MURRAY, G. G. R.; WEINERT, L. A.; RHULE, E. L.; WHELCH, J. J. The phylogeny of *Rickettsia* using different evolutionary signatures: how tree-Like is bacterial evolution? Syst Biol 65:265–279. 2016.

NAKA, E. N.; COSTA, I. P.; ARÃO, C. A. B.; SOARES, C. O.; YOSHINARI, N. H. Pesquisa de anticorpos anti-*Borrelia* e anti-*Babesia* em soro de crianças

com manifestações clínicas e epidemiologia compatíveis com a doença de Lyme-simile no Estado de Mato Grosso do Sul. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v.48, p.74-85, 2008.

NAKAJIMA, Y.; TAYLOR, D.; YAMAKAWA, M. Involvement of antibacterial peptide defensin in tick midgut defense. *Exp Appl Acarol.* 28:135–140, 2002.

NAKAYAMA, Y.; SPIELMAN, A. Ingestion of Lyme disease spirochetes by ticks feeding on infected hosts. *J Infect Dis.* 160(1):166-7, jul. 1989.

NASCIMENTO, E. M. M. Isolamento e detecção molecular de riquetsias do Grupo da Febre Maculosa, a partir de *Amblyomma cajennense* e espécimes biológicos humanos, procedentes de áreas endêmicas do Estado de São Paulo. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2003.

NASCIMENTO, D. A.; VIEIRA, R. F.; VIEIRA, T. S.; TOLEDO, R. D.; TAMEKUNI, K.; SANTOS, N. J.; GONÇALVES, D. D.; VIEIRA, M. L.; BIONDO, A. W.; VIDOTTO, O. Serosurvey of *Borrelia* in dogs, horses, and humans exposed to ticks in a rural settlement of southern Brazil. *Ver Bras Parasitol Vet.* 25(4):418-422, Oct-Dec. 2016.

NIERI-BASTOS, F. A.; LOPES, M. G.; CANÇADO, P. H. D.; ROSSA, G. A. R.; FACCINI, J. L. H.; GENNARI, S. M.; LABRUNA, M. B. Candidatus *Rickettsia andeanae*, a spotted fevergrou agent infecting *Amblyomma parvum* ticks in two Brazilian biomes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 109, 259–261. 2014.

NIERI-BASTOS, F. A.; MARCILI, A.; De SOUSA, R.; PADDOCK, C. D.; LABRUNA, M. B. Phylogenetic evidence for the existence of multiple strains of *Rickettsia parkeri* in the new world. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, e02872–17, 2018.



NIETO, N. C.; FOLEY, J. Evaluation of squirrels (Rodentia: Sciuridae) as ecologically significant hosts for *Anaplasma phagocytophilum* in California. *Journal of Medical Entomology*, v.45, n. 4, p.763-769, 2008.

NIETO, N. C.; TEGLAS, M. B. Relapsing fever group *Borrelia* in Southern California rodents. *J Med Entomol.* 51(5):1029-34, Sep. 2014.

NIGG, C.; LANDSTEINER, K. Studies on the cultivation of the typhus fever rickettsia in the presence of live tissue. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 55, n. 4, p. 563-576, 1932.

NIU, H.; YAMAGUCHI, M.; RIKIHISA, Y. Subversion of cellular autophagy by *Anaplasma phagocytophilum*. *Cell Microbiol.*, v.10, p.593-605, 2008.

NUTTALL, P. A.; LABUDA, M. Tick–host interactions: saliva-activated transmission. *Parasitology.* 129:177–89, 2004.

OGDEN, N. H.; WOLDEHIWET, Z.; HART, C. A. Granulocytic ehrlichiosis: an emerging or rediscovered tick-borne disease? *Journal of Medical Microbiology*, v. 47, n. 6, p. 475-482, 1998.

OGDEN, N. H.; CASEY, A. N. J.; FRENCH, N. P.; BOWN, K. J.; ADAMS, J. D. W.; WOLDEHIWET, Z. Natural *Ehrlichia phagocytophila* transmission coefficients from sheep ‘carriers’ to *Ixodes ricinus* ticks vary with the numbers of feeding ticks. *Parasitology*, v. 124, p. 127–136, 2002a.

OLIVEIRA, P. R.; BORGES, L. M. F.; LEITE, R. C.; FREITAS, C. M. V. Seasonal dynamics of the Cayenne tick, *Amblyomma cajennense* on horses in Brazil. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 17, n. 4, p. 412-416, Dec. 2003.

OLIVEIRA, A.; FONSECA, A. H.; ISHIKAWA, M. M.; YOSHINARI, N. H. Cinética do crescimento de *Borrelia burgdorferi* (Spirochaetaceae) em diferentes meios de cultivo. *Pesq. Vet. Bras.* 24 (2): 61-61, abr/jun. 2004.

O'NION, V. L.; MONTILLA, H. J.; QUROLLO, B. A.; MAGGI, R. G.; HEGARTY, B. C.; TORNQUIST, S. J.; BREITSCHWERDT, E. B. Potentially novel *Ehrlichia* species in horses, Nicaragua. *Emerg Infect Dis.* 21(2):335-8, Feb. 2015.

ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; FACCINI, J. L. Diagnoses of and illustrated key to the species of *Ixodes Latreille*, 1795 (Acari: Ixodidae) from Brazil. *Syst Parasitol.* 72(2):143-157, 2009.

OTEO, J. A.; BROUQUI, P. Ehrlichiosis y anaplasmosis humana. *Enferm. Infecc. y Microbiol. Clin.* v.23, p.375-380, 2005.

OTOMURA, F. H.; SANGIONI, L. A.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B.; GALHARDO, J. A.; RIBEIRO, M. G.; TEODORO, U. Anticorpos anti-rickettsias do grupo da febre maculosa em equideos e caninos no none do Estado do Paraná, Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 62, n. 3, p. 761- 764, jun. 2010.

OWEN, D. C. Is Lyme disease always poly microbial? The jigsaw hypothesis. *Med Hypotheses.* 67:860-864, 2006.

PACHECO, R. C.; HORTA, M. C.; PINTER, A.; MORAES-FILHO, J.; MARTINS, T. F.; NARDI, M. S.; SOUZA, S. S.; SOUZA, C. E.; SZABO, M. P.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. Survey of *Rickettsia* spp in the ticks *Amblyomma cajennense* and *Amblyomma dubitatum* in the State of São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 42, n. 3, p. 351-353, May-June 2009.

PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; GUEDES, E.; SILVEIRA, I.; RICHTZENHAIN, L. J.; LEITE, R. C.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infections of dogs, horses and ticks in Juiz de Fora, southeastern Brazil, and isolation of *Rickettsia rickettsii* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 25, n. 2, p. 148-155, June. 2011.

PACHECO, A.; CORDEIRO, M. D.; CEPEDA, M. B.; LUZ, H. R.; CARDOZO, S. V.; BERTO, B. P.; GUTERRES, A.; FONSECA, A. H. D. Hemoparasites in ticks of wild birds of Serra dos Órgãos National Park, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 6;28(2):238-244, Jun. 2019.

PADDOCK, C. D.; GREER, P. W.; FEREBEE, T. L.; SINGLETON, Jr. J.; McKECHNIE, D. B.; TREADWELL, T. A. Hidden mortality attributable to Rocky Mountain spotted fever: immunohistochemical detection of fatal, serologically unconfirmed disease. *Journal of Infections Disease.* v. 179, p.1469-76, 1999.

PAL, U.; MONTGOMERY, R. R.; LUSITANI, D.; VOET, P.; WEYNANTS, V.; MALAWISTA, S. E.; LOBET, Y.; FIKRIG, E. Inhibition of *Borrelia burgdorferi*-tick interactions in vivo by outer surface protein A antibody. *J Immunol.* 15;166(12):7398-403, Jun. 2001.

PARKER, J. L.; WHITE, K. W. Lyme borreliosis in cattle and horses: a review of the Literature. *Cornell Veterinary*, v. 82, p. 253-274, 1992.

PAROLA, P.; RAOULT, D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clinical Infectious Diseases*, v. 32, p. 897–928, 2001.

PAROLA, P.; PADDOCK, C. D.; RAOULT, D. Tick-borne Rickettsioses around the world: Emerging Diseases Challenging Old Concepts. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 18, p. 719-756, 2005.

PAROLA, P.; PADDOCK, C. D.; SOCOLOVSKI, C.; LABRUNA, M. B.; MEDIANNIKOV, O.; KERNIF, T.; ABDAD, M. Y.; STENOS, J.; BITAM, I.; FOURNIER, P. E.; RAOULT, D. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin Microbiol Rev.* 26(4):657-702, Oct. 2013.

PARREIRA, D. R.; JANSEN, A. M.; ABREU, U. G.; MACEDO, G. C.; SILVA, A. R.; MAZUR, C.; ANDRADE, G. B.; HERRERA, H. M. Health and

epidemiological approaches of *Trypanosoma evansi* and equine infectious anemia virus in naturally infected horses at southern Pantanal. *Acta Trop.* 163:98-102, Nov. 2016.

PASSAMONTI, F.; VERONESI, F.; CAPPELLI, K.; CAPOMACCIO, S.; COPPOLA, G.; MARENZONI, M. L.; PIERGILI, F. D.; VERINI, S. A.; COLETTI, M. "*Anaplasma phagocytophilum* in horses and ticks: A preliminary survey of Central Italy." *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 33, p. 73-83, 2010.

PAULIE, S.; PERLMANN, H.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay. *Encyclopedia of Life Science*, p. 1-4, 2005.

PEIXOTO, Z. M. P.; CUNHA, E. M. S.; SACRAMENTO, D. R. V.; CONCEIÇÃO, M.; SOUZA, A. M.; Da SILVA, L. H. Q.; GERMANO, P. L.; KROEFF, S. S.; KOTAIT, I. Rabies laboratory diagnosis: peculiar features of samples from equine origin. *Braz. J. Microbiol.* 31:72-75. 2000.

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

PHILIP, C. B. Some epidemiological considerations in Rocky Mountain spotted fever. *Public Health Rep.* 74:595–600. 1959.

PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. *Ann N Y Acad Sci.* 1078:523-9, Oct. 2006.

PINTER, A.; HORTA, M. C.; PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M. B. Serosurvey of *Rickettsia* spp. in dogs and humans from an endemic area for Brazilian spotted fever in the state of São Paulo, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 24, p. 247-252, 2008.

PIESMAN, J.; MATHER, T. N.; SINSKY, R. J.; SPIELMAN, A. Duration of tick attachment and *Borrelia burgdorferi* transmission. J Clin Microbiol. 25(3):557–558, 1987.

PIESMAN, J.; OLIVER, J. R.; SINSKY, R. J. Growth kinetics of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*) in the vector tick (*Ixodes dammini*). Am. J. Trop. Med. Hyg., 42:352-357, 1990.

PIESMAN, J.; SCHNEIDER, B. S.; ZEIDNER, N. S. Use of quantitative PCR to measure density of *Borrelia burgdorferi* in midgut and salivary glands of feeding tick vectors. Journal of Clinical Microbiology. v. 39, n. 11, p.4145-4148, 2001.

PIRANDA, E. M.; FACCINI, J. L. H.; PINTER, A.; SAITO, T. B.; PACHECO, R. C.; HAGIWARA, M. K.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical and laboratory findings. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 103, n. 7, p. 696-701, Nov. 2008.

PIRANDA, E. M.; FACCINI, J. L. H.; PINTER, A.; PACHECO, R. C.; CANCELO, P. H. D.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of *Rhipicephalus sanguineus* ticks with the bacterium *Rickettsia rickettsii*, using experimentally infected dogs. Vector- Borne and Zoonotic Diseases, v. 11, n. 1, p. 29-36, Jan. 2011.

PIRES, M. S.; SANTOS, T. M.; SANTOS, H. A.; VILELA, J. A. R.; PEIXOTO, M. P.; ROIER, E. C. R.; da SILVA, C. B.; BARREIRA, J. D.; LEMOS, E. R. S.; MASSARD, C. L. *Amblyomma cajennense* infestation on horses in two microregions of the state of Rio de Janeiro, Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 22, n. 2, p. 235-242, abr-jun. 2013.

POLO, G.; MERA ACOSTA, C.; LABRUNA, M. B.; FERREIRA, F. Transmission dynamics and control of *Rickettsia rickettsii* in populations of *Hydrocoerus hydrochaeris* and *Amblyomma sculptum*. PLoS. Negl. Trop. Dis. 11: 1–12, 2017.

POLO, G.; LABRUNA, M. B.; FERREIRA F. Basic reproduction number for the Brazilian spotted fever. *J. Theor. Biol.* 458: 119–124, 2018.

POPOV, V. L.; HAN, V. C.; CHEN, S. M.; DUMLER, J. S.; FENG, H. M.; ANDREADIS, T. G.; TESH, R. B.; WALKER, D. H. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. *J. Med. Microbiol.*, v. 47, p. 235–251, 1998.

PRADO, R. F. S.; CAMPOS, C. H. C.; CORDEIRO, M. D.; PIRES, M. S.; CEPEDA, M. B.; MAFRA, C.; MASSARD, C. L.; Da FONSECA, A. H. Soroprevalência de anticorpos homólogos anti-*Borrelia burgdorferi* em equinos de uso militar no Brasil. *R. bras. Ci. Vet.*, v. 24, n. 1, p. 72-76, abr./jun. 2014. Acess 2017.

PRADO, R. F. S.; CAMPOS, C. H. C.; CORDEIRO, M. D.; PIRES, M. S.; CEPEDA, M. B.; MAFRA, C.; MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. Soroprevalência de anticorpos homólogos anti-*Borrelia burgdorferi* em equinos de uso militar no Brasil. *R. bras. Ci. Vet.*, v. 24, n. 1, p. 72-76, abr./jun. 2017.

PRASKOVA, I.; BEZDEKOVA, B.; ZEMAN, P.; JAHN, P. Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in horses in the Czech Republic. *Ticks Tick Borne Dis*, v. 2, p. 111-115, 2011.

PRITT, B. S.; MEAD, P. S.; JOHNSON, D. K. H.; NEITZEL, D. F.; RESPICIO-KINGRY, L. B.; DAVIS, J. P.; SCHIFFMAN, E.; SLOAN, L. M.; SCHRIEFER, M. E.; REPLOGLE, A. J.; PASKEWITZ, S. M.; RAY, J. A.; BJORK, J.; STEWARD, C. R.; DEEDON, A.; LEE, X.; KINGRY, L. C.; MILLER, T. K.; FEIST, M. A.; THEEL, E. S.; PATEL, R.; IRISH, C. L.; PETERSEN, J. M. Identification of a novel pathogenic *Borrelia* species causing Lyme borreliosis with unusually high spirochaetaemia: a descriptive study. *Lancet Infect Dis.* 16(5):556-564, May. 2016.

PUSTERLA, N.; LUTZ, H.; BRAUN, U. Experimental infection of four horses with *Ehrlichia phagocytophila*. *Veterinary Record*, v. 143, p. 303–305, 1998.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B. K.; CARTER, G. R. *Clinical Veterinary Microbiology*. First Edition. Wolfe Publishing, London, p. 292-303, 1994.

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

RADOLF, J. D.; CAIMANO, M. J.; STEVENSON, B.; HU, L. T. Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nat Rev Microbiol*. 9;10(2):87-99, jan. 2012.

RAMOS, R. A. N.; RAMOS, C. A. N.; ARAÚJO, F. R.; MELO, E. S. P.; TEMBUE, A. A. S. M.; FAUSTINO, M. A. G.; ALVES, L. C.; ROSINHA, G. M. S.; ELISEI, C.; SOARES, C. O. Detecção de anticorpos para *Anaplasma* sp. em pequenos ruminantes no semi-árido do estado de Pernambuco. *Brasil Rev Bras Parasitol Vet*, v. 17, p. 115–117, 2008.

RANKA, R.; BORMANE, A.; SALMANE, K.; BOWMANIS, V. Identification of three Clinically relevante *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of 16S-23S ribosomal DNA spacer amplicons. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(4):1444-1449, 2004.

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, p.40-72, 2008.

RAR, V.; GOLOVLJOVA, I. *Anaplasma*, *Ehrlichia*, and “*Candidatus Neoehrlichia*” bacteria: Pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic

characteristics, a review. *Infections, Genetics and Evolution*. v. 11, p. 1842–1861, 2011.

REGNERY, R. L.; SPRUILL, C. L.; PLIKAYTIS, B. D. Genotypic Identification of *Rickettsiae* and Estimation of Intraspecies Sequence Divergence for Portions of Two *Rickettsial* Genes. *Journal of Bacteriology*, v. 173, p. 1576–1589, 1991.

RESENDE, J.; KESSLER, R. H.; SOARES, C. O.; MARTINS, O. P. Ocorrência de *Borrelia* spp. em cultura de células embrionárias do carrapato *Boophilus microplus* (acari: ixodidae) no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 17, 1, 50-52. 2008.

RESENDE, J.; LOPES, F. A.; ALVES, F. C. G.; BRUNO, A. R.; MORENO, S. E.; COSTA, I. P.; FONSECA, A. H.; CORDEIRO, M. D.; De OLIVEIRA, C. E. Detection of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato in Mato Grosso Do Sul, Brazil. *JSM Trop Med Res* 1(1): 1003. 2016.

REUBEL, G. H.; KIMSEY, R. B.; BARLOUGH, J. E.; MADIGAN, J. E. Experimental transmission of *Ehrlichia equi* to horses through naturally infected ticks (*Ixodes pacificus*) from northern California. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, p. 2131–2134, 1998.

RIBEIRO, A. J.; CARDOSO, L.; MAIA, J. M.; COUTINHO, T.; COTOVIO, M. Prevalence of *Theileria equi*, *Babesia caballi*, and *Anaplasma phagocytophilum* in horses from the north of Portugal. *Parasitology Research*, v. 112, p. 2611–2617, 2013.

RICH, S. M.; ARMSTRONG, P. M.; SMITH, R. D.; TELFORD III, S. R. Lone Star Tick infecting *Borreliae* are most closely related to the agent of bovine borreliosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, n. 2, p. 494-497, 2001.

RICKETTS, H. T. Some aspects of Rocky Mountain spotted fever as shown by recent investigations. *Medical Record*, v. 76, p. 843-855, 1909.



RIKIHISA, Y. Mechanisms of Obligatory Intracellular Infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Clinical Microbiology Reviews* 24 (3): 469–489, 2011.

RODRIGUES, B. D.; MEIRELES, V. M. B.; BRAZ, M. N. Borreliose de Lyme Símile – Relato de Caso, Lyme Disease – First Case Report in Pará. *Revista Paraense de Medicina*, v.21, p.63-67, 2007.

ROLLEND, L.; FISH, D.; CHILDS, J. E. Transovarial transmission of *Borrelia* spirochetes by *Ixodes scapularis*: a summary of the literature and recent observations. *Ticks Tick Borne Dis*, v. 4, p. 46–51, 2013.

RUDENKO, N.; GOLOVCHENKO, M.; GRUBHOFFER, L.; OLIVER JR, J. H. *Borrelia carolinensis* sp. nov., a new (14th) member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex 88 from the southeastern region of the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 47, n. 1, p. 134–141, 2009.

RUDENKO, N.; GOLOVCHENKO, M.; GRUBHOFFER, L.; OLIVER JR, J. H. Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks and Tick-borne Diseases*, Amsterdam, v. 2, n. 3, p. 123-128, Sept. 2011.

SAL, M. S.; LI, C.; MOTALAB, M. A.; SHIBATA, S.; AIZAWA, S.; CHARON, N. W. *Borrelia burgdorferi* uniquely regulates its motility genes and has an intricate flagellar hook-basal body structure. *J Bacteriol.* 190(6):1912-21, Mar. 2008.

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

SALVAGNI, C. A.; DAGNONE, A. S.; GOMES, T. S.; MOTA, J. S.; ANDRADE, G. M.; BALDANI, C. D.; MACHADO, R. Z. Serologic evidence of equine granulocytic anaplasmosis in horses from central West Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*, v. 19, p. 135-140, 2010.

SAMMONS, L. S.; KENYON, R. H.; BURGER, G. T.; PEDERSEN, C. E. JR.; SPERTZEL, R. O. Changes in blood serum constituents and hematologic values in *macaca mulatta* with Rocky Mountain spotted fever. *American Journal of Veterinary Research*, v. 37, n. 6, p. 725-730, June. 1976.

SAMUELS, D. D.; RADOLF, J. D. *Borrelia: Molecular Biology, Host Interaction and Pathogenesis*. 1. ed. Norfolk: Caister Academic Press, 2010.

SANGIONI, L. A. Pesquisa de infecção por rickettsias do grupo da febre maculosa em humanos, cães e eqüinos e adultos de *Amblyomma cajennense*, em área endêmica e não-endêmica do Estado de São Paulo. 2003. 86f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

SANGIONI, L. A.; HORTA, M. C.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. M.; GALVÃO, M. A. M.; SCHUMAKER, T. T. S.; FERREIRA, F.; VIDOTTO, O.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in animals and Brazilian Spotted Fever Endemicity. *Emerging Infectious Disease*, v. 11, p. 265-270, 2005.

SANTOS, A. S.; BACELLAR, F.; SANTOS-SILVA, M.; FORMOSINHO, P.; GRÁCIO, A. J.; FRANCA, S. Ultrastructural Study of the Infection Process of *Rickettsia conorii* in the Salivary Glands of the Vector Tick *Rhipicephalus sanguineus*. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2:165–77, 2002.

SANTOS, M.; HADDAD JÚNIOR, V.; RIBEIRO-RODRIGUES, R.; TALHARI, S. Lyme borreliosis. *An Bras Dermatol.* 85(6):930-8, Nov-Dec. 2010.

SANTOS, H. Á.; PIRES, M. S.; VILELA, J. A. R.; SANTOS, T. M.; FACCINI, J. L. H.; BALDANI, C. D.; THOMÉ, S. M. G.; SANAVRIA, A.; MASSARD, C. L. 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. Á.; THOMÉ, S. M.; BALDANI, C. D.; SILVA, C. B.; PEIXOTO, M. P.; PIRES, M. S.; VITARI, G. L.; COSTA, R. L.; SANTOS, T. M.; ANGELO, I. C.; SANTOS, L. A.; FACCINI, J. L.; MASSARD, C. L. Molecular epidemiology of the emerging zoonosis agent *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) in dogs and ixodid ticks in Brazil. *Parasit Vectors*, v. 6, p. 348, 2013.

SCAIFE, H.; WOLDEHIWET, Z.; HART, C. A.; EDWARDS, S. W. *Anaplasma phagocytophilum* reduces neutrophil apoptosis in vivo. *Infect Immun.* 71(4), p. 1995-2001, 2003.

SCHARF, W.; SCHAUER, S.; FREYBURGER, F.; PETROVEC, M.; SCHAARSCHMIDT-KIENER, D.; LIEBISCH, G.; RUNGE, M.; GANTER, M.; KEHL, A.; DUMLER, J. S.; GARCIA-PEREZ, A. L.; JENSEN, J.; FINGERLE, V.; MELI, M. L.; ENSSER, A.; STUEN, S.; VON LOEWENICH, F. D. Distinct host species correlate with *Anaplasma phagocytophilum* ankA gene clusters. *J Clin Microbiol*, v. 49, p. 790-796, 2011.

SCHRIEFER, M. E.; AZAD, A. F. Changing ecology of Rocky Mountain spotted fever, p. 314–326. In D. E. Sonenshine and T. N. Mather (ed.), *Ecological dynamics of tick-borne zoonoses*. Oxford University Press, New York, N.Y. 1994.

SCHWAN, T. G. Ticks and *Borrelia*: model systems for investigating pathogen arthropod interactions. *Infect. Agents Dis.*, 5:167-181, 1996.

SELLS, D. M.; HILDEBRANDT, P. K.; LEWIS, G. E.; NYINDO, M. B.; RISTIC, M. Ultrastructural observations on *Ehrlichia equi* organisms in equine granulocytes. *Infection and Immunity*, v. 13, p. 273, 1976.

SEN, E.; UCHISHIMA, Y.; OKAMOTO, Y.; FUKUI, T.; KADOSAKA, T.; OHASHI, N.; MASUZAWA, T. 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 Tick Borne Dis.* 2(2):94-8, Jun. 2011.

SHIH, C. M.; TELFORD, S. R.; SPIELMAN, A. Effect of ambient temperature on competence of deer ticks as hosts for Lyme disease spirochetes. *J Clin Microbiol.* 33(4):958-61, Apr. 1995.

SHINJO, S. K.; GAUDITANO, G.; MARCHIORI, P. E.; BONOLDI, V. L. N.; COSTA, I. P.; MANTOVANI, E.; YOSHINARI, Y. Manifestação neurológica na Síndrome de Baggio-Yoshinari (Síndrome brasileira semelhante à doença de Lyme). *Rev Bras Reumatol*, 49(5)492-505, 2009.

SILAGHI, C.; GILLES, J.; HÖHLE, M.; FINGERLE, V.; JUST, F. T.; PFISTER, K. *Anaplasma phagocytophilum* infection in *Ixodes ricinus*, Bavaria, Germany. *Emerg Infect Dis*, v. 14, p. 972-974, 2008.

SILAGHI, C.; LIEBISCH, G.; PFISTER, K. Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* from 14 equine granulocytic anaplasmosis cases. *Parasites & Vectors*, v. 4, p. 161, 2011a.

SILAGHI, C.; HAMEL, D.; THIEL, C.; PFISTER, K.; PASSOS, L. M.; REHBEIN, S. Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* in wild caprine and cervid ungulates from the Alps in Tyrol, Austria. *Vector Borne Zoonotic Dis*, v. 11, p. 355-362, 2011b.

SILAGHI, C.; WOLL, D.; HAMEL, D.; PFISTER, K.; MAHLING, M.; PFEFFER, M. *Babesia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in questing ticks, ticks parasitizing rodents and the parasitized rodents--analyzing the host-pathogen-vector interface in a metropolitan area. *Parasit Vectors*. 5:191, 2012.

SILVA, N.; EREMEEVA, M. E.; ROZENTAL, T.; RIBEIRO, G. S.; PADDOCK, C. D.; RAMOS, E. A.; FAVACHO, A. R.; REIS, M. G.; DASCH, G. A.; De LEMOS, E. R.; KO, A. I. Eschar-associated spotted fever rickettsiosis, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 17(2):275-8, Feb. 2011.

SILVA, J. B.; BAÊTA, B. A.; RIBEIRO, C. C. D. U.; TEIXEIRA, R. C.; Da FONSECA, A. H. Detection of Antibodies against *Borrelia Burgdorferi* in

Periparturient Cows and Calves during the First Year Old by Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (iELISA). *Global Journal of Science Frontier Research* v. 8 Issue Version IV, 2013.

SILVEIRA, I.; MARTINS, T. F.; OLEGÁRIO, M. M.; PETERKA, C.; GUEDES, E.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M. B. Rickettsial Infection in Animals, Humans and Ticks in Paulicéia, Brazil. *Zoonoses Public Health*. 62(7):525-33, Nov. 2015.

SKARDA, J. Lyme borreliosis, the present diagnostic criteria. *Folia Vet.* 49: s33–s34, 2005.

SLATER, J. From glanders to Hendra virus: 125 years of equine infectious diseases. *Vet Rec.* 31;173(8):186-9, Aug. 2013.

SLIVINSKA, K.; VÍCHOVÁ, B.; WERSZKO, J.; SZEWCZYK, T.; WRÓBLEWSKI, Z.; PEŤKO, B.; RAGAČ, O.; DEMESHKANT, V.; KARBOWIAK, G. Molecular surveillance of *Theileria equi* and *Anaplasma phagocytophilum* infections in horses from Ukraine, Poland and Slovakia. *Veterinary Parasitology*, v. 215, p. 35-37, 2016.

SMITH, R. D.; ROGERS, A. B. *Borrelia theileri*: A Review. *Journal of Spirochaetal and Tick-borne Disease*, v. 5, n. 4, p. 63-68, 1998.

SOARES, C. O.; FONSECA, A. H.; ISHIKAWA, M. M.; MANERA, G. B.; SCOFIELD, A.; YOSHINARI, N. H. Sorologia para borreliose em cães procedentes da Baixada Fluminense, Estado do Rio de Janeiro. *Revta Bras. Med. Vet.* v. 21, p. 111-114, 1999.

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

SOARES, J. F.; SOARES, H.S.; BARBIERI, A. M.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of the tick *Amblyomma cajennense*, Cayenne tick, with *Rickettsia rickettsii*, the agent of Rocky Mountain spotted fever. *Med Vet Entomol.* 26(2):139–51, 2012.

SOARES, H. S. Pesquisa de carrapatos, agentes transmitidos por carrapatos e tripanossomatídeos em animais silvestres dos estados do Mato Grosso e Pará. 2013. 119f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2013.

SOCOLOSKI, S. N. G.; De CASTRO, B. G.; CORDEIRO, M. D.; Da FONSECA, A. H.; CEPEDA, M. B.; NICOLINO, R. R.; LOPES, L. B. Epidemiological investigation of *Borrelia burgdorferi* in horses in the municipality of Sinop-MT, Brazil. *Trop Anim Health Prod.* 50(4):831-836, Apr. 2018.

SONENSHINE, D. E. Ecology of the American dog tick, *Dermacentor variabilis*, in a study area in Virginia. Studies on population dynamics using radioecological methods. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 65, p. 1165-1175, 1972.

SONENSHINE, D. E.; HYNES, W. L.; CERAUL, S. M.; MITCHELL, R.; BENZINE, T. Host blood proteins and peptides in the midgut of the tick *Dermacentor variabilis* contribute to bacterial control. *Exp Appl Acarol.* 36:207–23, 2005.

SORENSEN, K.; NEELY, D. P.; GRAPPELL, P. M.; READ, W. Lyme disease antibodies in thoroughbred broodmares, correlation to early pregnancy failure. *Equine Veterinary Science*, v. 10, p. 166-168, 1990.

SOUZA, C. E.; MORAES-FILHO, J.; OGRZEWALSKA, M.; UCHOA, F. C.; HORTA, M. C.; SOUZA, S. S.; BORBA, R. C.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and

evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. *Vet Parasitol.* 6;161(1-2):116-21, Apr. 2009.

SPOLIDORIO, M. G.; LABRUNA, M. B.; MANTOVANI, E.; BRANDAO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J.; YOSHINARI, N. H. Novel spotted fever group rickettsiosis, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 16(3):521-523, 2010.

STAFFORD III, K. C.; BLADEN, V. C.; MAGNARELLI, L. A. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds (Aves) and white-footed mice in Lyme, CT. *Journal of Medical Entomology*, v. 32, p. 453-466, 1995.

STEERE, A. C.; MALAWISTA, S. E.; HARDIN, J. A.; RUDDY, S.; ASKENASE, P.W.; ANDINAN, W. A. Erythema Chronicum migrans and Lyme arthritis: the enlarging clinical spectrum. *Annals of Internal Medicine*, v. 86, p. 685, 1977a.

STEERE, A. C.; MALAWISTA, S. E.; SNYDMAN, D. R.; SHOPE, R. E.; ANDINAN, W. A.; ROSS, M. R.; STEERE, R. M. Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. *The Arthritis Rheumatology*, v. 20, p. 7, 1977b.

STEERE, A. C. Lyme disease. *The New England Journal of Medicine*, v.321, p.586-96, 1989.

STEERE, A. C.; COBURN, J.; GLICKSTEIN, L. The emergence of Lyme disease. *The Journal of Clinical Investigation*, New Haven, v. 113, n. 8, p. 1093-1101, Apr. 2004.

STEERE, A. C.; STRLE, F.; WORMSER, G. P.; HU, L. T.; BRANDA, J. A.; HOVIUS, J. W.; LI, X.; MEAD, P. S. Lyme borreliosis. *Nat Rev Dis Primers.* 15; 2:16090, Dec. 2016.

STEWART, P. E.; BYRAM, R.; GRIMM, D.; TILLY, K.; ROSA, P. A. The plasmids of *Borrelia burgdorferi*: essential genetic elements of a pathogen. *Plasmid*, v. 53, p. 1-13, 2005.

STUEN, S. *Anaplasma phagocytophilum* – the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. *Veterinary Research Communications*, v. 31, p. 79–84, 2007.

STUEN, S.; GRØVA, L.; GRANQUIST, E. G.; SANDSTEDT, K.; OLESEN, I.; STEINSHAMN, H. A comparative study of clinical manifestations, haematological and serological responses after experimental infection with *Anaplasma phagocytophilum* in two Norwegian sheep breeds. *Acta Vet Scand.* 53(1):8, 2011.

STUEN, S.; GRANQUIST, E. G.; SILAGHI, C. *Anaplasma phagocytophilum*- a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Front Cell Infect Microbiol*, 22;3:31, 2013.

SWANSON, S. J.; NEITZEL, D.; REED, K. D.; BELONGIA, E. A. Coinfections acquired from ixodes ticks. *Clin Microbiol Rev.* 19(4):708-27. Review, Oct. 2006.

SZABÓ, J.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Front Cell Infect Microbiol* 3:1–9, 2013.

TALHARI, S., De SOUZA, SANTOS, M. N.; TALHARI, C.; De LIMA FERREIRA, L. C.; SILVA Jr, R. M.; ZELGER, B.; MASSONE, C.; RIBEIRO-RODRIGUES, R. *Borrelia Burgdorferi* "sensu lato" in Brazil: Occurrence confirmed by immunohistochemistry and focus floating microscopy. *Acta Trop.* 115(3):200-4, Sep. 2010.

TAMEKUNI, K.; TOLEDO, R. D. O. S. S.; SILVA FILHO, M. D. E. F.; HAYDU, V. B.; PACHECO, R. C.; CAVICCHIOLI, J. H.; LABRUNA, M. B.; DUMLER, J. S.; VIDOTTO, O. Serosurvey of antibodies against spotted fever group



*Rickettsia* spp. in horse farms in Northern Paraná, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet, v. 19, p. 259-261, 2010.

TEIXEIRA, R. C. Estudo da interação de *Borrelia burgdorferi* e *Borrelia anserina* (SPIROCHAETALES: SPIROCHAETACEAE) com diferentes linhagens de células de carrapatos (ACARI: IXODIDAE). 2014. 60f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2014.

TELFORD III, S. R.; SPIELMAN, A. Competence of a rabbit-feeding Ixodes (Acari: Ixodidae) as a vector of the Lyme disease spirochete. J Med Entomol. 26(2):118-121, 1989.

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.

TELFORD, S. R.; DAWSON, J. E.; KATAVLOS, P.; WARNER, C. K.; KOLBERT, C. P.; PERSING, D. H. Perpetuation of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer tick-rodent cycle. Proc Nat Acad Sci USA, v. 93, p. 6209–6214, 1996.

TILLY, K.; ROSA, P. A.; STEWART, P. E. Biology of Infection with *Borrelia burgdorferi*. Infectious Disease Clinics of North America, Philadelphia, v. 22, n. 2, p. 217-234, June. 2008.

TILLY, K.; BESTOR, A.; ROSA, P. A. Lipoprotein succession in *Borrelia burgdorferi*: Similar but distinct roles for OspC and VlsE at different stages of mammalian infection. Mol Microbiol 89:216–227, 2013.

TOLEDO, R. S.; TAMEKUNI, K.; SILVA FILHO, M. F.; HAYDU, V. B.; BARBIERI, A. R. M.; HILTEL, A. C.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B.; DUMLER, J. S.; VIDOTTO, O. Infection by spotted fever Rickettsiae in people,

dogs, horses and ticks in Londrina, Parana state, Brazil. *Zoonoses and Public Health*, v. 58, n. 6, p. 416- 423, Sept. 2011.

TUOMI, J.; VON BONSDORFF, C. H. Electron microscopy of tick-borne fever agent in bovine and ovine phagocytizing leukocytes. *J. Bacteriol*, v. 92, p. 1478–1492, 1966.

TZIANABOS, T.; ANDERSON, B. E.; MCDADE, J. E. Detection of *Rickettsia rickettsii* DNA in Clinical Specimens by Using Polymerase Chain Reaction Technology. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 27, p. 2866-2868, 1989.

UEHLINGER, F. D.; CLANCEY, N. P.; LOFSTEDT, J. Granulocytic anaplasmosis in a horse from Nova Scotia caused by infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Canadian Veterinary Journal*, v. 52, p. 537–540, 2011.

UENO, T. E. H. Infecção experimental de equinos por *Rickettsia rickettsii* e avaliação da transmissão para carrapatos *Amblyomma cajennense*. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 2014.

UENO, T. E.; COSTA, F. B.; MORAES-FILHO, J.; AGOSTINHO, W. C.; FERNANDES, W. R.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of horses with *Rickettsia rickettsii*. *Parasit Vectors*. 13; 9: 499, Sep. 2016.

VELHO, P. B. Diagnóstico molecular de *Anaplasma marginale* em bovinos e *Anaplasma phagocytophilum* em ovinos e caracterização de genes codificantes para proteínas de membrana de *A. marginale* em bovinos no estado do Rio de Janeiro: PhD thesis. Fluminense Federal University, Faculty of Veterinary Medicine, 2013.

VERONESI, F.; PASSAMONTI, F.; MORETTI, A.; MORGANTI, G.; VARDI, D. M.; LAUS, F.; MARENZONI, M. L.; SPATERNA, A.; COLETTI, M.; FIORETTI, D. P. Evaluation of the Performance of a Rapid Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in the Detection of *Anaplasma phagocytophilum* Antibodies in Horses. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. v. 14, p. 317-323, 2014.

VERONEZ, V. A.; FREITAS, B. Z.; OLEGARIO, M. M. M.; CARVALHO, W. M.; PASCOLI, G. V. T.; THORGA, K.; GARCIA, M. V.; SZABO, M. P. J. Ticks (Acari: Ixodidae) within various phytophysiognomies of a Cerrado reserve in Uberlandia, Minas Gerais, Brazil. *Experimental and Applied Acarology*, v. 50, n. 2, p. 169-179, Feb. 2010.

VIANNA, M. C.; HORTA, M. C.; SANGIONI, L. A.; CORTEZ, A.; SOARES, R. M.; MAFRA, C. L.; GALVAO, M. A.; LABRUNA, M. B.; GENNARI, S. M. *Rickettsia*, spotted fever in capoeirão village, Itabira, Minas Gerais, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 50, n. 5, p. 297-301, Sept. -Oct. 2008.

VIEIRA, T. S.; VIEIRA, R. F.; KRAWCZAK, F. S.; SOARES, H. S.; GUIMARÃES, A. M.; BARROS-FILHO, I. R.; MARCONDES, M.; LABRUNA, M. B.; BIONDO, A. W.; VIDOTTO, O. *Ehrlichia* sp. infection in carthorses of low-income owners, Southern Brazil. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, v. 48, p. 1-5, 2016.

VIVAS, R. I. R.; AGUILAR, F. C.; ALPIZAR, J. L. D.; GALERA, L. A. C.; CALDERÓN, J. J. S. Detección de espiroquetas del género *Borrelia* en hemolinfas de teleoginas de *Boophilus microplus* en el estado de Yucatán, México. *The Veterinaria México*, v. 27, p. 187-188, 1996.

VON LOEWENICH, F. D.; BAUMGARTEN, B. U.; SCHRÖPPEL, K.; GEISSDÖRFER, W.; RÖLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. High Diversity of ankA sequences of *Anaplasma phagocytophilum* among Ixodes ricinus ticks in Germany. *J Clin Microbiol*, v. 41, p. 2033-5040, 2003.

WAGNER, B.; GLASER, A.; BARTOL, J.; Mahar, O.; Johnson Amy, L.; Divers, T. A new sensitive Lyme multiplex assay to confirm neuroborreliosis in horses: A case report. *Proc Am Assoc Equine Pract* 57:70–75, 2011.

WALKER, D. H.; DUMLER, J. S. Emergence of the ehrlichiosis as human health problems. *Emerg Infect Dis*, v.2, p.18-29, 1996.

WALKER, D. H. Rickettsiae and rickettsial infections: the current state of knowledge. *Clinical Infectious Diseases*, v. 45, p. 39-44, July. 2007.

WALLICH, R.; HELMES, C.; SCHAIBLE, U. E.; LOBET, Y.; MOTER, S. E.; KRAMER, M. D.; SIMON, M. M. Evaluation of genetic divergence among *Borrelia burgdorferi* isolates by use of OspA, fla, HSP60, and, HSP70 gene probes. *Infection and Immunity*, v. 60, n. 11, p. 4856-4866, 1992.

WODECKA, B. Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA in *Ixodes ricinus* ticks in North-western Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, v. 10, p. 171-178, 2003.

WOLBACH, S. B. Studies on Rocky Mountain spotted fever. *The Journal of Medical Research*, v. 41, n. 1, p. 1-198, Nov. 1919.

WOLDEHIWET, Z.; SCOTT, G. R. Stages in the development of *Cytoecetes phagocytophila*, the causative agent of tick-borne fever in sheep. *J. Comp. Pathol*, v. 92, p. 469–474, 1982.

WOLDEHIWET, Z. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Veterinary Parasitology*. v. 167, p. 108–122, 2010.

WOUDA, W.; SCHILLHORN, V. A. N.; VEEN, T. W.; BARNES, H. J. *Borrelia anserina* in chicken previously exposed to *Borrelia theileri*. *Avian Dis.* 19(1):209-10, Jan-Mar. 1975.

YBAÑEZ, A. P.; SATO, F.; NAMBO, Y.; FUKUI, T.; MASUZAWA, T.; OHASHI, N.; MATSUMOTO, K.; KISHIMOTO, T.; INOKUMA, H. Survey on tick-borne pathogens in thoroughbred horses in the Hidaka district, Hokkaido, Japan. *J Vet Med Sci*, v. 75, p. 11-15, 2013.

YOSHINARI, N. H.; STEERE, A. C.; COSSERMELLI, W. Revisão da borreliose de Lyme. *Rev Assoc Med Bras*. 35:34–38, 1989.

YOSHINARI, N. H.; BARROS, P. J. L.; CRUZ, F. C. M.; OYAFUSO, L. K.; MENDONÇA, M.; BAGGIO, D.; et al. Clínica e sorologia da doença de Lyme no Brasil. *Rev Bras Reumatol*. 32(Supl):57, 1992.

YOSHINARI, N. H.; BARROS, P. J. L.; BONOLDI, V. L. N.; ISHIKAWA, M.; BATTESTI, D. M. B; PIRANA, S.; FONSECA, A. H.; SCHUMAKER, T. T. Perfil da Borreliose de Lyme no Brasil. *Revista Hospital das Clínicas Fac. Med*. v. 52, p. 111-117, 1997.

YOSHINARI, N. H.; BARROS, P. J. L.; GAUDITANO, G.; FONSECA, A. H. Report of 57 cases of Lyme-like disease (LLD) in Brazil. *Arthritis Rheum*. (Suppl) 43: S188, 1999a.

YOSHINARI, N. H.; BONOLDI, V. L. N.; BARROS-BATTESTI, D. M.; SCHUMAKER, T. T. S. Doença de Lyme-símile no Brasil. *Rev Bras Reumatol*. 39(2):57-8, 1999b.

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

YOSHINARI, N. H.; MANTOVANI, E.; BONOLDI, V. L. N.; MARANGONI, R. G.; GAUDITANO, G. Doença de Lyme-símile brasileira ou Síndrome Baggio-

Yoshinari: zoonose exótica e emergente transmitida por carrapatos. Revista da Associação Médica Brasileira, v. 56, n. 3, p. 363-369, 2010.

ZHAN, L.; CHU, C.; ZUO, S.; WUA, X.; DUMLER, J. S.; JIA, N.; JIANG, B.; YANG, H.; CAO, W. *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in rabbits from southeastern China. Veterinary Parasitology, v. 162, n. 3-4, p. 354–356, 2009.

ZHI, N.; OHASHI, N.; TAJIMA, T.; MOTT, J.; STICH, R. W.; GROVER, D.; TELFORD, S. R. 3RD; LIN, Q.; RIKIHISA, Y. Transcript heterogeneity of the p44 multigene family in a human granulocytic ehrlichiosis agent transmitted by ticks. Infect Immun. 70(3):1175-84, Mar. 2002.

ZIMMERMAN, K. L.; CRISMAN, M. V. Diagnostic Equine Serology. Vet Clin Equine, v.24, p.311-334, 2008.

ZUNG, J. L.; LEWENGRUB, S.; RUDZINSKA, M. A.; SPIELMAN, A.; TELFORD, S. R.; PIESMAN, J. Fine structural evidence for the penetration of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* through the gut and salivary tissues of *Ixodes dammini*. Can. J. Zool. 67: 1737–1748, 1989.

# CAPÍTULO 1

## Submitted to Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports

Tick-borne zoonotic agents infecting horses from an urban area in Midwestern Brazil: epidemiological and hematological features.

João Bosco Vilela Campos<sup>a</sup>, Marcos Rogério André<sup>b</sup>, Carina Elisei de Oliveira<sup>a</sup>, Filipe Martins Santos<sup>a</sup>, Amanda Alves Taveira<sup>a</sup>, João Roberto de Oliveira<sup>a</sup>, Matheus Dias Cordeiro<sup>c</sup>, Ana Claudia Calchi<sup>b</sup>, Luiz Ricardo Gonçalves<sup>b</sup>, Lina de Campos Binder<sup>d</sup>, Maria Carolina de Azevedo Serpa<sup>d</sup>, Amália Regina Mar Barbieri<sup>d</sup>, Marcelo B. Labruna<sup>d</sup>, Rosângela Zacarias Machado<sup>b</sup>, Gisele Braziliano de Andrade<sup>a</sup>, Heitor Miraglia Herrera<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> University Católica Dom Bosco, Department of Biosaúde, Laboratory Insana Huna, Interface between Animal, Environmental and Human Health, Brasil

<sup>b</sup> University Estadual Paulista – Department of Patology, Immunoparasitology Laboratory, Campus Jaboticabal, Brasil

<sup>c</sup> University Federal Rural do Rio de Janeiro, Laboratory of Parasitic Diseases, Brasil

<sup>d</sup> University of São Paulo, Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health, Brasil

\* Corresponding author at: University Católica Dom Bosco, Department of Biosaúde, Laboratory Insana Huna, Interface between Animal, Environmental and Human Health, Brasil. E-mail address: [herrera@ucdb.br](mailto:herrera@ucdb.br) (H. Herrera).

Declarations of Interest: none

### *Abstract*

The emergence of tick-borne diseases has been reported as a serious problem in public health worldwide. We aimed to perform an epidemiological study of tick-borne zoonotic *Rickettsia* spp., *Borrelia* spp. and Anaplasmatidae, in horses from Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Midwestern Brazil. We also evaluated whether *Borrelia* spp. and Anaplasmatidae may be associated with hematological disorders in the sampled animals. EDTA-whole blood and serum samples as well ticks were collected from 262 horses. Serum samples were used to perform serological tests, and hematological analyses were made using whole blood. Furthermore, DNA extracted from whole blood



and ticks were used to molecular tests. Campo Grande is enzootic for tick-borne studied bacteria, since we found an overall exposure of 59.9% of the sampled horses, 28.7% of them presented co-exposure. Seropositivity rates of 20.6% for *Borrelia* spp., 25.6% for *Rickettsia* spp. and 31.6% for Anaplasmataceae were found in sampled horses. Considering both molecular and serological tests for *Borrelia* spp., the infection rate was 48.0% (126/262). None of the tested horses showed molecular positivity for *Anaplasma phagocytophilum*. The horses sampled displayed 7.2% of parasitism by ixodid ticks in single and coinfections with *Amblyomma sculptum*, *Dermacentor nitens* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. We did not find DNA of any studied bacteria in the sampled ticks. Positive horses for *Borrelia* spp. and Anaplasmataceae agents displayed leukopenia, monocytopenia and lymphopenia. Together, our results suggest that horses in Midwest Brazil may play a role as sentinel host for zoonotic bacteria and *Borrelia* spp. and Anaplasmataceae agents can impair the health of horses.

#### *Keywords*

Anaplasmataceae agents; *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., sentinel hosts.

#### *1. Introduction*

Horses have been reported infected with *Anaplasma phagocytophilum* and exposed to *Borrelia burgdorferi* and *Rickettsia rickettsii*, etiological agents of human granulocytic anaplasmosis (HGA), Lyme borreliosis (LB) and Brazilian spotted fever (BSF), respectively (Souza et al., 2016; Socoloski et al., 2018; Dos Santos et al., 2019). Ixodid tick vectors play an important role in the maintenance of these bacteria in endemic areas through efficient transmission mechanisms, such as transovarian transmission in the case of *Rickettsia* spp., (Piranda et al., 2011) and transstadial perpetuation in the cases of *A. phagocytophilum* and *Borrelia* spp. (Pusterla et al., 2002; Cordeiro et al., 2018). The role of ticks in the transmission of *B. burgdorferi* sensu lato (s.l.) or *A. phagocytophilum* (previously known as *Ehrlichia equi*) in Brazil remains unproven (Abel et al., 2000; Salvagni et al., 2010), in contrast to *Ixodes* spp. ticks in the northern hemisphere (Franke et al., 2013; Dugat et al., 2015). The species *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* has been registered as a vector of *Borrelia theileri* to cattle and horses in the Brazilian territory, maintaining this bacterium by transovarian transmission (Yparraquirre et al., 2007; Cordeiro et al., 2018). *Rickettsia rickettsii*, the agent of BSF is

transmitted by *Amblyomma sculptum*, *Amblyomma aureolatum* and *Rhipicephalus sanguineus* (s.l.) (De Oliveira et al., 2019).

In the state of Mato Grosso do Sul (MS), Midwestern Brazil, serological and molecular evidences of *B. burgdorferi* (s.l.) have been reported in humans (Resende et al., 2016; Lopes et al., 2017). Furthermore, the occurrence of *Rickettsia* species in the state of MS has been recorded in small wild mammals and in large wild rodent capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), which have been reported as amplifying hosts for *R. rickettsii* (Souza et al., 2009), *Amblyomma* spp., *R. sanguineus*, and humans (De Almeida et al., 2013; Matias et al., 2015; Binder et al., 2017; De Sousa et al., 2018). Serological evidence of exposure to *A. phagocytophilum* was reported in Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) in the state of MS. Additionally, 16S rRNA Anaplasmataceae genotypes have been detected in dogs, coatis (*Nasua nasua*) and *A. sculptum* ticks in the Pantanal region, MS (Sacchi et al., 2012; André, 2018).

As horses do not present persistent bacteremia of *A. phagocytophilum* and *B. burgdorferi* (s.l.) (Burbelo et al., 2011; Socoloski et al., 2018; Dos Santos et al., 2019) and in the case of *R. rickettsii*, these animals are considered refractory to infection (Ueno et al., 2016), infected or exposed horses by these bacteria have been designated as sentinel hosts in endemic areas (Souza et al., 2016; Socoloski et al., 2018; Dos Santos et al., 2019). The aim of this study was to investigate the role of horses and their related ticks in the epidemiology of these zoonotic tick-borne bacteria in Campo Grande, MS, Midwestern Brazil. The association between serological exposure and/or molecular positivity for the selected agents with hematological parameters in infected horses were also assessed.

## 2. Methods

### 2.1. Site collection and field procedures

This study was performed in the municipality of Campo Grande, MS, Midwestern Brazil. Between November 2017 and April 2018, whole blood, serum samples and ticks were collected from 262 horses that had been raised in that region. The animals were maintained in the facilities of the Jockey Club, equestrian riding school and military police. Sampling was carried out by the non-probabilistic method (Stevenson, 2005).

## 2.2. *Identification of collected ticks*

Ticks parasitizing horses were collected after a visual inspection of 60 seconds and identified using previously published dichotomous keys (Barros-Battessti et al., 2006; Nava et al., 2014).

## 2.3. *Hematological analysis*

Horse blood samples were collected in tubes with and without ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA). In the first six hours after blood collection, the packed cell volume (PCV) was quantified using microhematocrit technique; the red blood cells (RBC) and white blood cells (WBC) were counted using an automated hematology analyzer (pocH-100iV Diff Veterinary Hematology Analyzer, Sysmex®). The determination of total plasma proteins (TPP) was performed by manual refractometry, and fibrinogen (FIBRI) was assessed by heat precipitation technique in a water bath at 57°C for three minutes (Kaneko et al., 1997). The monocytes, lymphocytes, neutrophils, eosinophils, and basophilic counts were performed by counting 100 leukocytes in a blood smear stained by the rapid method (Fast Panotic LB®), under light microscopy (1,000x).

We used the values of RBC, PCV, hemoglobin, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) as indicators for anemia rates; monocytes and neutrophils count as indicators for infection responses; lymphocytes count as indicators of immune investment; and fibrinogen and platelets count as indicators of coagulation (Kaneko et al., 1997; Parreira et al., 2016).

## 2.4. *Indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies anti-B. burgdorferi*

Serum samples collected from horses were subjected to an ELISA assay using *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s.) antigen G39/40 strain diluted to 20mg/mL according to Socoloski et al. (2018). The sensitivity of the assay ranged from 82.6 to 100% in the analyses for IgG antibodies, according to Magnarelli et al. (1994).

The horse sera used as positive and negative controls (Socoloski et al., 2018) belonged to the serum bank of the Laboratory of Parasitic Diseases at the Federal Rural University of Rio de Janeiro (LDP-UFRRJ). Twelve negative controls and two positive control sera were used per plate. The cutoff point value was calculated based on the t-Student distribution with a 99.99% confidence interval, determined with the mean of the negative controls plus three times the standard deviation of the optical density (OD) values of the negative controls of each reaction. Still, to correct the OD of each plate, the cutoff value was equal to 100, following the formula: (test serum OD  $\times$  100 / cutoff). The results of OD of the sera of the animals tested in the present study were expressed following the formula proposed by Frey et al. (1998) as an optical density index (ODI).

#### 2.5. *Indirect Immunofluorescence Antibody Test (IFAT) for detection of IgG antibodies against Rickettsia spp. and A. phagocytophilum*

In order to detect IgG antibodies to *Rickettsia* spp. of the spotted fever group (SFG), slides containing crude antigens derived from three *Rickettsia* isolates from Brazil - *R. rickettsii* strain Taiacu, *R. parkeri* strain At24 and *R. amblyommatidis* strain Ac37 - were used (Labruna et al., 2004; Pinter and Labruna, 2006; Silveira et al., 2007). On each slide, previously determined non-reactive and reactive serum samples to SFG rickettsiae functioned as negative and positive controls, respectively. The slides were incubated with fluorescein isothiocyanate labeled anti-horse IgG (Sigma®- Aldrich, St. Louis, USA) and examined under a fluorescence microscope (Olympus®, Tokyo, Japan). The *Rickettsia* species identification and cutoff (1:64) were determined according to Horta et al. (2007).

Aiming to detect anti-*A. phagocytophilum* IgG antibodies, we used antigen (Webster strain, kindly supplied by Dr. John Stephen Dumler, from Uniformed Services University of the Health Sciences) obtained from HL-60 cellular culture in the Immunoparasitology Laboratory of University Estadual Paulista, UNESP Jaboticabal, São Paulo, Brazil. Positive and negative Chilean equine serum samples for *A. phagocytophilum* were used as controls (Hurtado et al., 2020). The cutoff of the test was 1:64.

## 2.6. DNA extraction

DNA extraction from the EDTA-whole blood of horses was performed using the phenol chloroform protocol (Sambrook et al., 1989). For tick DNA extraction, the GT (Guanidine) protocol, as adapted by Sangioni et al. (2005), was performed. DNA concentration and absorbance ratio (260/280nm) were measured using a spectrophotometer (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific, USA).

## 2.7. Conventional PCR assays

To detect *Borrelia* spp. DNA, a conventional polymerase chain reaction (cPCR) was performed using primers that amplify a 500bp fragment of the coding region of the conserved 23S rRNA gene: Fwd (5' - TAC CCA GCA CTT ACC CTT GG - 3') and Rev (5' - AGT GCC AGG TGG GTA GTT TG - 3') (National Institute of Industrial Property - INPI - Case BR 10 2016 021522 6). The DNA samples used as positive controls were isolated from *B. burgdorferi* (s.s.) strain G39/40 provided by Dr. Matheus Dias Cordeiro from LDP-UFRRJ. The PCR reaction was conducted according Sal et al. (2008). For the detection of *Anaplasma* spp. in horses, a nested PCR assay (nPCR) was performed using primers directed to the 16S rRNA gene to amplify 932bp and 546bp, according to Massung et al. (1998). *A. phagocytophilum* DNA used as positive control was kindly provided by Prof. Dr. John Stephen Dumler (Uniformed Services University of the Health Sciences, Bethesda, Maryland, USA).

The molecular testing of horses' ticks was performed using the rickettsial *ompA* gene (Regnery et al., 1991; Roux et al., 1996), and DNA of *R. parkeri* strain NOD was used as positive control (Labruna et al., 2007) (For primer list, see Supplementary file 1: Table S1). Sterile ultrapure water was used as a negative control. We did not perform molecular tests for *Rickettsia* spp. from horses' blood samples due to the absence of rickettsemia in these animals, when experimentally infected with *R. rickettsii* (Ueno et al., 2016).

## 2.8. Real-time PCR assay for *A. phagocytophilum*

To detect *A. phagocytophilum*, a quantitative polymerase chain reaction (qPCR) assay was performed, using primers: Fwd (5' - AGT TTG ACT GGA ACA CAC CTG ATC - 3') and Rev (5' - CTC GTA ACC AAT CTC AAG CTC AAC - 3') and probe [FAM] TTA AGG ACA ACA TGC TTG

TAG CTA TGG AAG GCA [TAMRA] directed to the coding region of the *msp-2* gene, according to Drazenovich et al. (2006). Plasmids (IDT psmart, Integrated DNA Technologies®) containing the target sequences and diluted from  $10^7$  to  $10^0$  were used as positive controls. The negative control used in the reaction was sterile ultrapure water.

#### 2.9. *Purification, sequencing, and BLAST analysis of the obtained amplicons*

The product of *Borrelia* spp. 23S rRNA amplicons were purified by enzymatic treatment with ExoProStar™ (GE Healthcare), in accordance with the manufacturer's recommendations. The amplicons were sequenced in both directions using an automated system based on the dideoxynucleotide chain-termination method Sanger et al. (1977).

The quality of the electropherograms obtained through the sequencing of the amplified products was visually analyzed using the program FinchTV 1.4.0. In addition, consensus sequences were obtained by analysis of the forward sequences using the CAP3 program (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/MobylyePortal/portal.py>). In order to perform sequence identity analysis, the amplified gene fragments were compared with those previously deposited in GenBank using the basic local alignment search tool (BLASTn) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Finally, the obtained sequences were individually aligned with other sequences available from GenBank using ClustalW (Thompson et al., 1994) and adjusted with BioEdit 7.0.5.3 (Hall, 1999).

#### 2.10. *Statistical analysis*

Descriptive statistic (mean and confidence interval) was applied to obtain the mean of hematological variables. The Shapiro-Wilk test served to establish whether the distribution was normal. Since horses are refractory to *Rickettsia* spp., seropositive animals were not included in hematological analysis. Therefore, a Kruskal-Wallis test was applied to determine the differences among negative animals, *Borrelia* spp. and *Anaplasma* spp. positive animals. *Post hoc* Mann-Whitney tests were used to assess pair-wise results of the Kruskal-Wallis test. Finally, the Spearman correlation test was performed to assess whether there was a significant association between seropositivity of the three

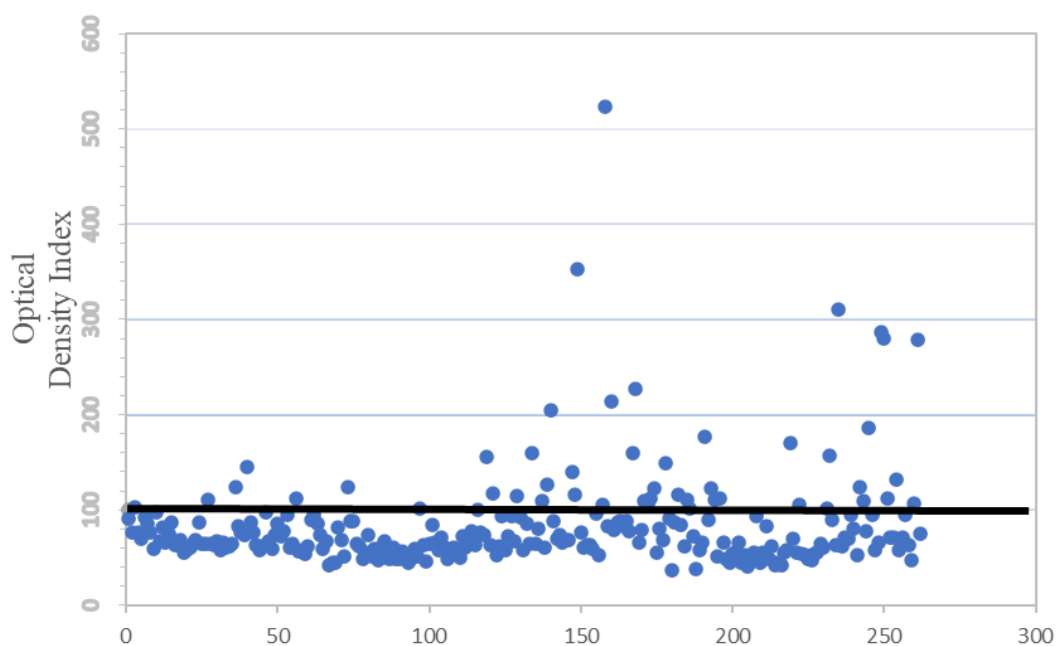
bacteria studied, as well as among seropositivity for *Rickettsia* spp. and *A. phagocytophilum* and molecular positivity for *Borrelia* spp. in the sampled horses.

The determination of the influences of exposure to *A. phagocytophilum* and positivity for *Borrelia* spp. in relation to anemia rates, infection responses, immune investment, Coagulation and TPP, was carried out by Path Analysis. To reduce dimensions of anemia rates, infection responses, immune investment, and coagulation values, we used the Principal Coordinate Analysis (PCA), a geometric technique that converts a matrix of distances between points in multivariate space into a projection that maximizes the amount of variation along a series of orthogonal axes. We used an  $r$  value  $\geq 0.60$  to interpret the results (positive or negative effect) of the Path Analysis. The variables were statistically significant for its  $p$  values  $\leq 0.05$ . All data were analyzed using R 3.6.1 (R Development Core Team, 2015).

### 3. Results

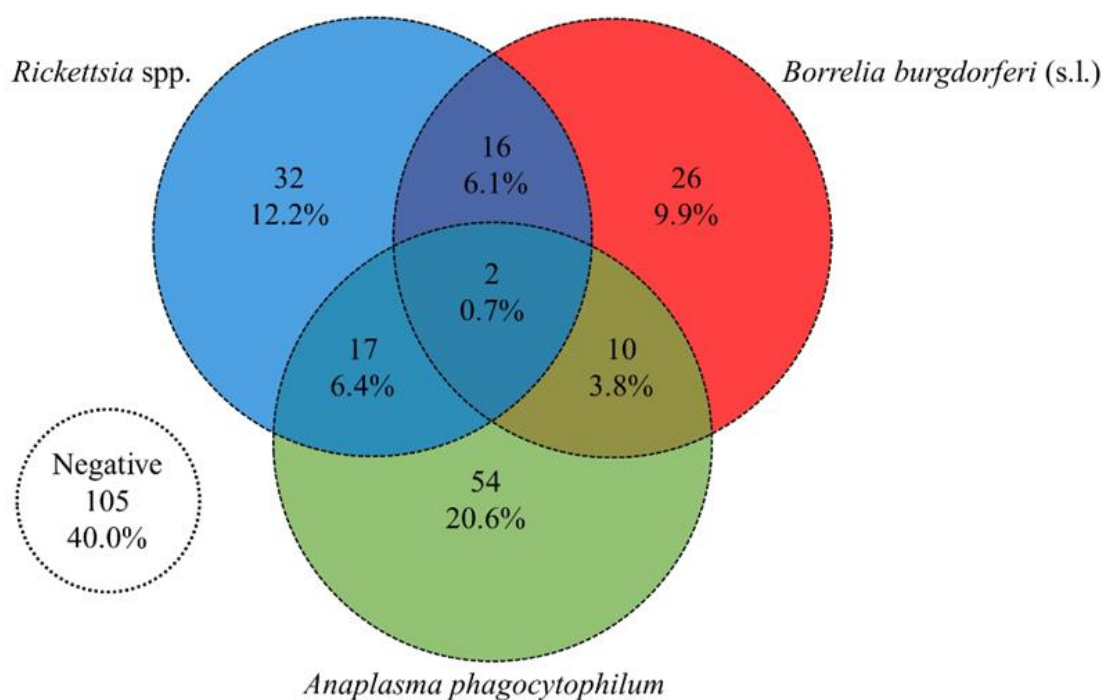
Overall, 25.6% (67/262) of the sampled horses were seropositive for *Rickettsia* spp. Among them, 19.8% (52/262) showed seropositivity for *R. rickettsii*, 16.7% (44/262) for *R. parkeri* and 17.5% for (46/262) *R. amblyommatis* (Table 1). Moreover, 75.0% of seropositive horses for *R. rickettsii* and *R. parkeri* showed serological titers lower than 1:256 (Table 1). A seroprevalence of 31.6% (83/262) was recorded for *A. phagocytophilum*, high number of the seropositive animals (85.4%) with low serological titers (1:64 and 1:128) (Table 1).

The search for anti-*B. burgdorferi* (s.l.) antibodies revealed that 20.6% (54/262) of the sampled horses were reactive. Although the optical density index ranged from 36.30 to 522.91, they were low for most seropositive horses (Fig. 1).



**Figure 1.** Distribution of the optical density indexes of the test sera in relation to the cut-off point ( $DO \times 100 / \text{cut-off point}$  [black line]) obtained from the indirect ELISA assay for antibodies anti-*B. burgdorferi* in horses sampled between November 2017 and April 2018, in Campo Grande, Midwest Brazil.

Overall, 59.9% (157/262) of the sampled horses were seropositive for vector-borne agent, in single ( $n=112$ ) and co-exposure ( $n=45$ ) (Fig. 2).





**Figure 2.** Three-way Venn diagram illustrating single and co-reactivity for *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* (s.l.) and *Rickettsia* spp. in 262 horses sampled in Campo Grande, Midwest Brazil, between November 2017 and April 2018. Data were expressed by the total numbers followed by the percentage of occurrence.

The molecular test showed positivity of 32.4% (85/262) for *Borrelia* spp. Some amplified samples were sequenced and deposited in the GenBank database with access numbers: MN539985, MN539986 and MN539988. Considering the positivity in the molecular and serological tests for *Borrelia* spp., we found the occurrence rate of 48.0% (126/262). Table 2 shows the patterns of *Borrelia* spp. infection in horses in Campo Grande, MS. None of the horses sampled showed molecular positivity for *Anaplasma* spp. in the nPCR and *A. phagocytophilum* test for the qPCR assay based on the 16S rRNA and the *msp-2* gene, respectively.

It was observed tick infestations in 7.2% (19/262) of the sampled horses, by *Amblyomma sculptum* (5 males and 3 females), *Dermacentor nitens* (16 males and 16 females), *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (5 males and 32 females) and immature forms of *Amblyomma* spp. (1 nymph), *D. nitens* (36 nymphs) and *R. (B.) microplus* (19 nymphs). The presence of single or co-infestations by ticks in equines are showed in Supplementary file 2: Table S2.

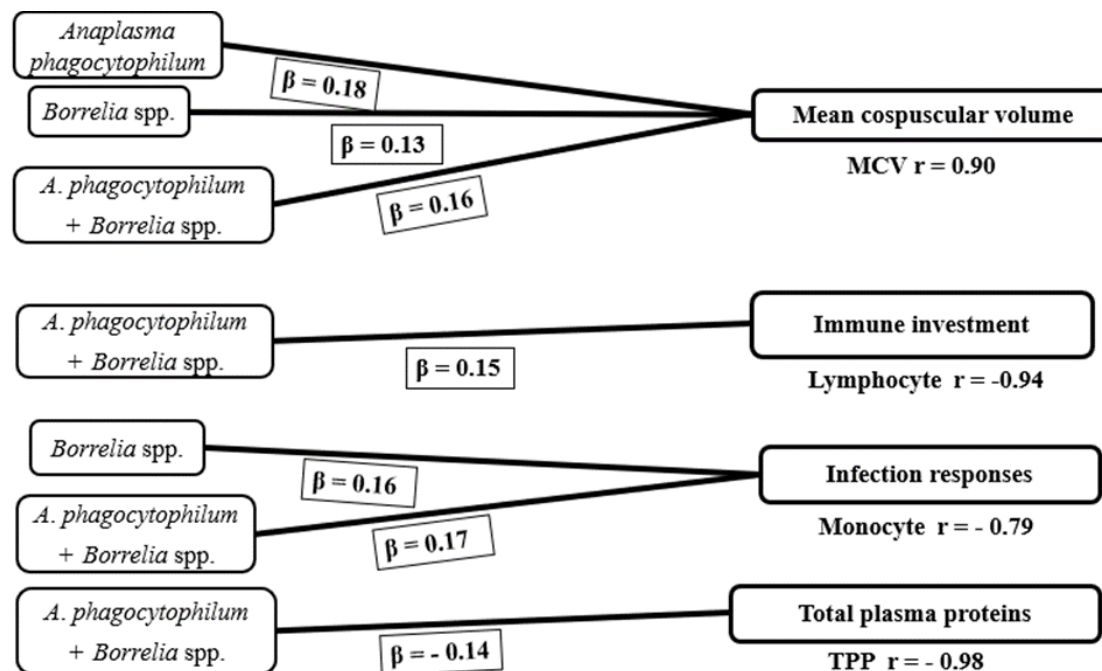
Among horses that presented positivity for *Borrelia* spp. (n=126), we observed that six (7.6%) were infested by adults of *A. sculptum*, and *R. (B.) microplus*, and *Amblyomma* spp. and *R. (B.) microplus* nymphs. Furthermore, in horses seropositive for *Rickettsia* spp. and *A. phagocytophilum*, we found, respectively, ten (14.9%) and six (7.2%) infested by adults and immature forms for both *A. sculptum*, *D. nitens* and *R. (B.) microplus*. The molecular tests performed in the sampled ticks did not show the presence of the DNA of any vector-borne bacteria addressed in the present study.

The hematological indexes of sampled horses showed that *A. phagocytophilum* seropositive horses displayed significant decrease of WBC. Moreover, animals that displayed positivity in the molecular and serological tests for *Borrelia* spp. and co-exposed to *A. phagocytophilum* displayed a significant decrease of monocyte count. In addition, positive horses by *Borrelia* spp., and exposed and co-exposed with *A. phagocytophilum* resulted in a significant increase of MCV values. The means

of hematological parameters of all horses included in this study are listed in Supplementary file 3: Table S3.

Path Analysis showed a positive influence of (i) *A. phagocytophilum* seropositivity (Path Coefficient = 0.18,  $p < 0.05$ ); (ii) horses positive by *Borrelia* spp. (Path coefficient = 0.13,  $p < 0.05$ ); and (iii) serological exposure to *A. phagocytophilum* and positivity to *Borrelia* spp. (Path coefficient = 0.16,  $p < 0.05$ ) on Anemia Indicator, expressed by direct increase of MCV ( $r=0.90$ ) (Figure 3). Additionally, our results showed that horses seropositive for *A. phagocytophilum* and positive to *Borrelia* spp. (Path coefficient = 0.15,  $p < 0.05$ ) had a negative influence on Immune investment expressed by decrease of Lymphocytes count ( $r = -0.94$ ) (Fig. 3).

Furthermore, *Borrelia* spp. positive animals (Path coefficient = 0.16,  $p < 0.05$ ) and seropositivity for *A. phagocytophilum* and *Borrelia* spp. (Path coefficient = 0.17,  $p < 0.05$ ) resulted in the negative influence on the infection response, expressed by decrease the monocyte count ( $r = -0.79$ ). Also, *A. phagocytophilum* with *Borrelia* spp. (path coefficient = -0.14,  $p < 0.05$ ) had direct positive influence on TPP ( $r = -0.98$ ) (Fig. 3).



**Figure 3.** Schematic representation of some hematological parameters with single and multiple infection patterns among tick-borne agents in horses sampled in Campo Grande, Midwest Brazil, between November 2017 and April 2018.

#### 4. Discussion

Our results indicate that horses are constantly exposed to tick-borne bacteria in Campo Grande, Midwestern Brazil due to seropositivity of 59.9%, in single and multiple exposure. In this sense, horses can be considered sentinel hosts for the risk of infection by tick-borne bacteria to humans.

A general seroprevalence for *Rickettsia* spp. of 25.5% (67/262) in sampled horses, even in low serological titers, and of 88.2% (15/17) for tested capybaras (data not shown), suggests the circulation of rickettsial agents in the studied area. Moreover, our results showed that horses were exposed to different SFG rickettsiae, because of their serological reactivity to three species: *R. rickettsii* (19.8%), *R. parkeri* (16.7%) and *R. amblyommatis* (17.5%). These data, together with Alves et al. (2014), strengthens the occurrence of these rickettsial agents in the central west region of Brazil. Although we observed low infestations by *A. sculptum* in horses, probably due to good sanitary management to which the animals were submitted, we highlight the presence of *A. sculptum* because it is considered the main vector for *R. rickettsia*. Indeed, this tick species is found parasiting capybaras (Labruna et al., 2011; Szabó et al., 2013), a largest rodent extremely common in forest fragments in the CG that develop high rickettsia, and has anthropophilic habits (Souza et al., 2009; Polo et al., 2017; Ramírez-Hernández et al., 2020).

In the present study we observed exposure to *A. phagocytophilum* in 31.6% (83/262) of collected horses, nine seropositive animals showed high serological titers (1:512 to 1:8192). However, serological tests among Anaplasmataceae agents should be analyzed with caution, as the occurrence of cross-reactivity between species of *Anaplasma* and *Ehrlichia* has been reported in horses (Rolim et al., 2015; Vieira et al., 2016) and jaguars (Widmer et al., 2011). Additionally, we did not detect DNA of the *A. phagocytophilum* in the seropositive animals. In fact, the appropriate molecular target for *A. phagocytophilum* still represents a challenge for the diagnosis because genetic diversity according to their geographical distribution has been reported (De La Fuente et al., 2005; Silaghi et al., 2011). Herein, we used both 16S rRNA nested PCR and *msp-2* qPCR assays to screen the sampled horses for *Anaplasma* spp. Furthermore, experimental infection by *A. phagocytophilum* in horses showed that antibodies may persist for up to 300 days after inoculation, indicating that horses play a potential role as a sentinel of infections to human (Franzén et al., 2005; Franzén et al., 2009). The presence of antibodies to *A. phagocytophilum* might represent a serological cross reaction to *Ehrlichia* spp.

previously detected in horses from Brazil (Vieira et al., 2016) or to a new Anaplasmataceae agent yet to be described.

The occurrence of *B. burgdorferi* in Brazilian territory still remains unclear due to the lack of isolation. Only molecular evidence in humans and a serological study in horses were reported (Resende et al., 2016; Lopes et al., 2017; Socoloski et al., 2018). Because *B. theileri* parasites bovines, ovine, horses and *R. (B.) microplus*, in Brazil (Soares et al., 2000; Yparraguirre et al., 2007; Cordeiro et al., 2018), the seroprevalence of 20.6% found here may be due to cross-reactions with different species related to recurrent fever group (RFG) cannot be ruled out (Magnarelli et al., 1994; Rogers et al., 1999). In fact, we found low rates of optical density for most seropositive horses. Moreover, the DNA detected in sampled horses may be related to infection by *B. theileri* since (i) bacteremia during *B. burgdorferi* infection is related as absent or brief (Chang et al., 2000; Maraspin et al., 2011; Talagrand-Reboul et al., 2020), (ii) the primers used here do not distinguish *Borrelia* species, and (iii) we found *R. (B.) microplus* infesting horses. Lack of molecular positivity for *Borrelia* spp. in the sampled ticks is expected because its detection has been recorded as negative (Montandon et al., 2014). Besides, the presence of DNA of *Borrelia* spp. in 32.3% of sampled horses suggests that some reservoir mammals' species must be participating as amplifying hosts for *Borrelia* spp. (Radolf et al., 2012) in the studied area. The combination of both molecular and serological tests may help to understand the different epidemiological patterns in a given host population. For example, the occurrence of 57.1% (72/126) of positive horses with early infection reinforces the enzootic character of the studied area. Additionally, the presence of 32.5% of positive horses (41/126) with a sub-patent infection strongly suggests that seropositive horses that displayed negativity in the molecular test fail in the transmission of tick-borne agents.

The leukopenia recorded in the present study could probably be associated to lysis of infected cells. Furthermore, our analysis showed that positive horses by both *Borrelia* spp. and Anaplasmataceae resulted in negative influences on the response to infection as well as immune investment, expressed by monocytopenia and lymphopenia, respectively. The decrease of leucocytes was also observed in naturally equine granulocytic anaplasmosis by Gribble (1969) and McQuiston et al. (2003), and lymphopenia was also reported in equines experimentally infected with *A. phagocytophilum* by Franzén et al. (2005). On the other hand, the resultant of infections may present

differently as show by Saleem et al. (2018) that recorded leukocytosis due to lymphocytosis and monocytosis in horses naturally infected by *A. phagocytophilum*. The hyperproteinemia found in horses that had contact to both *Borrelia* spp. and Anaplasmataceae in the present study suggest an increase in the production of immunoglobulins. When considered separately, *A. phagocytophilum* naturally infected horses did not display hyperproteinemia (Siska et al., 2013).

The interpretation of hematological results under natural infections should be done with caution whenever the kinetics of infection and the presence of other unrelated agents are unknown. However, comparing negative with positive sampled horses, we found an increase of MCV, indicating macrocytic anemia, as a result of vitamin B12 deficiency (Satué et al., 2012). As the sampled animals had low fiber diet, and vitamin B12 is naturally produced in the large intestine of horses due to the digestion of fibrous, it is possible that vitamin B12 production could be compromised in these animals. Consequently, the observed increase in MCV values is most related to a low fiber diet than to the investigated bacteria.

## 5. Conclusion

The contact of horses with *Rickettsia* spp., Anaplasmataceae and *Borrelia* spp. (s.l.) strongly suggests that Campo Grande, Midwest region of Brazil, is an enzootic area for tick-borne zoonotic bacteria. The absence of molecular positivity in all ticks collected indicates that horses do not presented persistent bacteremia, suggesting that other mammals' species in the studied area may play a role as amplifier hosts for these zoonotic agents. Horses in the studied area may play a role as sentinel host for tick-borne zoonotic bacteria. Additionally, monocytopenia with lymphopenia found in positive horses by both *Borrelia* spp. and Anaplasmataceae can impair the health of horses.

## Ethical approval

All methods were carried out in accordance with the guidelines and regulations of the National Council for Animal Experimentation (CONCEA). The procedures with the horses were approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA) of the Catholic University Dom Bosco, registration number 020/2017.

*CRedit authorship contribution statement*

JBVC, MRA, CEO and HMH: Conceptualization; data curation: JBVC and HMH; formal analysis: JBVC, MRA, CEO, FMS, MBL and HMH; funding acquisition: MRA and HMH; investigation: JBVC, MRA, CEO, MDC, MBL, RZM and HMH; methodology: JBVC, FMS, AAT, JRO, ACC, LRG, LCB, MCAS, ARMB, RZM; project administration: HMH; supervision: HMH; validation: JBVC, MRA, CEO, FMS, MBL, GBA and HMH; visualization: JBVC and HMH; writing—original draft: JBVC; writing—review and editing: JBVC, MRA, CEO, FMS, MBL, GBA and HMH.

*Declaration of Competing Interest*

None.

*Acknowledgements and funding sources*

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) by Productivity Grant granted to the HMH (CNPq Process No. 308768/2017-5), MRA (CNPq Process No. 302420 / 2017-7); Foundation for Support to the Development of Education, Science and Technology of the State of Mato Grosso do Sul (FUNDECT, Process 59/300.187/2016); Foundation for Research Support of the State of São Paulo (FAPESP, Process 2018/02753-0). The present study was carried out with the support of the Coordination for the Improvement of Higher Education (CAPES) by a scholarship to the JBVC.

The authors would like to thank the owners of the farms for their availability to participate in the study, the students of scientific initiation who helped in the collection and processing of the samples of the horses: João Victor, Diovana Lourencetti, Carol Domingos, John Layno, teacher Nubia de Oliveira.

*References*

Abel, I.S., Marzagão, G., Yoshinari, N.H., Schumaker, T.T., 2000. *Borrelia*-like spirochetes recovered from ticks and small mammals collected in the Atlantic Forest Reserve, Cotia county, State

of São Paulo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 95 (5), 621-624. <https://doi.10.1590/s0074-02762000000500006>.

Alves Ada, S., Melo, A.L., Amorim, M.V., Borges, A.M., Gaíva, E., Silva, L., Martins, T.F., Labruna, M.B., Aguiar, D.M., Pacheco, R.C., 2014. Seroprevalence of *Rickettsia* spp. in Equids and Molecular Detection of 'Candidatus *Rickettsia amblyommii*' in *Amblyomma cajennense* Sensu Lato Ticks from the Pantanal Region of Mato Grosso, Brazil. J Med Entomol 51 (6), 1242-1247. <https://doi.10.1603/ME14042>.

André, M.R., 2018. Diversity of *Anaplasma* and *Ehrlichia/Neoehrlichia* Agents in Terrestrial Wild Carnivores Worldwide: Implications for Human and Domestic Animal Health and Wildlife Conservation. Front Vet Sci 23 (5), 293. <https://doi.10.3389/fvets.2018.00293>.

Barros-Battessti, D.M., Arzua, M., Bechara, G.H., 2006. Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: um guia ilustrado para identificação das espécies. Vox/ICTTD-3/Butantan, São Paulo, Brazil.

Binder, L.C., Krawczak, F.S., Sponchiado, J., Melo, G.L., Moraes-Filho, J., Bastos, F.A.N., Cáceres, N.C., Labruna, M.B., 2017. Serosurvey of *Rickettsia* spp. in small mammals from Mato Grosso do Sul state, Brazil. Ciência Rural, Santa Maria 47, e20160476.

Burbelo, P.D., Bren, K.E., Ching, K.H., Coleman, A., Yang, X., Kariu, T., Iadarola, M.J., Pal, U., 2011. Antibody profiling of *Borrelia burgdorferi* infection in horses. Clin Vaccine Immunol 18 (9), 1562-1567. <https://doi.10.1128/CVI.05123-11>.

Chang, Y.F., Novosol, V., McDonough, S.P., Chang, C.F., Jacobson, R.H., Divers, T., Quimby, F.W., Shin, S., Lein, D.H., 2000. Experimental infection of ponies with *Borrelia burgdorferi* by exposure to Ixodid ticks. Vet Pathol 37 (1), 68-76. <https://doi.10.1354/vp.37-1-68>.

Cordeiro, M.D., Bahia, M., Magalhães-Matos, P.C., Cepeda, M.B., Guterres, A., Fonseca, A.H., 2018. Morphological, molecular and phylogenetic characterization of *Borrelia theileri* in *Rhipicephalus microplus*. Rev Bras Parasitol Vet 27 (4), 555-561. <https://doi.10.1590/S1984-296120180083>.

De Almeida, R.F., Garcia, M.V., Cunha, R.C., Matias, J., Silva, E.A., De Fatima Cepa Matos, M., Andreotti, R., 2013. Ixodid fauna and zoonotic agents in ticks from dogs: first report of *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus sanguineus* in the state of Mato Grosso do Sul, mid-western Brazil. *Exp Appl Acarol* 60 (1), 63-72. <https://doi.10.1007/s10493-012-9641-y>.

De la Fuente, J., Torina, A., Caracappa, S., Tumino, G., Furlá, R., Almazán, C., Kocan, K.M., 2005. Serologic and molecular characterization of *Anaplasma* species infection in farm animals and ticks from Sicily. *Vet Parasitol* 133 (4), 357-362. <https://doi.10.1016/j.vetpar.2005.05.063>.

De Oliveira, P.B., Harvey, T.V., Fehlberg, H.F., Rocha, J.M., Martins, T.F., Da Acosta, I.C.L., Labruna, M.B., Faccini, J.L.H., Albuquerque, G.R., 2019. Serologic and molecular survey of *Rickettsia* spp. in dogs, horses and ticks from the Atlantic rainforest of the state of Bahia, Brazil. *Exp Appl Acarol* 78 (3), 431-442. <https://doi.10.1007/s10493-019-00397-x>.

De Sousa, K.C.M., Herrera, H.M., Rocha, F.L., Costa, F.B., Martins, T.F., Labruna, M.B., Machado, R.Z., André, M.R., 2018. *Rickettsia* spp. among wild mammals and their respective ectoparasites in Pantanal wetland, Brazil. *Ticks Tick Borne Dis* 9 (1), 10-17. <https://doi.10.1016/j.ttbdis.2017.10.015>.

Dos Santos, T.M., Roier, E.C.R., Pires, M.S., Santos, H.A., Vilela, J.A.R., Peckle, M., Paulino, P.G., Baldani, C.D., Massard, C.L., 2019. Molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Theileria equi* coinfection in horses from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Anim Sci* 20 (7), 100055. <https://doi.10.1016/j.vas.2019.100055>.

Drazenovich, N., Foley, J., Brown, R.N., 2006. Use of real-time quantitative PCR targeting the msp2 protein gene to identify cryptic *Anaplasma phagocytophilum* infections in wildlife and domestic animals. *Vector Borne Zoonotic Dis* 6 (1), 83-90. <https://doi.10.1089/vbz.2006.6.83>.

Dugat, T., Lagrée, A.C., Maillard, R., Boulouis, H.J., Haddad, N., 2015. Opening the black box of *Anaplasma phagocytophilum* diversity: current situation and future perspectives. *Front Cell Infect Microbiol* 14 (5), 61. <https://doi.10.3389/fcimb.2015.00061>.



Franke, J., Hildebrandt, A., Dorn, W., 2013. Exploring gaps in our knowledge on Lyme borreliosis spirochaetes--updates on complex heterogeneity, ecology, and pathogenicity. *Ticks Tick Borne Dis* 4 (1-2), 11-25. <https://doi.10.1016/j.ttbdis.2012.06.007>.

Franzén, P., Aspan, A., Egenvall, A., Gunnarsson, A., Aberg, L., Pringle, J., 2005. Acute clinical, hematologic, serologic, and polymerase chain reaction findings in horses experimentally infected with a European strain of *Anaplasma phagocytophilum*. *J Vet Intern Med* 19 (2), 232-239. [https://doi.10.1892/0891-6640\(2005\)19<232:achsap>2.0.co;2](https://doi.10.1892/0891-6640(2005)19<232:achsap>2.0.co;2).

Franzén, P., Aspan, A., Egenvall, A., Gunnarsson, A., Karlstam, E., Pringle, J., 2009. Molecular evidence for persistence of *Anaplasma phagocytophilum* in the absence of clinical abnormalities in horses after recovery from acute experimental infection. *J Vet Intern Med* 23 (3), 636-642. <https://doi.10.1111/j.1939-1676.2009.0317.x>.

Frey, A., Di Canzio, J., Zurakowski, D., 1998. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. *J Immunol Methods* 221 (1-2), 35-41. [https://doi.10.1016/s0022-1759\(98\)00170-7](https://doi.10.1016/s0022-1759(98)00170-7).

Gribble, D.H., 1969. Equine ehrlichiosis. *J Am Vet Med Assoc* 155 (2), 462-469.

Hall, E., Parton, R., Wardlaw, A.C., 1999. Time-course of infection and responses in a coughing rat model of pertussis. *J Med Microbiol* 48 (1), 95-98. <https://doi.10.1099/00222615-48-1-95>.

Horta, M.C., Labruna, M.B., Pinter, A., Linardi, P.M., Schumaker, T.T., 2007. *Rickettsia* infection in five areas of the state of São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 (7), 793-801. <https://doi.10.1590/s0074-02762007000700003>.

Hurtado, C., Torres, R., Pérez-Macchi, S., Sagredo, K., Uberti, B., De Souza Zanatto, D.C., Machado, R.Z., André, M.R., Bittencourt, P., Müller, A., 2020. Serological and molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Thoroughbred horses from Chilean racecourses. *Ticks Tick Borne Dis* 11 (4), 101441. <https://doi.10.1016/j.ttbdis.2020.101441>.

Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L., 1997. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5. ed. San Diego: Academic Press 932.

Labruna, M.B., Whitworth, T., Bouyer, D.H., McBride, J., Camargo, L.M., Camargo, E.P., Popov, V., Walker, D.H., 2004. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the State of Rondônia, Western Amazon, Brazil. J Med Entomol 41 (6), 1073-1781. <https://doi.10.1603/0022-2585-41.6.1073>.

Labruna, M.B., Horta, M.C., Aguiar, D.M., Cavalcante, G.T., Pinter, A., Gennari, S.M., Camargo, L.M., 2007. Prevalence of *Rickettsia* infection in dogs from the urban and rural areas of Monte Negro municipality, western Amazon, Brazil. Vector Borne Zoonotic Dis 7 (2), 249-255. <https://doi.10.1089/vbz.2006.0621>.

Labruna, M.B., Soares, J.F., Martins, T.F., Soares, H.S., Cabrera, R.R., 2011. Cross-mating experiments with geographically different populations of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). Exp Appl Acarol 54 (1), 41-49. <https://doi.10.1007/s10493-011-9428-6>.

Lopes, F.A., Rezende, J., Silva, D.B.D.S., Alves, F.C.G., Oliveira, C.E., Costa, I.P.D., 2017. Molecular evidence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in patients in Brazilian central-western region. Rev Bras Reumatol Engl Ed 57 (6), 641-645. <https://doi.10.1016/j.rbre.2017.05.001>.

Magnarelli, L.A., Anderson, J.F., Johnson, R.C., Nadelman, R.B., Wormser, G.P., 1994. Comparison of different strains of *Borrelia burgdorferi* sensu lato used as antigens in enzyme-linked immunosorbent assays. J Clin Microbiol 32 (5), 1154-1158. <https://doi.10.1128/JCM.32.5.1154-1158.1994>.

Maraspin, V., Ogrinc, K., Ružić-Sabljić, E., Lotrič-Furlan, S., Strle, F., 2011. Isolation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from blood of adult patients with borreliac lymphocytoma, Lyme neuroborreliosis, Lyme arthritis and acrodermatitis chronica atrophicans. Infection 39 (1), 35-40. <https://doi.10.1007/s15010-010-0062-8>.

Massung, R.F., Slater, K., Owens, J.H., Nicholson, W.L., Mather, T.N., Solberg, V.B., Olson, J.G., 1998. Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. J Clin Microbiol 36 (4), 1090-1095. <https://doi.10.1128/JCM.36.4.1090-1095.1998>.

Matias, J., Garcia, M.V., Cunha, R.C., Aguirre, A.de A., Barros, J.C., Csordas, B.G., Andreotti, R., 2015. Spotted fever group *Rickettsia* in *Amblyomma dubitatum* tick from the urban area

of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. Ticks Tick Borne Dis 6 (2), 107-110. <https://doi.10.1016/j.ttbdis.2014.10.001>.

McQuiston, J.H., McCall, C.L., Nicholson, W.L., 2003. Ehrlichiosis and related infections. J Am Vet Med Assoc 223 (12), 1750-1756. <https://doi.10.2460/javma.2003.223.1750>.

Montandon, C.E., Yoshinari, N.H., Milagres, B.S., Mazioli, R., Gomes, G.G., Moreira, H.N., Padilha, A.de F., Wanderley, G.G., Mantovani, E., Galvão, M.A., Langoni, H., Mafra, C., 2014. Evidence of *Borrelia* in wild and domestic mammals from the state of Minas Gerais, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet 23 (2), 287-290. <https://doi.10.1590/s1984-29612014040>.

Nava, S., Beati, L., Labruna, M.B., Cáceres, A.G., Mangold, A.J., Guglielmo, A.A., 2014. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum*, and *Amblyomma sculptum* (Ixodida: Ixodidae). Ticks Tick Borne Dis 5 (3), 252-276. <https://doi.10.1016/j.ttbdis.2013.11.004>.

Parreira, D.R., Jansen, A.M., Abreu, U.G., Macedo, G.C., Silva, A.R., Mazur, C., Andrade, G.B., Herrera, H.M., 2016. Health and epidemiological approaches of *Trypanosoma evansi* and equine infectious anemia virus in naturally infected horses at southern Pantanal. Acta Trop 163, 98-102. <https://doi.10.1016/j.actatropica.2016.08.005>.

Pinter, A., Labruna, M.B., 2006. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. Ann N Y Acad Sci 1078, 523-529. <https://doi.10.1196/annals.1374.103>.

Piranda, E.M., Faccini, J.L., Pinter, A., Pacheco, R.C., Cançado, P.H., Labruna, M.B., 2011. Experimental infection of *Rhipicephalus sanguineus* ticks with the bacterium *Rickettsia rickettsii*, using experimentally infected dogs. Vector Borne Zoonotic Dis 11 (1), 29-36. <https://doi.10.1089/vbz.2009.0250>.

Polo, G., Mera Acosta, C., Labruna, M.B., Ferreira, F., 2017. Transmission dynamics and control of *Rickettsia rickettsii* in populations of *Hydrochoerus hydrochaeris* and *Amblyomma sculptum*. PLoS Negl Trop Dis 11 (6), e0005613. <https://doi.10.1371/journal.pntd.0005613>.

Pusterla, N., Chae, J.S., Kimsey, R.B., Berger Pusterla, J., DeRock, E., Dumler, J.S., Madigan, J.E., 2002. Transmission of *Anaplasma phagocytophila* (human granulocytic ehrlichiosis agent) in horses using experimentally infected ticks (*Ixodes scapularis*). J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 49 (10), 484-488. <https://doi.10.1046/j.1439-0450.2002.00598.x>.

Radolf, J.D., Caimano, M.J., Stevenson, B., Hu, L.T., 2012. Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. Nat Rev Microbiol 10 (2), 87-99. <https://doi.10.1038/nrmicro2714>.

Ramírez-Hernández, A., Uchoa, F., Serpa, M.C.A., Binder, L.C., Souza, C.E., Labruna, M.B., 2020. Capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) as amplifying hosts of *Rickettsia rickettsii* to *Amblyomma sculptum* ticks: Evaluation during primary and subsequent exposures to *R. rickettsii* infection. Ticks Tick Borne Dis 11 (5), 101463. <https://doi.10.1016/j.ttbdis.2020.101463>.

R Development Core Team. 2015. R: a language and environment for statistical computing. <http://www.R-project.org> [07 march 2019].

Regnery, R.L., Spruill, C.L., Plikaytis, B.D., 1991. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. J Bacteriol 173 (5), 1576-1589. <https://doi.10.1128/jb.173.5.1576-1589.1991>.

Resende, J., Lopes, F.A., Alves, F.C.G., Bruno, A.R., Moreno, S.E., Costa, I.P., Fonseca, A.H., Cordeiro, M.D., Oliveira, C.E., 2016. Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Mato Grosso Do Sul, Brazil. JSM Trop Med Res 1, 1003.

Rogers, A.B., Smith, R.D., Kakoma, I., 1999. Serologic cross-reactivity of antibodies against *Borrelia theileri*, *Borrelia burgdorferi*, and *Borrelia coriaceae* in cattle. Am J Vet Res 60 (6), 694-697.

Rolim, M.F., De Oliveira, F.C.R., Graça, F.A.S., Brasil, F.C., 2015. Serological evidence of exposure to *Anaplasma phagocytophilum* in horses from the Rio de Janeiro state mounted police bred in the urban zone. Ciênc anim bras 16, 3.

Roux, V., Fournier, P.E., Raoult, D., 1996. Differentiation of spotted fever group rickettsiae by sequencing and analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA of the

gene encoding the protein rOmpA. J Clin Microbiol 34 (9), 2058-2065. <https://doi.10.1128/JCM.34.9.2058-2065.1996>.

Sacchi, A.B., Duarte, J.M., André, M.R., Machado, R.Z., 2012. Prevalence and molecular characterization of Anaplasmataceae agents in free-ranging Brazilian marsh deer (*Blastocercus dichotomus*). Comp Immunol Microbiol Infect Dis 35 (4), 325-334. <https://doi.10.1016/j.cimid.2012.02.001>.

Sal, M.S., Li, C., Motalab, M.A., Shibata, S., Aizawa, S., Charon, N.W., 2008. *Borrelia burgdorferi* uniquely regulates its motility genes and has an intricate flagellar hook-basal body structure. J Bacteriol 190 (6), 1912-1921. <https://doi.10.1128/JB.01421-07>.

Saleem, S., Ijaz, M., Farooqi, S.H., Rashid, M.I., Khan, A., Masud, A., Aqib, A.I., Hussain, K., Mehmood, K., Zhang, H., 2018. First molecular evidence of equine granulocytic anaplasmosis in Pakistan. Acta Trop 180, 18-25. <https://doi.10.1016/j.actatropica.2017.12.032>.

Salvagni, C.A., Dagnone, A.S., Gomes, T.S., Mota, J.S., Andrade, G.M., Baldani, C.D., Machado, R.Z., 2010. Serologic evidence of equine granulocytic anaplasmosis in horses from central West Brazil. Rev Bras Parasitol Vet 19 (3), 135-140. <https://doi.10.1590/s1984-29612010000300002>.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2<sup>a</sup> ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laborat Press.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Biotec 24, 104-108.

Sangioni, L.A., Horta, M.C., Vianna, M.C., Gennari, S.M., Soares, R.M., Galvão, M.A., Schumaker, T.T., Ferreira, F., Vidotto, O., Labruna, M.B., 2005. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. Emerg Infect Dis 11 (2), 265-270. <https://doi.10.3201/eid1102.040656>.

Satué, K., Hernández, A., Muñoz, A., 2012. Physiological Factors in the Interpretation of Equine Hematological Profile. Hematology – Science and Practice. School of Vet Med, University of Córdoba pp. 573-575.

Silaghi, C., Liebisch, G., Pfister, K., 2011. Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* from 14 equine granulocytic anaplasmosis cases. *Parasit Vectors* 16 (4), 161. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-161>.

Silveira, I., Pacheco, R.C., Szabó, M.P., Ramos, H.G., Labruna, M.B., 2007. *Rickettsia parkeri* in Brazil. *Emerg Infect Dis* 13 (7), 1111-1113. <https://doi.org/10.3201/eid1307.061397>.

Siska, W.D., Tuttle, R.E., Messick, J.B., Bisby, T.M., Toth, B., Kritchevsky, J.E., 2013. Clinicopathologic characterization of six cases of equine granulocytic anaplasmosis in a nonendemic area (2008-2011). *J. Equine Vet. Sci* 33, 653–657.

Soares, C.O., Ishikawa, M.M., Fonseca, A.H., Yoshinari, N.H., 2000. Borrelioses, agents and vectors: a review. *Pesq Vet Bras* 20, 1-19.

Socoloski, S.N.G., De Castro, B.G., Cordeiro, M.D., Da Fonseca, A.H., Cepeda, M.B., Nicolino, R.R., Lopes, L.B., 2018. Epidemiological investigation of *Borrelia burgdorferi* in horses in the municipality of Sinop-MT, Brazil. *Trop Anim Health Prod* 50 (4), 831-836. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1504-4>.

Souza, C.E., Moraes-Filho, J., Ogrzewalska, M., Uchoa, F.C., Horta, M.C., Souza, S.S., Borba, R.C., Labruna, M.B., 2009. Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. *Vet Parasitol* 161 (1-2), 116-121. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.12.010>.

Souza, C.E., Camargo, L.B., Pinter, A., Donalisio, M.R., 2016. High Seroprevalence for *Rickettsia rickettsii* in Equines Suggests Risk of Human Infection in Silent Areas for the Brazilian Spotted Fever. *PLoS One* 11 (4), e0153303. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153303>.

Stevenson, M., 2005. *An Introduction to Veterinary Epidemiology*. Palmerston North. IVABS Massey Univ EpiCentre 109.

Szabó, M.P., Pinter, A., Labruna, M.B., 2013. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Front Cell Infect Microbiol* 12 (3), 27. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00027>.

Talagrand-Reboul, E., Raffetin, A., Zachary, P., Jaulhac, B., Eldin, C., 2020. Immunoserological Diagnosis of Human Borrelioses: Current Knowledge and perspectives. *Front Cell Infect Microbiol* 19 (10), 241. <https://doi.10.3389/fcimb.2020.00241>.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22 (22), 4673-4680. <https://doi.10.1093/nar/22.22.4673>.

Ueno, T.E., Costa, F.B., Moraes-Filho, J., Agostinho, W.C., Fernandes, W.R., Labruna, M.B., 2016. Experimental infection of horses with *Rickettsia rickettsii*. *Parasit Vectors* 9 (1), 499. <https://doi.10.1186/s13071-016-1784-y>.

Vieira, T.S., Vieira, R.F., Krawczak, F.S., Soares, H.S., Guimarães, A.M., Barros-Filho, I.R., Marcondes, M., Labruna, M.B., Biondo, A.W., Vidotto, O., 2016. *Ehrlichia* sp. infection in carthorses of low-income owners, Southern Brazil. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 48, 1-5. <https://doi.10.1016/j.cimid.2016.07.002>.

Widmer, C.E., Azevedo, F.C., Almeida, A.P., Ferreira, F., Labruna, M.B., 2011. Tick-borne bacteria in free-living jaguars (*Panthera onca*) in Pantanal, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11 (8), 1001-1005. <https://doi.10.1089/vbz.2011.0619>.

Yparraguirre, L.A., Machado-Ferreira, E., Ullmann, A.J., Piesman, J., Zeidner, N.S., Soares, C.A., 2007. A hard tick relapsing fever group spirochete in a Brazilian *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. *Vector Borne Zoonotic Dis* 7 (4), 717-721. <https://doi.10.1089/vbz.2007.0144>.

**Table 1.** Seropositivity of horses (n=262) sampled in Campo Grande, Midwestern Brazil.

Bacteria	Serological titers									
	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096	1:8192	Total	
<i>R. rickettsii</i>	15 (28.8)	24 (46.1)	10 (19.2)	2 (3.8)	1 (1.9)					52 (19.8)
<i>R. parkeri</i>	16 (36.3)	17 (38.6)	7 (15.9)	4 (9.0)						44 (16.7)
<i>R. amblyommatis</i>	11 (23.9)	20 (43.4)	8 (17.3)	6 (13.0)	1 (2.1)					46 (17.5)
<i>A. phagocytophilum</i>	55 (66.2)	16 (19.2)	3 (3.6)	4 (4.8)	2 (2.4)	1 (1.2)	1 (1.2)	1 (1.2)	1 (1.2)	83 (31.6)

Number of seropositive horses followed by percentage of occurrence of *Rickettsia rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyommatis*, and *Anaplasma phagocytophilum*. Samples were collected between November 2017 and April 2018.



**Table 2.** Patterns of *Borrelia* spp. infections in horses (n=262) from Campo Grande, Midwestern Brazil.

<b>Patterns of <i>Borrelia</i> spp. infection</b>	<b>Number of horses</b>
PCR+ ELISA+ (patent infection)	13/262 (4.9%)
PCR+ ELISA– (early infection)	72/262 (27.4%)
PCR– ELISA+ (sub-patent infection)	41/262 (15.6%)
PCR– ELISA– (negative)	136/262 (51.9%)

Sampled were collected between November 2017 and April 2018. Values are expressed by number of animals, followed by percentages.

## **CAPÍTULO 2**

Vector Borne and Zoonotic Diseases

**Detection of *Borrelia* spp. in equines from the Brazilian Pantanal biome**

João Bosco Vilela Campos<sup>a</sup>, Carina Elisei de Oliveira<sup>a</sup>, Jania de Resende<sup>a</sup>, Filipe Martins Santos<sup>a</sup>, Matheus Dias Cordeiro<sup>b</sup>, João Victor Almeida Alves<sup>a</sup>, Luiz Ricardo Gonçalves<sup>c</sup>, Marcos Rogério André<sup>c</sup>, Heitor Miraglia Herrera<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> University Católica Dom Bosco, Department of Biosaúde, Laboratory Insana Huna, Interface between Animal, Environmental and Human Health, Brasil

<sup>b</sup> University Federal Rural do Rio de Janeiro, Laboratory of Parasitic Diseases, Brasil

<sup>c</sup> University Estadual Paulista – Department of Patology, Immunoparasitology Laboratory, Campus Jaboticabal, Brasil

\* Corresponding author at: University Católica Dom Bosco, Department of Biosaúde, Laboratory Insana Huna, Interface between Animal, Environmental and Human Health, Brasil. E-mail address: herrera@ucdb.br (H. Herrera).

**Abstract**

Lyme borreliosis is a zoonotic infectious disease that affects domestic, wild animals and human. It is caused by bacteria belonging to the Spirochaetes phylum that are grouped in the *Borrelia burgdorferi* (s.l.) species complex, being transmitted by ticks. The objective of this study was to investigate the occurrence of *Borrelia* spp. in equines born and raised in the central region of the Pantanal Sul-Matogrossense. Whole blood, serum and ticks were collected from 67 horses. The animals were divided into four categories according to age, sex and reproductive condition: 03 working males, 14 working mares, 28 breeding mares and 22

foals. The packed cell volume was quantified by the microhematocrit technique and counts of the total number of red cells in the Neubauer chamber. Ticks collected from sampled horses were identified. Serum samples were analyzed by indirect ELISA. And for the molecular test, PCR was performed for *Borrelia* spp. Of the 67 sampled animals, 64% were infested by ticks. We observed for the first-time occurrence by *Borrelia* spp. in horses at Pantanal wetland with a seroprevalence of 46.2% and molecular positivity of 60%. Our results showed that horses from the Pantanal Sul Matogrossense region had contact with *Borrelia* spp., without interfering in anemia rates. Since (i) horses are considered an accidental host for *Borrelia* spp. and we found a half of sampled animals positive; (ii) South Pantanal has a large population of *A. sculptum*, and (iii) Pantanal wetland has a great diversity of wildlife, we suggest the studied area as enzootic for this spirochete.

**Keywords:** *Borrelia* spp.; equines, Lyme borreliosis.

## 1. Introduction

*Borrelia burgdorferi* sensu stricto (s.s.) is considered the causative agent of Lyme disease (DL), being transmitted by *Ixodes scapularis* in the USA and *I. ricinus* in Europe and Asia (Masters et al., 1998; Steere, 2001; Masuzawa, 2004). A wide variety of wild animals, including mainly small mammals, can be infected (Radolf et al., 2012). And horses, despite not having persistent bacteremia (Burbelo et al., 2011; Socoloski et al., 2018), can act as sentinels in the epidemiology of this zoonotic agent (Socoloski et al., 2018).

In Brazil, the role of ticks in the transmission of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) remains unproven (Abel et al., 2000), although the species *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* has been registered as a vector of *Borrelia theileri* for cattle and horses in national territory, maintaining this bacterium by transovarian transmission (Yparraguirre et al., 2007;

Cordeiro et al., 2018), in addition to the presence of *B. burgdorferi* (s.l.) in *R. (B.) microplus* embryonic cell culture (Resende et al., 2008).

The Pantanal biome is a large floodplain in South America with approximately 140,000 km<sup>2</sup> in Brazil. In this area, the main economic activity is extensive livestock. It is estimated that the Pantanal region contains four million cattle and four thousand horses (Seidl et al., 1998), where they play a fundamental role in livestock management and consequently share the same habitats with the local fauna. And, ixodid ticks are included because they have been recorded in this biome in domestic and free-living vertebrates (Ramos et al., 2014; 2016). The aim of this study was to detect the presence of *Borrelia* spp. in horses born and bred in the central region of Pantanal Sul-Matogrossense, in addition to associating serological exposure and / or molecular positivity with anemia indexes.

## **2. Material and methods**

### **2.1 Site collection and field procedures**

The study was carried out in the central Pantanal Sul-Matogrossense, Nhecolândia sub-region (18° 59 '15' 'S, 56° 37' 03 "). The sample size was determined by means of non-probabilistic sampling for convenience according Mattar (1996) and Schiffman and Kanuk (2000).

Blood and serum samples were collected from 67 horses. The animals were divided into four categories according to age, sex and reproductive condition: 03 working males, 14 working mares, 28 breeding mares and 22 foals. Samples were collected from July to August 2015. All the animals sampled were born and raised in the area and were apparently healthy at the time of collection. All of the procedures were approved by the Ethics Committee for the

Use of Animals of the Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), according to Protocol No. 021/2015.

## **2.2 Red blood cell count and globular volume quantification**

During the first 12 hours after the blood collection with EDTA, the globular volume (PCV) was quantified by the microhematocrit technique and counts the total number of red cells (RBC) in Neubauer's chamber were performed (Sink and Feldman 2006, Douglas and Wardrop 2010). We considered the values of PCV and RBC as indicators of anemia, according to findings reported by Ribeiro et al. (2008).

## **2.3 Identification of collected ticks**

Ticks parasitizing horses were collected after a visual inspection of 60 seconds and identified using previously published dichotomous keys (Barros-Battesti et al., 2006; Nava et al., 2014).

## **2.4 Indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies**

### ***anti-B. burgdorferi***

Serum samples collected from horses were subjected to an ELISA assay using *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s.) antigen G39/40 strain diluted to 20mg/mL according to Socoloski et al. (2018). The sensitivity of the assay ranged from 82.6 to 100% in the analyses for IgG antibodies, according to Magnarelli et al. (1994).

The horse sera used as positive and negative controls (Socoloski et al., 2018) belonged to the serum bank of the Laboratory of Parasitic Diseases at the Federal Rural University of Rio de Janeiro (LDP-UFRRJ). The cutoff point value was calculated based on the t-Student

distribution with a 99.99% confidence interval, determined with the mean of the negative controls plus three times the standard deviation of the optical density (OD) values of the negative controls of each reaction. The results of OD of the sera of the animals tested in the present study were expressed following the formula proposed by Frey et al. (1998) as an optical density index (ODI).

### **2.5 DNA extraction**

For the molecular test, DNA was extracted from whole blood using QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen®) according to the manufacturer's recommendations.

### **2.6 Conventional PCR assays**

In order to detect *Borrelia* spp. DNA, a conventional polymerase chain reaction (cPCR) was performed using primers that amplify a 500bp fragment of the coding region of the conserved 23S rRNA gene: Fwd (5' - TAC CCA GCA CTT ACC CTT GG - 3') and Rev (5' - AGT GCC AGG TGG GTA GTT TG - 3') (National Institute of Industrial Property - INPI - Case BR 10 2016 021522 6). The DNA samples used as positive controls were isolated from *B. burgdorferi* (s.s.) strain G39/40 provided by Dr. Matheus Dias Cordeiro from LDP-UFRRJ. And for the negative control, ultrapure water was used. The PCR reaction was conducted according Sal et al. (2008).

### **2.7 Purification, sequencing and BLAST analysis of the obtained amplicons**

The product of *Borrelia* spp. 23S rRNA amplicons were purified by enzymatic treatment with ExoProStar™ (GE Healthcare), in accordance with the manufacturer's

recommendations. The amplicons were sequenced in both directions using an automated system based on the dideoxynucleotide chain-termination method Sanger et al. (1977).

The quality of the electropherograms obtained through the sequencing of the amplified products was visually analyzed using the program FinchTV 1.4.0. In addition, consensus sequences were obtained by analysis of the forward sequences using the CAP3 program (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/MobyliPortal/portal.py>). In order to perform sequence identity analysis, the amplified gene fragments were compared with those previously deposited in GenBank using the basic local alignment search tool (BLASTn) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Finally, the obtained sequences were individually aligned with other sequences available from GenBank.

## 2.8 Statistical analysis

It was verified by the Shapiro-Wilk test whether the distributions of the RBC and PCV results had a normal distribution. Afterwards, the Kruskal-Wallis test was used to verify significant differences in the mean values of RBC and PCV between the categories: breeding mares, working mares and foals. The Mann-Whitney post-hoc test was used to evaluate the paired results of the Kruskal-Wallis test to determine which groups showed significant difference (R development core team 2011).

Finally, means were compared among haematological values of positive and negative individuals (serological tests and PCR) for *Borrelia burgdorferi* (l.s.). We did not carry out statistical analyzes to the category Working Males due to the low number of samples. All the tests were performed in software R (R development core team 2011), with a significance level of 95% ( $p \leq 0.05$ ).



### 3. Results

Of the 67 animals sampled, 31 (46.2%) were seropositive for *B. burgdorferi* (s.l.), being 16 breeding mares, 07 working mares and 08 foals. In the molecular detection, 40 (60%) positive animals were observed, being 16 breeding mares, 16 foals, 06 working mares, 02 working males (Table 1). Some amplified samples were sequenced and deposited in the GenBank database with access numbers: MN539983, MN539987 and MN539984.

**Table 1:** Serological and molecular tests for *Borrelia* spp. in horses sampled at Pantanal region, Mato Grosso do Sul during July-August 2015.

Equine Categories	Sampled Animals	ELISA <i>Borrelia burgdorferi</i> (s.l.)	PCR <i>Borrelia</i> spp.
Working males	3	0 (0.0)	2 (66.6)
Working mares	14	7 (50.0)	6 (42.8)
Breeding mares	28	16 (57.1)	16 (57.1)
Foals	22	8 (36.3)	16 (72.7)
<b>Total</b>	<b>67</b>	<b>31 (46.2)</b>	<b>40 (60.0)</b>

In the anemia indices, significant differences were observed between the three categories (Breeding and Working mares and foals). It was also observed that the foals' averages were above ( $p < 0.05$ ) the average values of the other categories. In animals that were positive and negative in both tests, there were no statistical differences in anemia rates.

It was observed that 64.2% (43/67) of the horses were infested by ticks: 51.2% had simple infestations with *D. nitens*, 9.3% with *A. sculptum*, 9.3% with *R. (B.) microplus* and 30.2% with multiple infestations. The breeding mares and foals presented the highest infestations, with 78.5% (22/28) and 63.6% (14/22), respectively, followed by the working

mare's category, with 35.7% (5/14). Despite the low number of animals, the category working males presented a prevalence of 66.6% (2/3) of animals with the presence of ticks (Table 2).

**Table 2:** Number of horses by category followed by prevalence of tick infestation in equine sampled at Pantanal of Mato Grosso Sul, from July to August 2015.

Ticks species	Working males	Working mares	Breeding mares	Foals
<i>Dermacentor nitens</i>	1 (33.3)	4 (28.5)	10 (35.7)	7 (31.8)
<i>Amblyomma sculptum</i>	1 (33.3)	-	3 (10.7)	-
<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	-	-	-	4 (18.1)
<i>R. (B.) microplus</i> + <i>D. nitens</i>	-	1 (7.1)	2 (7.1)	3 (13.6)
<i>A. sculptum</i> + <i>D. nitens</i>	-	-	4 (14.2)	-
<i>R. (B.) microplus</i> + <i>A. sculptum</i>	-	-	1 (3.5)	-
<i>R. (B.) microplus</i> + <i>A. sculptum</i> + <i>D. nitens</i>	-	-	2 (7.1)	-
<b>Total</b>	<b>2 (66.6)</b>	<b>5 (35.7)</b>	<b>22 (78.5)</b>	<b>14 (63.6)</b>

It was observed that *D. nitens* parasitized the horses indiscriminately because it was observed in all the evaluated categories. Also, it was recorded that breeding mares and foals presented the highest occurrences of coinfections by two (*A. sculptum* / *D. nitens*; *R. (B.) microplus* / *D. nitens*) or three [*R. (B.) microplus* / *A. sculptum* / *D. nitens*] tick species (Table 2).

#### 4. Discussion

The present study showed for the first time the serological detection of *B. burgdorferi* (s.l.) in horses in the Pantanal region, Mato Grosso do Sul. For the moment, only serological evidence has been recorded (Socoloski et al., 2018). However, the seroprevalence found here (46.2%), does not rule out the possibility of cross reactions with species related to the recurrent fever group (RFG) (Magnarelli et al., 1994; Rogers et al., 1999), since *B. theileri* have been detected in cattle, sheep, horses and *R. (B.) microplus* ticks in Brazil (Soares et al., 2000; Yparraguirre et al., 2007; Cordeiro et al., 2018).

The occurrence of *B. burgdorferi* in Brazilian territory still remains unclear due to the lack of isolation and the presence of ticks from the *Ixodes ricinus* complex. And despite the low sample, the present study observed more than half of the animals with molecular positivity for *Borrelia* spp. (60%). However, the DNA detected in the horse samples may be related to infection by *B. theileri*, since (i) *B. burgdorferi* bacteremia is considered low or absent (Chang et al., 2000; Maraspin et al., 2011; Talagrand- Reboul et al., 2020), (ii) the primers used in the reactions, do not distinguish *Borrelia* species and (iii) *R. (B.) microplus* was found infesting the horses.

Our results highlight the importance of using different diagnostic tests to detect *Borrelia* spp. in horses in enzootic areas, such as the combination of molecular and serological assays, to better understand the different epidemiological patterns in a given host population. In this sense, we observed differences in the infection patterns between the categories of the evaluated horses: (i) the high occurrence of positive foals in the molecular test (72.7%), which may be related to the initial stage of the infection, since the area of study is enzootic for *Amblyomma* spp. (Ramos et al., 2017), and horses are constantly being exposed to possible infected ticks (Štefančíková et al., 2008; Ribeiro et al., 2008), and (ii) adult mares had a higher seroprevalence, which it was already expected because adults are more effective at controlling spirochete infections than young animals, due to cell-mediated immunity (Štefančíková et al., 2008). In addition, we found 58.0% of breeding mares seropositive for *B. burgdorferi* (s.l.) and negative in PCR. In fact, spirocheteemia is considered low (Chang et al., 2000; Maraspin et al., 2011; Talagrand- Reboul et al., 2020), and may migrate to connective tissue, where they can protect themselves from the immune responses of vertebrate hosts, establishing chronic infections (Chang et al., 2000, Liang et al., 2004, Singh and Girschick 2004).

The present study showed three different species of ticks parasitizing horses: *D. nitens*, *R. (B.) microplus* and *A. sculptum*. Although the species *D. nitens* is of great importance in the health of horses, there are no reports of this species transmitting *Borrelia* spp. *R. (B.) microplus*, on the other hand, was registered as a vector of *Borrelia theileri* for cattle and horses in Brazil (Yparraguirre et al., 2007; Cordeiro et al., 2018). In fact, the extensive livestock production system in the Pantanal region can greatly favor the populations of *R. (B.) microplus*. The presence of *A. sculptum*, a species with a heteroxenic biological cycle and of great importance in animal and public health, was observed among animals and can affect a large number of vertebrate species (Ramos et al. 2014), including horses that are considered accidental hosts (Butler et al. 2005; Hansen et al. 2010). In addition, these animals share the same environments infested by *Amblyomma* spp. (Ramos et al. 2017), suggesting an occurrence of the enzootic wild cycle of *Borrelia* spp. in the region.

## **5. Conclusion**

Our results showed that the horses from the region addressed in the Pantanal Sul Matogrossense, had contact with *Borrelia* spp. without interfering with anemia rates. Since (i) horses are considered accidental hosts; (ii) the South of the Pantanal has a large population of *A. sculptum*, and (iii) the same region has a wide diversity of wildlife, we suggest this area studied should be better monitored for possible enzootic cycles for the spirochete.

## **Acknowledgement**

The authors thank the owner of the farm for his availability to participate in the study, all the employees involved and the students of scientific initiation who helped in the

collection and processing of the samples of the horses: Ruth Albuquerque, Magnum Nantes, Diovana Lourencetti, Sangi Vêber and Amanda Alves.

## References

- Abel IS, Marzagão G, Yoshinari NH, Schumaker TTS. *Borrelia*-like Spirochetes recovered from ticks and small mammal collected in the Atlantic Forest Reserve, Cotia county, state of Sao Paulo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000; 95:621-624.
- Alves AL, Madureira RC, Silva RA, Corrêa FN, et al. Frequência de anticorpos contra *Borrelia burgdorferi* em cães na região metropolitana do Rio de Janeiro. Pesq Vet Bras 2004; 24:203-206.
- Baranton G, Postic D, Saint Girons I, Boerlin P, et al. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia gerini* sp. Nov. And group VS461 associated with Lyme borreliosis. Int J Syst Bacteriol 1992; 42, 378-383.
- Barros-Battesti DM, Yoshinari NH, Bonoldi VLN, Gomes AC. Parasitism by *Ixodes didelphidis* and *I. loricatus* (Acari: Ixodidae) on Small Wild Mammals from an Atlantic Forest in the State of Sao Paulo, Brazil. J Med Entomol 2000; 37: 820-827.
- Barros-Battesti DM, Arzua M, Bechara GH. Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: um guia ilustrado para identificação das espécies. Vox/ICTTD-3/Butantan, São Paulo, Brazil, 2006.
- Borchers AT, Keen CL, Huntley AC, Gershwin ME. Lyme disease: a rigorous review of diagnostic criteria and treatment. J Autoimmun 2015; 57: 82-115.
- Bunikis J, Olsén B, Westman G, Bergström S. Variable serum immunoglobulin responses against different *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in a population at risk for and patients with Lyme disease. J Clin Microbiol 1995; 33:1473-1478.

- Butler CM, Houwers DJ, Jongejan F, Van Der Kolk JH. *Borrelia burgdorferi* infections with special reference to horses. A review. *Vet Q* 2005; 27:146-156.
- Callow LL. Observations on tick-transmitted spirochaetes of cattle in Australia and South Africa. *Brit Vet J* 1967; 123:492-497.
- Chang YF, Novosol V, McDonough SP, Chang CF, et al. Experimental infection of ponies with *Borrelia burgdorferi* by exposure to Ixodid ticks. *Vet Pathol* 2000; 37:68-76.
- Costa IP, Bonoldi VLN, Yoshinari NH. Perfil clínico laboratorial da Doença de Lyme-símile no estado do Mato Grosso do Sul: análise de 16 pacientes. *Rev Bras Reumatol* 2001; 41:142-150.
- Costa IP, Bonoldi VLN, Yoshinari NH. Search for *Borrelia* sp in ticks from potential reservoir in an urban forest in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil: a short report. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2002; 97:631-635.
- Courtney JW, Kostelnik LM, Zeidner NS, Massung RF. Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* 2004; 42:3164-3168.
- Divers TJ, Chang YF, Jacobson RH, McDonough SP. Lyme disease in horses. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 2001; 23:375-380.
- Douglas JW, Wardrop KJ. *Schalm's Veterinary hematology*. 6ed. Wiley Blackwell 2010; 1232p.
- Dunaj J, Moniuszko A, Zajkowska J, Pancewicz S. The role of PCR in diagnostics of Lyme borreliosis. *Przegl Epidemiol* 2013; 67:35-39, 119-123.
- Embers ME, Ramamoorthy R, Philipp MT. Survival strategies of *Borrelia burgdorferi*, the etiologic agent of Lyme disease. *Micro and Infect* 2004; 6:312-318.

Galo KR, Fonseca AH, Madureira RC, Barbosa Neto J. Frequência de anticorpos homólogos anti-*Borrelia burgdorferi* em equinos na mesorregião metropolitana de Belém, Estado do Pará. *Pesq Vet Bras* 2009; 29:229-232.

Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 1999; 41:95-98.

Hansen MG, Christoffersen M, Thuesen LR, Petersen MR, et al. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in Danish horses. *Acta Vet Scand* 2010; 18:52-53.

Lee SH, Vigliotti VS, Vigliotti JS, Jones W, et al. Increased sensitivity and specificity of *Borrelia burgdorferi* 16S ribosomal DNA detection. *Am J Clin Pathol* 2010; 133:569–576.

Liang FT, Brown EL, Wang T, Iozzo RV, et al. Protective niche for *Borrelia burgdorferi* to evade humoral immunity. *Amer J of Pat* 2004; 165:977-985.

Madureira RC. Frequência de anticorpos homólogos anti-*Borrelia burgdorferi* em equinos dos municípios de Três Rios, Vassouras e Valença, estado do Rio de Janeiro. Dissertação (Mestrado em Parasitologia Veterinária), Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ 2004 46p.

Mantovani E, Costa IP, Gauditano G, Bonoldi VLN, et al. Description of Lyme disease-like syndrome in Brazil. Is it a new tick-borne disease or Lyme disease variation? *Brazilian J of Med and Biol Res* 2007; 40:443–456.

Mantovani E. Identificação do agente etiológico da doença de Lyme símile brasileira (Síndrome de Baggio-Yoshinari). 2010. 155f. Tese (Doutorado em Medicina) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

Marcus LC, Patterson MM, Gilfillan RE, Urband PH. Antibodies to *Borrelia burgdorferi* in New England horses: serologic survey. *Amer J of Vet Res* 1985; 46:2570–2571.

- Martins JR, Ceresér VH, Corrêa BL, Smith RD. *Borrelia theileri*: Observação em carrapatos do gênero *Boophilus microplus* no município de Guaíba, RS, Brasil. *Ciência Rural* 1996; 26: 447-450.
- Masters E, Granter S, Duray P, Cordes P. Physician-diagnosed erythema migrans and erythema migrans-like rashes following Lone Star tick bites. *Arch Dermatol* 1998; 134:955-960.
- Mattar F. Pesquisa de marketing. São Paulo, Atlas 1996; 336p.
- Montandon CE, Yoshinari NH, Milagres BS, Mazioli R, et al. Evidence of *Borrelia* in wild and domestic mammals from the state of Minas Gerais, Brazil. *Braz J of Vet Parasit* 2014; 23:287-290.
- Nava S, Beati L, Labruna MB, Cáceres AG, et al. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844, and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). *Ticks Tick-bor Dis* 2014; 5:252-276.
- Norman GL, Antig JM, Bigaignon G, Hogrefe WR. Serodiagnosis of Lyme borreliosis by *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* and *B. afzelii* western blot (immunoblots). *J Clin Microbiol* 1996; 34:1732- 1738.
- Parker JL, White KW. Lyme borreliosis in cattle and horses: a review of the Literature. *Corn Vet* 1992; 82:253-274.
- Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, et al. Espiroquetas. In: *Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas*. 1ªed. Blackwell Science Publishing Oxford: Art Médica 2002; 179-188.



- R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing. 2015; <http://www.R-project.org> [07 march 2019].
- Ramos VN, Osava CF, Piovezan U, Szabó MPJ. Complementary data on four methods for sampling free-living ticks in the Brazilian Pantanal. *Rev Bras Parasitol Vet* 2014; 23:516-521.
- Ramos VDN, Osava CF, Piovezan U, Szabó MPJ. Ambush behavior of the tick *Amblyomma sculptum* (*Amblyomma cajennense* complex) (Acari: Ixodidae) in the Brazilian Pantanal. *Ticks Tick Born Dis* 2017; 8:506-510.
- Ribeiro CR, Fagliari JJ, Galera PD, Oliveira AR. Hematological profile of healthy Pantaneiro horses. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2008; 60:492-495.
- Ružić-Sabljić E, Cerar T. Progress in the molecular diagnosis of Lyme disease. *Expert Rev Mol Diagn* 2017; 17:19-30.
- Rollend L, Fish D, Childs JE. Transovarial transmission of *Borrelia* spirochetes by *Ixodes scapularis*: a summary of the literature and recent observations. *Ticks Tick Born Dis* 2013; 4:46-51.
- Sal MS, Li C, Motolab MA, Shibata S, et al. *Borrelia burgdorferi* uniquely regulates its motility genes and has an intricate flagellar hook basal body structure. *J Bacteriol* 2008; 190:1912-1921.
- Salles RS, Fonseca AH, Scofield A, Madureira RC, et al. Sorologia para *Borrelia burgdorferi* lato sensu em equinos no estado do Rio de Janeiro. *A Hora Vet* 2002; 22:46-49.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* 1977; 24:104-108.
- Schiffman L, Kanuk L. Comportamento do consumidor. Rio de Janeiro, LTC Editora; 2000 475p.

Singh SK, Girschick HJ. Molecular survival strategies of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. Lanc Inf Dis 2004; 4:575-583.

Sink CA, Feldman BF. Urinálise e hematologia: Laboratorial para o clínico de pequenos animais. São Paulo-SP: ROCA 2006; 5:77.

Socoloski SNG, De Castro BG, Cordeiro MD, Da Fonseca AH, et al. Epidemiological investigation of *Borrelia burgdorferi* in horses in the municipality of Sinop-MT, Brazil. Trop Anim Health Prod 2018; 50:831-836.

Stanek G, Gray J, Strle F, Wormser G. Lyme borreliosis. Lanc Inf Dis 2004; 4:197-199.

Steere AC. Lyme disease. N Engl J Med 2001; 345:115-125.

Steere AC, Coburn J, Glickstein L. The emergence of Lyme disease. The J of Clin Inv 2004; 113:1093-1101.

Štefančíková A, Tresová G, Peťko B, Škardová I, et al. ELISA comparison of three whole-cell antigens of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in serological study of dogs from area of Košice, Eastern Slovakia. Ann Agric Environ Med 1998; 5:25-30.

Štefančíková A, Derdáková M, Štěpánová G, Peťko B, et al. Heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and their refl ect on immune response. Ann Agric Environ Med 2005; 12:211-216.

Stefanciková A, Adaszek Ł, Peťko B, Winiarczyk S, et al. Serological evidence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in horses and cattle from Poland and diagnostic problems of Lyme borreliosis. Ann Agric Environ Med 2008; 15:37-43.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nuc Acid Res, Oxford 1994; 22:4673-4680.

Vivas RIR, Aguilar FC, Alpizar JLD, Galera LAC, et al. Detección de espiroquetas del género *Borrelia* en hemolinfas de teleoginas de *Boophilus microplus* en el estado de Yucatán, México. *The Vet México* 1996; 27:187-188.

Wang G, Van Dam AP, Schwartz I, Dankert J. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin Mic Ver* 1999; 12: 633-653.

Yoshinari NH, Barros PJJ, Cruz FCM, Oyafuso LK, et al. Clínica e sorologia da doença de Lyme no Brasil. *Rev Bras Reumatol* 1992; 32:57.

Yoshinari NH, Barros PJJ, Bonoldi VLN, Ishikawa M, et al. Perfil da Borreliose de Lyme no Brasil. *Rev Hosp das Clín Fac Med* 1997; 52:111-117.

Yoshinari NH, Mantovani E, Bonoldi VLN, Marangoni RG, et al. Doença de Lyme-símile brasileira ou síndrome Baggio-Yoshinari: zoonose exótica e emergente transmitida por carrapatos. *Rev da Assoc Méd Bras* 2010; 56:363-369.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados indicam que os equinos de Campo Grande – MS e do Pantanal Sul Matogrossense podem atuar como hospedeiros-sentinelas para agentes bacterianos zoonóticos transmitidos por carrapatos. Além disso, infecções simples e múltiplas por *Borrelia* spp. e agentes Anaplasmataceae podem causar alterações em parâmetros hematológicos de cavalos em Campo Grande – MS. Ainda, como foi observado o contato entre riquetsias do grupo Febre Maculosa com os cavalos utilizados para trabalho, esporte e lazer em Campo Grande, alertamos para a importância na saúde pública.



# VETERINARY PARASITOLOGY

An international scientific journal and the Official Organ of the [American Association of Veterinary Parasitologists \(AAVP\)](#), the [European Veterinary Parasitology College \(EVPC\)](#) and the [World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology \(WAAVP\)](#)

## AUTHOR INFORMATION PACK

### TABLE OF CONTENTS

●	<b>Description</b>	<b>p.1</b>
●	<b>Audience</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Impact Factor</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Abstracting and Indexing</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Editorial Board</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Guide for Authors</b>	<b>p.5</b>



ISSN: 0304-4017

### DESCRIPTION

*Veterinary Parasitology* is concerned with those aspects of **helminthology**, **protozoology** and **entomology** which are of interest to **animal health** investigators, veterinary practitioners and others with a special interest in **parasitology**. Papers of the highest quality dealing with all aspects of disease prevention, pathology, treatment, epidemiology, and control of parasites in all domesticated animals, fall within the scope of the journal. Papers of geographically limited (local) interest which are not of interest to an international audience will not be accepted. Authors who [submit](#) papers based on local data will need to indicate why their paper is relevant to a broader readership. Or they can submit to the journal's companion title, [Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports](#), which welcomes manuscripts with a regional focus.

Parasitological studies on **laboratory animals** fall within the scope of *Veterinary Parasitology* only if they provide a reasonably close model of a disease of **domestic animals**. Additionally the journal will consider papers relating to **wildlife** species where they may act as disease reservoirs to domestic animals, or as a zoonotic reservoir. Case studies considered to be unique or of specific interest to the journal, will also be considered on occasions at the [Editors'](#) discretion. Papers dealing exclusively with the taxonomy of parasites do not fall within the scope of the journal.

Studies on rickettsial disease organisms (*Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Eperythrozoon*) will be considered for publication in *Veterinary Parasitology*, but only if the paper deals with vector transmission of these organisms to domesticated animals, or if zoonotic. Studies on *Rickettsia* per se will not be accepted.

Studies dealing with **parasite control** by means of natural products, both *in vivo* and *in vitro*, fall within the scope of the journal, but only if well documented and with therapeutically relevant minimum inhibitory concentrations of the active compound(s) being clearly demonstrated.

Circumstances relating to animal experimentation must meet the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as issued by the Council for International Organizations of Medical Sciences. (Obtainable from: Executive Secretary C.I.O.M.S., c/o W.H.O., Via Appia, CH-1211 Geneva 27, Switzerland.)

Manuscripts reporting meta-analyses and systematic reviews **that follow PRISMA or MOOSE reporting guidelines will receive consideration only** if they go beyond reporting parasite prevalence and provide a description and analysis of factors and mechanisms associated with the reported data.

## AUDIENCE

---

Research Workers and Practitioners in veterinary medicine, Animal Health Investigators and others with a special interest in parasitology, veterinary pharmaceutical industry.

## IMPACT FACTOR

---

2019: 2.157 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2020

## ABSTRACTING AND INDEXING

---

BIOSIS Citation Index  
Elsevier BIOBASE  
Helminthological Abstracts  
PubMed/Medline  
Index Catalog of Medical and Veterinary Zoology  
Index Veterinarius  
Protozoological Abstracts  
Veterinary Bulletin  
Scopus  
Current Contents - Agriculture, Biology & Environmental Sciences  
Referativnyi Zhurnal VINTI-RAN (Russian Academy of Sciences)

## EDITORIAL BOARD

---

### *Editors-in-Chief*

**Andy Greer**, Lincoln University Faculty of Agriculture Horticulture Viticulture, Christchurch, New Zealand  
Gastrointestinal nematodes, Livestock, Resistance management  
**Martin K. Nielsen**, University of Kentucky, Lexington, Kentucky, United States of America  
Helminths in horses, Diagnosis, Control, Epidemiology, Anthelmintic efficacy, Anthelmintic resistance  
**Michael P. Reichel**, Cornell University College of Veterinary Medicine, Ithaca, New York, United States of America  
Protozoa, Neospora caninum, Veterinary Public Health, ,  
**Theo de Waal**, University College Dublin, Dublin, Ireland  
Veterinary parasitology, Epidemiology, Anthelmintic resistance

### *Book Review Editors*

**Gad Baneth**, Hebrew University of Jerusalem The Koret School of Veterinary Medicine, Jerusalem, Israel  
Areas of expertise - Vector-borne zoonotic diseases • Veterinary parasitology • Leishmaniosis • Tick-borne pathogens  
**Elias Papadopoulos**, Aristotle University of Thessaloniki, School of Health Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Thessaloniki, Greece  
Areas of expertise - Anthelmintic resistance • Vector-borne diseases • Arthropods

### *Editorial Advisory Board*

**Rodney Brown Besier**, Brown Besier Parasitology Pty Ltd, Albany, Australia  
Internal And External Parasites Of Ruminants, Nematode Epidemiology And Control, Anthelmintic Resistance  
**Frederic Beugnet**, Boehringer Ingelheim Animal Health, Lyon, France  
Cats, Dogs, Horses, Entomology, Acarology, Helminthology, Epidemiology, Vector borne pathogens  
**Dwight Bowman**, Cornell University, Ithaca, New York, United States of America  
**Luis Cardoso**, University of Trás-os-Montes and Alto Douro, Vila Real, Portugal  
Areas of expertise - Veterinary parasitology • Vectorborne pathogens of domestic and wild animals • Parasitic zoonoses  
**Edwin Claerebout**, Ghent University Department of Virology Parasitology and Immunology, Merelbeke, Belgium  
Veterinary Parasitology, Gastrointestinal Nematodes, Cattle Parasites, Integrated Parasite Control, Vaccine Development  
**Matthew James Denwood**, University of Copenhagen Department of Veterinary and Animal Sciences, Frederiksberg, Denmark  
Epidemiology, Biostatistics, Quantitative Parasitology  
**Philippe Dorchies**, National Veterinary School Toulouse, Toulouse, France

Parasitology and Parasitic diseases, Acarology, Entomology and helminthology, Epidemiology, Pathology, Control

**Pierre Dorny**, Institute of Tropical Medicine Antwerp, Department of Biomedical Sciences, Antwerp, Belgium  
Expertise - Epidemiology of zoonotic parasites, parasite diagnosis, helminth control, tropical veterinary medicine

**Geoffrey Fosgate**, University of Pretoria, Pretoria, South Africa  
Veterinary Epidemiology, Biostatistics and Diagnostic Test Validation

**Caroline Frey**, University of Bern Vetsuisse Faculty Department of Infectious Diseases and Pathobiology Institute of Parasitology, Bern, Switzerland  
Expertise - Veterinary parasitology, zoonotic parasites, molecular detection, serology, foodborne parasites

**Stanny Geerts**, Institute of Tropical Medicine, Antwerpen, Belgium  
Trypanosomosis, Helminth zoonoses, Anthelmintic resistance

**Claudio Genchi**, University of Milan, Milan, Italy  
Helminthology, Dirofilaria infection, vector borne diseases

**John Gilleard**, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada  
Anthelmintic Drug Resistance, Helminth Genetics And Genomics, Molecular Epidemiology And Diagnostics

**Luis F. Pita Gondim**, Federal University of Bahia, School of Veterinary Medicine / Department of Veterinary Anatomy, Pathology and Clinics, Salvador, Brazil  
Coccidia, Sarcocystidae

**Dan Howe**, University of Kentucky, Lexington, Kentucky, United States of America  
Apicomplexan Parasites, Molecular Genetics, Microbial Pathogenesis

**Ikuo Igarashi**, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Japan  
Survey of protozoan disease, Diagnostics of protozoan diseases, Development of chemotherapy

**Anja Joachim**, University of Veterinary Medicine, Department of Pathobiology, Institute of Parasitology, Vienna, Australia  
Areas of expertise - Porcine parasites • Coccidia • Diagnostic parasitology • Zoonoses • Vector-borne pathogens of domestic animals

**Pikka Jokelainen**, State Serum Institute, Department of Bacteria, Parasites and Fungi, Infectious Disease Preparedness, Laboratory of Parasitology, Copenhagen, Denmark  
Zoonotic parasites, Toxoplasma gondii, One health

**Ray Kaplan**, The University of Georgia, Athens, Georgia, United States of America  
Anthelmintic Resistance, Parasite Diagnosis, Epidemiology And Control Of Gastrointestinal Helminths

**Andrew Kotze**, CSIRO Queensland Bioscience Precinct, St Lucia, Australia  
Anthelmintic resistance, Helminth control, Drug discovery

**Laura Kramer**, University of Parma, Parma, Italy  
Parasitology Epidemiology Pathogenesis Immunology Control Dog Cat Horse Pig Ruminants

**Marcelo Labruna**, University of Sao Paulo, São Paulo, Brazil

**Adrian Luis Lifschitz**, Pharmacology Laboratory, Tandil Veterinary Research Center (CIVETAN) (UNCPBA-CICPBA-CONICET), Faculty of Veterinary Sciences, UNCPBA, Tandil, Argentina  
pharmacology of antiparasitic drugs, pharmacokinetics

**David Lindsay**, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, United States of America  
Apicomplexan parasites, Zoonotic parasites, in vitro development

**Alan A. Marchiondo**, Zoetis Genetics, Santa Fe, NM, Michigan, United States of America  
Parasiticide Efficacy, Ecto- And Endoparasites, Companion And Food-Production Animals

**Marcelo Molento**, Federal University of Parana, Curitiba, Brazil  
Epidemiology of parasite infections, Forecast analysis, Drug resistance, ,

**Jorge Morales-Montor**, National Autonomous University of Mexico Department of Immunology, Ciudad de México, Mexico  
Helminthes, Neuroimmunoendocrinology, Host-Parasite interactions

**Vinny Naidoo**, University of Pretoria, Pretoria, South Africa  
Pharmacokinetics, Preclinical Safety Testing, Phytomedicines, Regulatory Pharmacology, ,

**Pia Olafson**, USDA-ARS Knippling-Bushland US Livestock Insects Research Laboratory, Kerrville, Texas, United States of America  
livestock ectoparasites, Arthropod disease vectors, Host-vector interactions, Pesticide resistance

**Domenico Otranto**, University of Bari, Bari, Italy  
Parasitic Zoonosis, Vector Borne Diseases, Filarioid, ,

**Roberto Papini**, University of Pisa, Pisa, Italy  
Veterinary parasitology, Veterinary parasitic diseases, Zoonotic parasites, Zoonotic parasitic diseases

**Kurt Pfister**, Ludwig Maximilians University Munich, Munich, Germany  
Ticks and Tick-borne diseases (all animal species), Ruminant helminths including epidemiology, prevention and control, Targeted anthelmintic treatment of horses

**Dierk Rebeski**, Lohmann Animal Health GmbH und Co KG, Cuxhaven, Germany

**Gereon Schares**, Friedrich-Loeffler-Institute Federal Research Institute for Animal Health, Greifswald, Germany  
Toxoplasmosis, *Toxoplasma gondii*, Neosporosis, *Neospora* spp., Besnoitiosis, *Besnoitia* spp.,  
*Hammondia* spp., Cryptosporidiosis, *Cryptosporidium* spp., Echinococcosis

**Theo Schettlers**, University of Pretoria, Department of Veterinary Tropical Diseases, Pretoria, South Africa  
Tick Borne Diseases, Vaccine development, Pathology, Immunology

**Johann Schröder**, Meat and Livestock Australia, North Sydney, Australia  
Experimental Design, Epidemiology, Chemical Parasiticides, Integrated Parasite Management, Anti-  
Parasitic Vaccines, Parasite Diagnostics, Ticks, Flies, Lice, Nematodes, Cestodes, Trematodes

**Jan Šlapeta**, University of Sydney Faculty of Science Sydney School of Veterinary Science Laboratory of  
Veterinary Parasitology, Camperdown, New South Wales, Australia  
Biology, Apicomplexa, Parasites, Fleas and ticks, Vector borne diseases, Veterinary diagnostics,  
Veterinary parasitology education

**Ian Sutherland**, Hopkirk Research Institute, Palmerston North, New Zealand  
Parasitology, immunology, anthelmintic resistance, welfare

**Mike Taylor**, Vparst Limited, York, United Kingdom  
Sheep, cattle, worm control, fluke, coccidiosis, anthelmintic resistance, FECRT methods

**Andrew Thompson**, Murdoch University, Murdoch, Australia  
Expertise - Zoonoses, cestodes, enteric protozoa, trypanosomes, wildlife

**Donato Traversa**, University of Teramo Veterinary Hospital, Teramo, Italy  
Companion animals, Helminths, Vector-borne diseases

**Gert Venter**, University of the Free State, Bloemfontein, South Africa  
Culicoides Biting Midges, Vector Competence And Capacity

**Georg Von Samson-Himmelstjerna**, Free University of Berlin, Berlin, Germany  
Helminthoses in horses, dogs, cats and ruminants, Ticks and tick transmitted diseases, Drug  
resistance, Mechanism of drug action

**Lihua Xiao**, South China Agricultural University College of Veterinary Medicine, Guangzhou, China  
Protozoa, *Cryptosporidium*, *Giardia*, Molecular epidemiology, Zoonosis

**Dante Zarlenga**, USDA-ARS Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, Maryland, United States of  
America  
Food-borne and Animal Parasitology, molecular biology, phylogeny

**Xing-Quan Zhu**, Shanxi Agricultural University, College of Veterinary Medicine, Taigu, China  
Parasite epidemiology, Diagnostics and control strategies, Parasite genetics, Genomics and functional  
omics, Molecular vaccines

**Annetta Zintl**, University College Dublin, Dublin, Ireland  
Molecular epidemiology, Immunology, Vaccine development, Parasitic protozoa and helminths, ,



## GUIDE FOR AUTHORS

---

### **Types of contribution**

1. Original research papers (Regular Papers)
2. Review articles
3. Letters to the Editor
4. Book reviews

*Original research papers* should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

*Review articles* should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. They may be submitted or invited.

*Letters to the Editor* offering comment or useful critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editors-in-Chief. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.

*Book reviews* will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than 2 years old and were written in English.

Book reviews will be solicited by the Book Review Editor. Unsolicited reviews will not usually be accepted, but suggestions for appropriate books for review may be sent to one of the Book Review Editors noted below:

Dr G. Baneth  
School of Veterinary Medicine,  
Hewbrew University,  
Rehovot,  
Israel  
gad.baneth@mail.huji.ac.il

Dr E. Papadopoulos  
Faculty of Veterinary Medicine,  
Aristotle University of Thessaloniki,  
Thessaloniki,  
Greece  
eliaspap@vet.auth.gr

### **Submission checklist**

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

#### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

*Manuscript:*

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

*Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable)

*Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa

- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements
- We require that non-commercial product names are used throughout the text in submissions. You may include the commercial name(s) of products in the Material and Methods section, then use only the non-commercial name thereafter

For further information, visit our [Support Center](#).

## BEFORE YOU BEGIN

### *Ethics in publishing*

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

### *Animal Welfare*

Circumstances relating to animal experimentation must meet the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences. They are obtainable from the following URL: [https://grants.nih.gov/grants/olaw/guiding\\_principles\\_2012.pdf](https://grants.nih.gov/grants/olaw/guiding_principles_2012.pdf). Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of Veterinary Parasitology. Please include an animal welfare statement under the heading "Animal welfare statement" at the end of the text.

### *Declaration of competing interest*

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors should complete the declaration of competing interest statement using [this template](#) and upload to the submission system at the Attach/Upload Files step. **Note: Please do not convert the .docx template to another file type. Author signatures are not required.** If there are no interests to declare, please choose the first option in the template. This statement will be published within the article if accepted. [More information](#).

### *Submission declaration and verification*

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

### *Preprints*

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

### *Use of inclusive language*

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

## Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. [More details and an example](#)

## Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

## Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

### *Article transfer service*

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information](#).

## Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

### *Elsevier supports responsible sharing*

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

## Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

## Open access

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

### *Elsevier Researcher Academy*

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

### *Language (usage and editing services)*

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

### **Submission**

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

**A cover letter is required for each new submission.** It should address the novelty and significance of the work and how it fits within the defined scope of Veterinary Parasitology. Essential information, issues of concern or potential problems, (such as other publications or submissions containing similar information) should be identified in the cover letter. Authors who submit papers based on local data/surveys will need to indicate why their paper is relevant to a broader readership.

Authors are invited to suggest the names of up to 5 referees (with email addresses) whom they feel are qualified to evaluate their submission. Submission of such names does not, however, imply that they will definitely be used as referees.

For queries concerning the submission process or journal procedures please visit the [Elsevier Support Center](#). Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Authors submitting hard copy papers will be asked to resubmit using Elsevier Editorial System.

Submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.

### **Article Transfer Service**

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. More information about this can be found here: <https://www.elsevier.com/authors/article-transfer-service>.

### *Submit your article*

Please submit your article via <https://www.editorialmanager.com/VETPAR/default.aspx>.

## **PREPARATION**

### **Peer review**

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review](#).

If at all possible please refrain from sending chasers to the Editorial Office asking about the status of your paper under review, as the Editors aim to review your paper as efficiently as possible and the enquiry is unlikely to speed up the process.

### **Use of word processing software**

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

### **Article structure**

Manuscripts should have **numbered lines** with wide margins and **double spacing** throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscript should be numbered.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

Manuscripts in general should be organized in the following order:

Title (should be clear, descriptive and not too long)

Name(s) of author(s)

Complete postal address(es) of affiliations

Full telephone, Fax No. and e-mail address of the corresponding author

Present address(es) of author(s) if applicable

Complete correspondence address including e-mail address to which the proofs should be sent

Abstract

Keywords (indexing terms), normally 3-6 items. Please refer to last index (Vol. 100/3-4).

Introduction

Material studied, area descriptions, methods, techniques

Results

Discussion

Conclusion

Acknowledgments and any additional information concerning research grants, etc.

References

Tables

Figure captions

Tables (separate file(s))

Figures (separate file(s)).

Titles and subtitles should not be run within the text. They should be typed on a separate line, without indentation. Use lower-case letter type.

SI units should be used.

Elsevier reserves the privilege of returning to the author for revision accepted manuscripts and illustrations which are not in the proper form given in this guide.

### **Subdivision - numbered sections**

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

### **Essential title page information**

• **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

• **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

• **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

• **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

### Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should be clear, descriptive and not more than 400 words.

### Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

### Formulae

1. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.
2. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.
3. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.
4. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of e are often more conveniently denoted by exp.
5. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca<sup>2+</sup>, not as Ca<sup>++</sup>.
6. Isotope numbers should precede the symbols e.g. <sup>18</sup>O.



7. The repeated use of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>).

#### *Abbreviations*

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

#### *Acknowledgements*

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

#### *Formatting of funding sources*

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

#### **Nomenclature**

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.

2. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.

3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

4. For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.

5. For the denomination of parasitic diseases or infections, authors are advised to consult the Standardized Nomenclature of Animal Parasitic Diseases (SNOAPAD) published in 1988 in *Veterinary Parasitology* (Kassai, T. et al., 1988. *Vet. Parasitol.* 29, 299-326).

#### **Submission of sequence data to databases**

New nucleotide or amino acid sequence data must be deposited in publicly accessible databases, such as GenBank™, EMBL or DDJB, and an accession number obtained and submitted to the Publisher (at the latest) together with the final, revised manuscript. The accession number should appear in a separate paragraph in the Materials and Methods section (example: Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the GenBank™, EMBL and DDBJ databases under the accession numbers: **XXXX, XXXX**). In order for automatic links to be made between papers and databases, authors should type the accession number in bold, underlined text. Letters in the accession number should always be capitalised. When published they will appear in normal type.

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to <https://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

### Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

#### Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

### Artwork

#### Electronic artwork

##### General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

#### Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

#### Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.



### *Illustration services*

[Elsevier's Author Services](#) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

### **Tables**

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.
2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.
3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.
4. Each table should occupy a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.
5. Each table should have a brief and self-explanatory title.
6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.
7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.
8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

### **References**

#### *Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

#### *Data references*

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

#### *Reference management software*

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software](#).

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/veterinary-parasitology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

### *Reference Style*

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.
2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed – if necessary – by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp. 12–16)".
3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.
4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on author's names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates – publications of the same author with one co-author – publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1974a, 1974b, etc.
5. Use the following system for arranging your references:
  - a. For periodicals  
Lanusse, C.E., Prichard, R.K., 1993. Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. *Vet. Parasitol.* 49, 123–158.
  - b. For edited symposia, special issues, etc., published in a periodical  
Weatherley, A.J., Hong, C., Harris, T.J., Smith, D.G., Hammet, N.C., 1993. Persistent efficacy of doramectin against experimental nematode infections in calves. In: Vercruyse, J. (Ed.), *Doramectin – a novel avermectin*. *Vet. Parasitol.* 49, 45–50.
  - c. For books  
Blaha, T. (Ed.), 1989. *Applied Veterinary Epidemiology*. Elsevier, Amsterdam, 344 pp.
  - d. For multi-author books  
Wilson, M.B., Nakane, P.K., 1978. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: Knapp, W., Holubar, K., Wick, G. (Eds.), *Immunofluorescence and Related Staining Techniques*. North Holland, Amsterdam, pp. 215–224.
6. Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references in accordance with BIOSIS Serial Sources, published annually by BIOSIS. The correct abbreviation for this journal is *Vet. Parasitol.*
7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.
8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".
9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.
10. Web references may be given. As a minimum, the full URL is necessary. Any further information, such as Author names, dates, reference to a source publication and so on, should also be given.
11. Articles available online but without volume and page numbers may be referred to by means of their Digital Object identifier (DOI) code.

### *Journal abbreviations source*

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

## **Data visualization**

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

## **Supplementary material**

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

## **Research data**

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

### *Data linking*

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

### *Mendeley Data*

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

### *Data statement*

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

## **AFTER ACCEPTANCE**

### **Online proof correction**

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Authors can also keep track of the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track your accepted article" option on the journal's homepage <https://www.elsevier.com/locate/vetpar> For privacy, information on each article is password-protected. The author should key in the "Our Reference" code (which is in the letter of acknowledgement sent by the Publisher on receipt of the accepted article) and the name of the corresponding author.

### **Offprints**

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

### **AUTHOR INQUIRIES**

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>

## Processo de Submissão

### [CLIQUE AQUI PARA TIPOS DE ARTIGO E LIMITES DE PALAVRA](#)

Todos os envios originais devem conter:

- Uma declaração de aprovação (ou renúncia) do Comitê de Revisão Institucional (IRB) na seção Métodos
- Seção de agradecimentos (se aplicável) após a conclusão do manuscrito, seguida por
- Uma declaração de contribuição do autor para cada autor listado, seguido por
- Uma declaração de divulgação do autor para cada autor listado em uma submissão, mesmo que não haja conflitos a serem divulgados, seguido por,
- Declaração (ões) de financiamento, mesmo que não haja informações de financiamento a declarar.

Consulte [APROVAÇÕES DO IRB, CONSENTIMENTO DO PACIENTE E TRATAMENTO ÉTICO DE ANIMAIS](#)

Veja [CONFIRMAÇÃO DO AUTOR E DECLARAÇÕES DE DIVULGAÇÃO](#)

Consulte [INFORMAÇÕES DE FINANCIAMENTO: CONFORMIDADE E DECLARAÇÕES](#)

**Todos os manuscritos devem ser preparados de acordo com os [Requisitos Uniformes para Manuscritos Submetidos a Revistas Biomédicas](#) . [www.icmje.org](http://www.icmje.org)**

Ao enviar seu manuscrito para revisão por pares, esteja preparado para:

- Digite o título completo do manuscrito
- Insira os nomes completos e afiliações institucionais de TODOS os autores listados
- Insira os endereços de e-mail institucionais de TODOS os autores listados
- Identifique o autor correspondente
- Digite um título corrido (abreviado) de no máximo 45 caracteres (incluindo espaços).
- Insira de 3 a 6 palavras-chave ou frases
- Forneça um resumo estruturado de no máximo 300 palavras
- Forneça os nomes e endereços de e-mail de pelo menos cinco revisores preferenciais em potencial familiarizados com a área. Certifique-se de que os revisores preferidos não sejam de sua universidade ou instituição ou com quem você tenha colaborado. Qualquer pessoa que o autor não deseja ser considerada também deve ser nomeada como um revisor não preferencial. A seleção do revisor final fica a critério do Editor.

### **Crie um título efetivo**

- Os títulos dos manuscritos devem ser breves, conter termos-chave e identificar claramente o propósito do trabalho realizado

- Os títulos dos manuscritos não devem exceder 15 -18 palavras. Exceções podem ser feitas com a aprovação do Editor
- Os títulos dos manuscritos devem ser diretos e diretos. Lembre-se de que a revista tem um público global, portanto, uma linguagem não-vernácula clara e concisa é mais eficaz
- Evite o uso de locais específicos no título
- Não use nomes proprietários / marcas registradas no título
- Não use acrônimos no título, a menos que sejam universalmente reconhecidos e aceitos
- **NOTA** : A página de título de sua submissão deve ser incluída como parte de seu documento de texto principal (não como um arquivo separado).

### **Nomenclatura de arquivos**

Todos os nomes de arquivo devem estar em inglês e conter apenas caracteres alfanuméricos. Não inclua espaços, símbolos, caracteres especiais, travessões, pontos ou sublinhados. Rotule cada arquivo com o sobrenome do primeiro autor, seguido pelo conteúdo do arquivo (ou seja: SmithText; SmithTables; SmithFigureLegends; SmithFig1, etc.)

Importante: Carregue arquivos individuais de todo o material manuscrito conforme descrito aqui - NÃO carregue um arquivo PDF combinado contendo todo o material em sua inscrição.

### **Preparação do Manuscrito**

Prepare textos de manuscritos, legendas de figuras e tabelas em Microsoft Word, em espaço duplo. A ordem dos elementos em cada manuscrito deve ser:

- Página de título (com o título do manuscrito completo, todos os autores contribuintes, suas afiliações e endereços de e-mail, um título curto, uma denotação do autor correspondente e uma lista de 3-6 palavras-chave)
- Abstrato
- Texto principal (não incorpore figuras ou tabelas)
- Conclusão (como um parágrafo separado, não como parte da seção de Discussão)
- Agradecimentos (se aplicável)
- Declaração de confirmação de autoria (veja abaixo)
- Declaração (ões) de divulgação do (s) autor (es) (veja abaixo)
- Declaração de financiamento (veja abaixo)
- Referências
- Legendas de figuras
- Mesas
- Arquivos suplementares (se aplicável; **NOTA**: As informações suplementares não serão editadas ou editadas; serão postadas online conforme fornecidas).

## Texto do Manuscrito

A contagem máxima de palavras para artigos originais não deve exceder 3.000 palavras. Em geral, o texto deve ser organizado nos títulos: Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusões. Use apenas abreviações padrão, que podem ser encontradas no Manual de Estilo para Autores e Editores da AMA ou no Manual de Estilo de Editores do Conselho de Biologia, 10 / e. No primeiro uso, solete os termos e forneça abreviações entre parênteses. Depois disso, use apenas as abreviações. Não é necessário explicitar as unidades de medida padrão. Use nomes genéricos para medicamentos, se possível. Se desejar usar o nome de um medicamento patenteado na primeira vez que ele aparecer, use o nome genérico seguido do nome comercial, fabricante e localização entre parênteses. Se nomes proprietários devem ser usados, inclua informações sobre marcas registradas. Os nomes científicos das espécies devem aparecer com o gênero escrito por extenso na primeira ocorrência e abreviado depois disso. Os nomes de família devem aparecer na primeira ocorrência de espécies incomuns.

## Referências

As referências devem ser citadas no texto usando o sistema de nome / data [por exemplo, (Bodinayake et al. 2018)]. A lista de referências no final do manuscrito deve ser em espaço duplo e organizada em ordem alfabética por nome e ano. Inclua a seção de referência como parte do arquivo de texto principal, não como um arquivo separado. Use abreviações de periódicos conforme fornecidas pelo PubMed / Medline. Liste apenas os primeiros quatro autores seguidos por et al. Se forem utilizadas referências a comunicações pessoais ou dados não publicados, não devem constar da lista de referências. Devem ser citados no texto entre parênteses: (AB Jones, comunicação pessoal). Fontes para comunicações pessoais devem fornecer aprovação por escrito no momento do envio. Inclua permissão por escrito dos autores para citar dados não publicados ou artigos ainda no prelo. Incluir entre as referências os artigos aceitos, mas ainda não publicados; identifique o nome da publicação e adicione "In Press". Se a referência foi publicada online, forneça o número DOI no lugar do intervalo de páginas.

### ***Estilo de amostra para referências :***

#### *Artigo de jornal:*

Dawson P, Malik MR, Parvez F, Morse SS. O que aprendemos sobre o surgimento da síndrome respiratória do coronavírus no Oriente Médio em humanos? Uma revisão sistemática da literatura. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2019; 19: 174-192.

#### *Livro:*

Higgs S, Vanlandingham DL, Powers AM, eds. *Vírus da Chikungunya e do Zika: Ameaças globais emergentes à saúde*. Cambridge, MA: Academic Press, um Imprint of Elsevier; 2018.

#### *Capítulo em um livro:*

Halstead SB. Doença de Chikungunya e Zika. In: Higgs S, Vanlandingham DL, Powers AM, eds. *Vírus da Chikungunya e do Zika : Ameaças globais emergentes à saúde*. Cambridge, MA: Academic Press, um Imprint of Elsevier; 2018: 69-85.

## Figura Legends

As legendas das figuras devem ser enviadas como um arquivo Word separado e em espaço duplo. Na legenda, forneça explicações para quaisquer abreviações, setas, etc. que apareçam na figura. As ampliações devem ser incluídas quando apropriado. Se a ilustração for tirada de uma publicação protegida por direitos autorais, a permissão deve ser garantida, o crédito apropriado deve ser dado na legenda e uma referência correspondente deve aparecer na seção de referência.

### **Mesas**

Todas as tabelas devem ser preparadas em um único arquivo Word. Forneça um título para cada tabela. Cite as tabelas em sequência no texto. Explique as abreviações usadas no corpo da tabela nas notas de rodapé. Detalhes das condições experimentais devem ser incluídos nas notas de rodapé da tabela. Se a tabela for tirada de uma publicação protegida por direitos autorais, a permissão deve ser garantida, o crédito apropriado deve ser dado na legenda e uma referência correspondente deve aparecer na seção de referência.

### **Figuras**

- O envio de arquivos de figura .TIFF ou .EPS de alta resolução é altamente recomendado.
- As figuras não devem ser incorporadas ao arquivo do manuscrito.
- Cite as figuras consecutivamente no texto entre parênteses.
- Uma legenda deve ser fornecida para cada figura e todas as legendas numeradas consecutivamente.
- As imagens não devem mostrar o nome de um paciente ou fabricante.
- Não inclua nenhuma ilustração em seu arquivo de texto.

### **Endereço correspondente**

Após as referências, forneça o nome e a afiliação completa e o endereço de e-mail institucional da pessoa para quem a correspondência deve ser enviada.

### **Revisões do manuscrito**

Taxas de processamento e códigos de submissão NÃO são exigidos para revisões de manuscritos submetidos anteriormente. Para fazer o upload de uma revisão de um manuscrito, o autor responsável pelo envio deve fazer login em seu [Centro de Autor](#) e clicar em "Revised Manuscripts in Draft". Todos os envios revisados deverão atender a todas as condições de formatação aqui descritas. Os envios que não atenderem a esses requisitos serão cancelados e devolvidos ao autor responsável pelo envio para configuração adequada.

### **Cartas para o editor**

Doenças transmitidas por vetores e zoonoses considerarão Cartas ao Editor comentando o conteúdo científico de um artigo publicado na Revista. As cartas não devem exceder 500 palavras de texto e 5 referências. As cartas enviadas para publicação devem ser originais e não devem ser submetidas a nenhuma outra publicação simultaneamente.

Para perguntas sobre submissões de manuscritos, entre em contato com nossa [Divisão de Serviços ao Autor](#).