

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
PROGRAMA DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA
MEDICINA E BEM-ESTAR ANIMAL

Daniel Zacharias Zago

**PESQUISA DE HEMOPARASITAS (BACTÉRIAS E PROTOZOÁRIOS)
E PARASITAS TECIDUAIS EM EQUINOS DO PANTANAL DO MATO
GROSSO E MATO GROSSO DO SUL.**

São Paulo
2023

Daniel Zacharias Zago

**PESQUISA DE HEMOPARASITAS (BACTÉRIAS E PROTOZOÁRIOS)
E PARASITAS TECIDUAIS EM EQUINOS DO PANTANAL DO MATO
GROSSO E MATO GROSSO DO SUL.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu da Universidade Santo Amaro - UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Orientadora: Profa. Dra. Valeria Castilho Onofrio

São Paulo

2023

Z23p Zago, Daniel Zacharias.

Pesquisa de hemoparasitas (bactérias e protozoários) e parasitas teciduais em equinos do Pantanal do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul / Daniel Zacharias Zago. — São Paulo, 2023.

43 p.: il., P&B.

Dissertação (Mestrado em Veterinária) —
Universidade Santo Amaro, 2023.

Orientadora: Prof.^a Me. Dr.^a Valéria Castilho Onófrio.

1. Equinos. 2. Pantanal. 3. Parasitas. I. Onófrio, Valéria Castilho, orient. II. Universidade Santo Amaro. III. Título.



Programa de Pós-graduação Stricto Sensu
Mestrado em Medicina Veterinária
Ata de Defesa

Ao trigésimo primeiro dia do mês de janeiro do ano de dois mil e vinte e três, via conferência presencial, conforme Regimento Geral e Regulamento de Pós-graduação da UNISA teve início às 14h00min, o exame de defesa intitulada: ***“Pesquisa de hemoparasitas (bactérias e protozoários) e parasitas teciduais em equinos do pantanal do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul”.*** Do(a) mestrando(a) **Daniel Zacharias Zago**, regularmente matriculado(a) no programa de Mestrado em Medicina Veterinária e Bem-Estar Animal. Os requisitos exigidos foram cumpridos conforme registros constantes nos arquivos da Secretaria de Pós-graduação segundo encaminhamento da Prof. Doutor Rafael Garabet Agopian, Coordenador do Programa. Os trabalhos foram instalados pelo presidente da banca examinadora e orientadora Profa. Doutora Valéria Castilho Onofrio, pela UFRJ, que foi constituída pelos seguintes professores: Prof. Doutor Arlei Marcili, Doutor pela USP e Prof. Doutor Ryan Emiliano da Silva, Doutor pela USP. A banca examinadora, tendo decidido aceitar a pesquisa, passou à arguição do(a) aluno(a). Encerrados os trabalhos, deram o parecer final conforme consta a seguir:

Profa. Doutora Valéria Castilho Onofrio

Parecer: Aprovado Assinatura: [Assinatura]

Prof. Doutor Arlei Marcili

Parecer: Aprovado Assinatura: [Assinatura]

Prof. Doutor Ryan Emiliano da Silva

Parecer: APROVADO Assinatura: [Assinatura]

Campus Interlagos: Rua Prof. Enéas de Siqueira Neto, 340 - Jardim das Imbuías, São Paulo - SP

Campus Metrô Adolfo Pinheiro: Rua Isabel Schmidt, 349 - Santo Amaro, São Paulo - SP

Campus Metrô Marechal Deodoro: Rua Dr. Gabriel dos Santos, 30 - Santa Cecília, São Paulo - SP

Dedico este trabalho a Deus por ter me proporcionado Saúde, Resiliência e Coragem nesta etapa de minha vida.

Dedico a minha família por todo apoio em todos os momentos, de alegria, saúde e doença.

Ao meu querido pai Ricardo, símbolo de honestidade e respeito.

À minha querida mãe Janete, sempre me apoiando em todos os momentos.
À minha irmã Lucila pela preocupação, suporte e apoio em minhas viagens de pesquisa.

Aos demais familiares que apoiaram direta ou indiretamente.

Aos meus amigos que sempre confiaram em mim.

A todos os docentes do programa pela paciência, confiança, atenção e dedicação e todos os demais colegas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a UNISA por todo apoio e incentivo, Universidade que faz parte de toda minha formação profissional, desde a graduação.

Em especial ao Prof. Dr. Arlei Marcili por todo conhecimento que me foi passado, pela paciência, atenção, disposição e vontade de ensinar e por acreditar em mim e em meu trabalho.

A minha orientadora Profa. Dra. Valeria Castilho Onofrio pela atenção e preocupação nos momentos que passei.

Ao Prof. Dr. Herbert Sousa Soares pela ajuda com a análise dos exames de RIFI.

Aos amigos do Rancho Tucura, Fazenda Nhuvai, Fazenda Santa Lucia e Fazenda Bafo da Onça, pela recepção, amizade e por me possibilitarem fazer a coleta das amostras, e a todos os amigos e colegas que estiveram ao meu lado nesta etapa de minha vida.

“Cresce perante os obstáculos. - A graça do Senhor não te há de faltar: "Inter medium montium pertransibunt aquae!": - passarás através das montanhas! Que importa que de momento tenhas de restringir a tua atividade, se em breve, como mola que foi comprimida, chegarás incomparavelmente mais longe do que nunca sonhaste?”

“São José Maria Escrivá”

RESUMO

O bioma Pantanal possui grande diversidade de fauna e flora, além de ser a maior planície alagável do mundo. Intercala períodos de chuva e seca, proporcionando o ambiente ideal para a proliferação de vetores e patógenos. O cavalo é de fundamental importância nos sistemas de produção de bovinos de corte, atuando no manejo do gado, como meio de transporte, principalmente nas regiões de difícil acesso. Não menos importante, é peça fundamental para o ecoturismo na região, atividade cada dia mais explorada. Estes animais podem entrar em contato com diversos agentes durante sua vida, entre eles, os hemoparasitas e parasitas teciduais os quais são responsáveis por extensos prejuízos econômicos e podem oferecer risco à saúde pública. Diante do exposto, objetivou-se identificar a ocorrência de piroplasmose equina e leishmaniose por exames moleculares e a soroprevalência de anticorpos contra *Neospora* spp, *T. gondi* e *Rickettsia* spp.

Foram obtidas amostras de sangue de 166 animais acima de 2 anos de idade de ambos os sexos utilizados para trabalho e reprodução em propriedades particulares nos municípios de Corumbá e Miranda no MS e Poconé no estado do MT. Anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* foram detectados em apenas uma amostra (0,6%). Todas as amostras foram negativas na pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum*. Foram detectados anticorpos anti-*Rickettsia* sp. em 36,7% (61/166) dos equinos amostrados, sendo 2,2% (1/45) para os animais amostrados no estado do Mato Grosso do Sul e 49,58% (60/121) das amostras provenientes do Mato Grosso. Um total de 24,09% (40/166) das amostras foram positivas para *Babesia* sp./*Theileria* sp., sendo 26,4% (32/121) de equinos amostrados no estado do Mato Grosso e 17,7% (8/45) do estado do Mato Grosso do Sul. A ocorrência de *L. infantum* foi de 25,9% (43/166) , sendo 14,0% (17/121) de equinos amostrados no estado do Mato Grosso e 57,7% (26/45) provenientes do estado do Mato Grosso do Sul. A ocorrência em Miranda foi de 100%.

Palavras-chave: Equinos, Pantanal, Parasitas, *Rickettsia* spp., *Leishmania infantum*.

ABSTRACT

The Pantanal is a biome with a wide variety of fauna and flora, its great floodplain interspersed by periods of rain and drought makes it the ideal environment for the proliferation of various vectors and pathogens. The horse is of fundamental importance in beef cattle production systems, acting in cattle management as a means of transport, especially in hard-to-reach regions. Not least, it is a fundamental part for ecotourism in the region, an increasingly explored activity. These animals can come into contact with several agents during their lifetime, including hemoparasites and tissue parasites, which are responsible for extensive economic losses and may pose a risk to public health. In view of the above, the objective was to identify the occurrence of equine piroplasmosis and leishmaniasis by molecular tests and the seroprevalence of antibodies against *Neospora* spp, *T. gondii* and *Rickettsia* spp. Blood samples were obtained from 166 animals over 2 years of age of both sexes used for work and reproduction on private properties in the municipalities of Corumbá and Miranda in MS and Poconé in the state of MT. Anti-*Toxoplasma gondii* antibodies were detected in only one sample (0.6%). All samples were negative for anti-*Neospora caninum* antibodies. Anti-*Rickettsia* sp. antibodies were detected. in 36.7% (61/166) of the horses sampled, being 2.2% (1/45) for the animals sampled in the state of Mato Grosso do Sul and 49.58% (60/121) of the samples from Mato Thick. A total of 24.09% (40/166) of the samples were positive for *Babesia* sp./*Theileria* sp., with 26.4% (32/121) of horses sampled in the state of Mato Grosso and 17.7% (8 /45) from the state of Mato Grosso do Sul. The occurrence of *L. infantum* was 25.9% (43/166) in the horses sampled, with 14.0% (17/121) from horses sampled in the state of Mato Grosso and 57.7% (26/45) from from the state of Mato Grosso do Sul. The occurrence in Miranda was 100%.

Keywords: Equines, Pantanal, Parasites, *Rickettsia* spp., *Leishmania infantum*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Municípios que foram amostrados nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul e número aproximado de animais amostrados por município.

Tabela 2. Titulação das amostras de equinos positivas na pesquisa de anticorpos anti-*Rickettsia* sp. e determinação do antígeno homologo.

Tabela 3. Ocorrência de parasitas dos gêneros *Babesia* e *Theileria* em equinos amostrados em diferentes propriedades no estado do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul.

Tabela 4. Ocorrência de *Leishmania infantum* em equinos amostrados em diferentes propriedades no estado do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Localização dos pontos de coleta das amostras

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Piroplasmose Equina.....	12
1.2 Riquetsioses	15
1.3 Leishmaniose	17
1.4 Toxoplasmose	20
1.5 Neosporose.....	21
2. Objetivos	23
2.1 Objetivos Gerais.....	23
2.2 Objetivos Específicos	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Local de estudo e obtenção das amostras	23
3.2 Diagnóstico sorológico.....	24
3.2.1 Detecção sorológica de anticorpos anti <i>N. caninum</i>	24
3.2.2 Detecção sorológica de anticorpos anti -<i>T.gondii</i>.....	25
3.2.3 Exame sorológico para pesquisa de anticorpos IgG anti-<i>Rickettsia</i>.....	26
3.3 DIAGNÓSTICO MOLECULAR	26
3.3.1 Extração de DNA	26
3.3.2 Diagnóstico molecular de <i>Leishmania</i>.	26
3.3.3 Diagnóstico molecular de <i>Babesia/Theileria</i>	26
3.3.4 Leitura e análise dos produtos de PCR	27
3.3.5 Purificação, clonagem e sequenciamento	27
4. RESULTADOS.....	28
5. DISCUSSÃO	30
6. CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS.....	35

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui a quarta maior população de equinos do planeta, com aproximadamente 5,85 milhões de cabeças.(1) A equideocultura é um setor que movimenta em torno de R\$ 16 bilhões por ano e gera 610 mil empregos diretos e 2,43 milhões de indiretos, sendo responsável por mais de 3 milhões de postos de trabalho no país.(2)

O Pantanal brasileiro é uma extensa planície constituída de diversos tipos de áreas úmidas contínuas, localizado na América do Sul, estando inserido na Bacia Hidrográfica do Alto Paraguai, que se localiza na região Centro-Oeste do Brasil. No Brasil, abrange os estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, e os países Bolívia e Paraguai.(3) Reconhecido como Patrimônio Nacional pela Constituição Federal de 1988 e Reserva da Biosfera pela UNESCO no ano de 2000.(4) É a maior área inundável do mundo, sendo este fenômeno de extrema importância para a produtividade da pecuária e pesca, para o controle natural de queimadas, a abundância e distribuição da fauna e flora da região. A sazonalidade das inundações está diretamente relacionada ao regime de precipitação pluviométrica, entretanto há áreas que permanecem secas ou inundadas durante todo o ano.(5)

O clima do Pantanal é tropical com duas estações bem definidas, verão chuvoso e inverno seco, com pluviosidade média anual em torno de 1.000mm, temperatura média anual de 24°C a 25°C e evapotranspiração anual superior a 1.140mm.(6,7)

O cavalo pantaneiro tem sua origem dos cavalos Ibéricos trazidos ao Brasil na época da colonização. Apesar dos cavalos terem sido usados pelos índios Guaicurus e colonizadores da região, sua importância foi intensificada com os surgimentos das fazendas de criação de bovinos de corte no início do século XVIII que necessitavam de cavalos para o manejo do gado.(8)

A principal atividade econômica do Pantanal é a pecuária de corte e o ecoturismo, tornando o cavalo fundamental para o desenvolvimento socioeconômico da região, servindo de ferramenta para lida com o gado e cavalgadas. Este fato proporciona uma estreita relação com o homem, por isso o conhecimento das enfermidades que podem acometer os equinos é de grande importância, não

somente do ponto de vista da medicina veterinária, mas também de saúde pública, já que algumas dessas enfermidades podem apresentar caráter zoonótico.(9)

O manejo físico, nutricional e sanitário adequado é indispensável para a prevenção de doenças em equinos. Dentre as principais afecções temos as doenças parasitárias, onde ectoparasitas e hemoparasitoses são responsáveis por prejuízos à sanidade, bem como no desempenho da função destes animais.(10) As hemoparasitoses são causadas por hemoparasitos (bactérias e protozoários), que podem ser transmitidos aos animais e ao homem por vetores.(11)

1.1 Piroplasmose Equina (PE)

A piroplasmose equina é uma doença causada pela infecção mista com os protozoários *Babesia caballi* e *Theileria equi*, transmitidos através da repasto de carrapatos ixodídeos. Acomete equídeos (cavalos, mulas, burros e zebras), sendo reconhecida por causar anemia hemolítica aguda nestes animais.(12,13,14,15) Responsável por sérias perdas econômicas na equideocultura, a doença é endêmica nas regiões tropicais e temperadas do mundo, onde predominam os carrapatos vetores.(16)

O termo "piroplasma", que originou o nome da doença, foi usado devido ao formato piriforme que ambos os parasitas apresentam quando estão infectando hemácias. O nome piroplasmose ainda é usado de maneira generalizada para referir-se a babesiose e teileriose equina, causadas por um ou outro protozoário separadamente.(13)

Babés em 1888, foi quem iniciou a descrição do gênero *Babesia*, após observar a presença de um tipo diferente de protozoário nos eritrócitos do sangue de bovinos na Romênia. Em 1893, Smith e Kilborne nomearam o agente da febre do Texas nos Estados Unidos como *Pyrosoma bigeminum*, e também demonstraram que tal agente havia sido transmitido por um carrapato. Inclusive, existe uma teoria de que este foi o primeiro relato da transmissão de um protozoário por um artrópode. Ainda em 1893, Starcovici visando homenagear Babés, propôs o nome *Babesia* para esse gênero.(22)

Segundo a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE), países da América Central e do Sul, Cuba, África, Ásia, Europa Oriente Médio e algumas regiões do sul

dos Estados Unidos são considerados como áreas de ocorrência de *B. caballi* e *T. equi*, sendo que a última espécie apresenta uma distribuição mais ampla.(17,18) Na América do Sul, a ocorrência da doença é reconhecida em todos os países, com exceção de regiões mais ao sul do Chile e Argentina. No Brasil, a ocorrência da doença já foi registrada em diferentes regiões do Brasil.(19)

Estudos baseados em detecção hematológica, sorológica e molecular, realizados em diferentes localidades do Pantanal, tem demonstrado que ambas as espécies, *B. caballi* e *T. equi*, estão amplamente distribuídas neste bioma.(18,20,21)

O gênero *Theileria* pertence à família Theileriidae, ordem Piroplasmida, subclasse Piroplasma, filo Apicomplexa (23). Infectam uma grande variedade de animais domésticos e silvestres, principalmente no Velho Mundo. Dentre as espécies de importância veterinária estão *Theileria annulata* e *Theileria parva* em bovinos, *Theileria lestoquardi* em ovelhas e *Theileria equi* em equinos.(24)

Laveran em 1901, descreveu e nomeou como *Piroplasma equi* um parasita intraeritrocitário encontrado no sangue de cavalos na África do Sul.(16) Posteriormente esta espécie foi transferida de gênero, passando a ser conhecida como *Nuttallia equi*, porém esta nova classificação também não se sustentou e pouco tempo depois houve uma nova mudança, desta vez para *Babesia equi*.(22)

Baseado em dados sobre sua biologia e em análises filogenéticas, Mehlhorn e Schein (12) redescreveram *B. equi* e a transferiram para o gênero *Theileria*, passando a chamá-la de *T. equi*. Estudos mais recentes, também baseados em filogenia molecular, tem apresentado uma diversidade incomum nas sequências geradas, inclusive resultando na descrição de uma nova espécie de *Theileria*, anteriormente considerada como um genótipo de *T. equi*. O que pode ser um forte indício da existência de um complexo de espécies, mas que pela sua proximidade, atualmente são consideradas como *T. equi*. (17,18,19,22)

Theileria equi é um parasito de grande importância epidemiológica, sobretudo em regiões tropicais e subtropicais, com prevalência variando entre 15 e 100%. O Brasil, em razão das suas condições climáticas, é considerado área endêmica para essa espécie.(25)

A transmissão da piroplasmose equina ocorre através da inoculação, durante o processo de alimentação do carrapato vetor, de hemoparasitas presentes no sangue do hospedeiro vertebrado.(12) Até o momento, apenas carrapatos da família

Ixodidae, pertencentes aos gêneros *Hyalomma*, *Rhipicephalus* e *Dermacentor*, demonstraram competência vetorial na transmissão de *T. equi* e *B. caballi*.(26,16) Scoles e Ueti (22) listaram seis gêneros de carrapatos compreendendo 33 espécies já citadas anteriormente como vetores competentes de um ou ambos os agentes causadores da piroplasmose no mundo.

No Brasil, as duas principais espécies responsáveis pela transmissão destes dois hemoprotozoários são *R. microplus* e *Dermacentor nitens*, sendo este último associado principalmente a *B. caballi*.(22,27) Porém estudos realizados nas últimas décadas têm sugerido uma maior propensão a infecção por *T. equi* em equinos com altas infestações com *Amblyomma cajennense* sensu lato.(22,28,29) Na região do Pantanal, infestações por carrapatos do gênero *Amblyomma* são frequentes em equinos soropositivos para *T. equi*, sendo *Amblyomma sculptum* a espécie mais comumente encontrada nesses animais.(25)

Animais infectados podem permanecer portadores desses hemoparasitas por longos períodos, atuando como fonte de infecção para outros carrapatos e sua introdução em áreas onde os vetores são prevalentes pode levar a uma propagação epizootica da doença.(18,19)

Os sinais clínicos da piroplasmose equina são inespecíficos, podendo ser facilmente confundida com outras condições hemolíticas semelhantes. Nos casos em que não há infecção mista, a doença causada por *T. equi* tende a apresentar maior gravidade quando comparada com *B. caballi*. A piroplasmose pode se apresentar nas formas superaguda, aguda, subaguda e crônica, sendo que a maioria dos animais das áreas endêmicas sobrevive à infecção.(18)

A forma superaguda é rara, sendo observada em animais extremamente debilitados ou moribundos, com pouca probabilidade de sobreviverem a doença. Já a forma aguda pode apresentar sintomas graves, mas que se tratados de forma adequada não levam a óbito. Na forma subaguda, a sintomatologia é mais branda, como perda de peso, febre, edema de membros inferiores, taquicardia e diminuição de desempenho. E a forma crônica, que muitos animais desenvolvem e onde são quase sempre assintomáticos ou apresentam sintomas clinicamente inespecíficos, como baixo desempenho, letargia, perda de peso e anemia discreta. Animais que apresentam a forma crônica, quando submetidos a situações que envolvem episódios de estresse como transporte, competições ou outras doenças

concomitantes, acabam manifestando novamente os sintomas agudos da doença.(18,19,25)

Para o diagnóstico, além da observação dos sinais clínicos, se utilizam também os exames laboratoriais, com métodos diretos como o esfregaço sanguíneo e os testes moleculares ou indiretos como a pesquisa de anticorpos. O esfregaço corado com Giemsa, feito através da punção do sangue periférico do animal, é a forma mais rápida e barata de diagnóstico, sendo ainda o primeiro método de escolha. Porém, em casos de baixa parasitemia no sangue ou na dificuldade em diferenciar qual o agente causador da doença, esse método pode apresentar limitações, além da possibilidade de confundir o parasita com artefatos da técnica de coloração.(30)

Os testes sorológicos como o imuno-enzimático de competição (cELISA) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) diferenciam de forma clara os soros positivos para *T. equi* e *B. caballi* dos negativos. A técnica molecular utiliza o diagnóstico por PCR, sendo considerado um dos melhores métodos, tanto pela sensibilidade quanto especificidade. Já quando comparado com o diagnóstico sorológico, indica um menor número de positivos, pois reage apenas se a amostra tem o parasito (infecção ativa), eliminando os resultados do falso positivo que podem ocorrer com a sorologia nos casos de infecções anteriores já curadas.(16,31)

1.2 Riquetsioses

As riquetsioses são enfermidades infecciosas causadas por bactérias gram-negativas, pertencentes ao gênero *Rickettsia*, família Rickettsiaceae e ordem Rickettsiales. São parasitas intracelulares obrigatórios que infectam principalmente células endoteliais de hospedeiros vertebrados, e tem como vetores os artrópodes, principalmente os carrapatos.(32,33)

Dentro do gênero *Rickettsia*, destacam-se as espécies pertencentes ao grupo da febre maculosa, que causam doenças infecciosas de caráter zoonótico e ocorrem em praticamente todo o mundo, além das novas riquetsias de patogenicidade ainda desconhecida que foram isoladas de carrapatos nos últimos anos.(34,35) Algumas das riquetsias transmitidas por carrapatos, inicialmente consideradas sem importância médica, hoje já são associadas a enfermidades em humanos.(35)

Baseado em estudos filogenéticos, Karkouri (36) sugeriram que os membros do gênero *Rickettsia* estão divididos em quatro grupos principais: grupo da febre maculosa (GFM), grupo do tifo (GT), grupo de transição (GTR) e grupo ancestral (GA). As riquetsias dos GFM e GA estão associadas principalmente a carrapatos, enquanto as do GT e GTR estão associadas a outros artrópodes, como piolhos, pulgas e ácaros. O GT é composto por *Rickettsia typhi* e *Rickettsia prowazekii*, enquanto o GTR é composto por *Rickettsia akari*, *Rickettsia australis* e *Rickettsia felis*. Entre as rickettsias transmitidas por carrapatos, estão incluídas no GA *Rickettsia bellii* e *Rickettsia canadensis*.

A doença causada pela *R. rickettsii* foi pela primeira vez relatada nos Estados Unidos, onde foi denominada de Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (FMMR), na qual o pesquisador Howard Taylor Ricketts isolou a bactéria em 1909.(37)

A Febre Maculosa ocorre em diversas regiões do mundo, ora se manifestando de forma mais leve ora levando a óbitos o que vem fazendo crescer a importância das doenças causadas por riquetsias em saúde pública, pois estão associadas a vetores artrópodes (carrapatos, pulgas, piolhos e ácaros) com ampla distribuição mundial, mantidos na natureza por hospedeiros que atuam como multiplicadores de riquetsias.(38) Alguns desses microrganismos apresentam ciclos complexos envolvendo a interação de múltiplas espécies de carrapatos e mamíferos silvestres e domésticos.(39)

No Brasil, a maioria dos casos de Febre Maculosa se concentra na Região Sudeste, com casos esparsos em outros estados brasileiros, em especial no Sul do Brasil. Essa maior incidência da doença nessas regiões do país provavelmente é devido a presença do principal vetor e reservatório *Amblyomma sculptum* bem como do *Amblyomma aureolatum*, que infesta canídeos silvestres. Espécies estas que tem a capacidade de perpetuar a presença do patógeno para os novos estágios e as novas gerações.(37)

Porém apenas esse mecanismo não é suficiente para manter a bactéria ativa ao longo do tempo, tendo em vista o efeito deletério que a mesma causa nos carrapatos. As bactérias do gênero *Rickettsia* desenvolveram muitas estratégias para se adaptar a diferentes condições ambientais, incluindo aqueles dentro de seus vetores artrópodes e hospedeiros vertebrados. Os três estágios evolutivos do A.

sculptum, larva, ninfa e adultos, podem transmitir a bactéria para um hospedeiro suscetível.(37,40,41)

Em hospedeiros vertebrados, *R. rickettsii* causa infecção aguda com duração que pode variar de poucos dias a semanas, sem manutenção persistente do agente. Para a circulação do agente é fundamental que hajam reservatórios (carrapatos infectados) e a manutenção do agente na natureza. A capivara é um potencial hospedeiro amplificador da *R. rickettsii* pois já foi demonstrada através de infecção experimental, a sua capacidade de mantê-la circulante em seu organismo, sem apresentar sinais clínicos da doença.(41)

Rickettsia rickettsii é a espécie reponsável pela riquetsiose mais importante nas Américas.(38) Na Carolina do Norte, USA, Apperson (42), pesquisaram anticorpos anti-*R. amblyommatis* em humanos com Febre Maculosa aparente e propôs que alguns casos de riquetsiose em humanos relatados como Febre Maculosa podem ter sido causados por "*R. amblyommatis*" transmitido pela picada de *Amblyomma americanum*.

Diferentes espécies de rickettsias já foram registradas em equinos. Amorim Filho (43) testou 258 animais no estado do Maranhão para *R. rickettsii*, *R. amblyommatis* e *R. bellii* e encontraram 58,91% de cavalos sororreativos para pelo menos uma das espécies acima. Em outro experimento, Lopes (44) testou 129 equinos e 110 asininos para *R. rickettsii*, *R. amblyommatis*, *R. rhipicephali*, *R. bellii* e *R. parkeri* no estado do Piauí e encontrou 52,3% dos animais sororreativos para ao menos uma espécie.

O diagnóstico considerado padrão ouro para Febre Maculosa, recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), é a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), que utiliza antígenos espécie-específicos para o gênero *Rickettsia*. Porém a RIFI não consegue diferenciar as espécies devido à existência de reações heterólogas entre as diferentes espécies de bactérias do Grupo da Febre Maculosa (GFM).(40)

1.3 Leishmaniose

As leishmanioses são causadas por protozoários sarcomastigófora da família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania*, com diferentes espécies de acordo com as

várias formas de apresentação da doença, podendo ser hospedada por uma grande variedade de reservatórios podendo ser transmitida ao homem pela picada da fêmea do flebotomíneo infectada. Existem três formas principais de leishmaniose: visceral (LV) ou calazar, cutânea e mucocutânea (as duas últimas classificadas como leishmaniose tegumentar - LT).(45,46)

No continente americano, o Brasil merece destaque, pois compõe o grupo dos 10 países responsáveis por cerca de 70% dos casos de LTA no mundo (47) A Leishmaniose Visceral (LV) é endêmica em 76 países e, no continente americano, está descrita em pelo menos 12. Dos casos registrados na América Latina, 90% ocorrem no Brasil. Em 1913 é descrito foi primeiro caso em necropsia de paciente oriundo de Boa Esperança, Mato Grosso. Em 1934, 41 casos foram identificados em lâminas de viscerotomias praticadas post-mortem, em indivíduos oriundos das Regiões Norte e Nordeste, com suspeita de Febre Amarela .(48)

A doença, desde então, vem sendo descrita em vários municípios brasileiros, apresentando mudanças importantes no padrão de transmissão, inicialmente predominando em ambientes silvestres e rurais e mais recentemente em centros urbanos. Em média, cerca de 3.500 casos são registrados anualmente e o coeficiente de incidência é de 2,0 casos/100.000 habitantes.(49)

No Brasil são conhecidas sete espécies do gênero *Leishmania*, subgêneros *Viannia* e *Leishmania*. No Mato Grosso e na bacia amazônica do Brasil tem predominado a subespécie *L. amazonensis*. O complexo *braziliensis* com as subespécies *L. braziliensis* e *L. guyanensis* se distribuem em zonas de matas e no norte do estado do Amazonas, respectivamente.(46)

Existem poucos estudos sobre leishmaniose na região do Pantanal realizados na região do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Levantamentos entomológicos feitos por Barrios e colaboradores (50), entre 2015 e 2017, descreveram 14 espécies de flebotomíneos em oito gêneros coletadas durante um período de 24 meses: *Brumptomyia brumpti*, *Evandromyia aldafalcaoae*, *Ev. corumbaensis*, *Ev. lenti*, *Ev. sallesi*, *Ev. walkeri*, *Lutzomyia cruzi*, *Lutzomyia forattinii*, *Martinsmyia oliveirai*, *Micropygomyia peresi*, *Nyssomyia whitmani*, *Psathyromyia bigeniculata*, *Pa. hermanlenti* e *Sciopemyia sordellii*, sendo as espécies *Lu. cruzi* e *Micropygomyia peresi* as mais encontradas na área rural.(50)

Já no Mato Grosso, em pelo menos uma vez, todos os municípios do Pantanal Norte, com pesquisas cobrindo áreas urbanas e rurais, demonstraram que ao menos cinco espécies de flebotomíneos estão envolvidas na transmissão de leishmaniose; *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia cruzi*, *Nyssomyia whitmani*, *Bichromomyia flaviscutellata* e *Migonemyia Migonei*.(51)

Apesar da grande incidência de LV nos últimos anos no estado do MT, na região do Pantanal deste estado, a ocorrência de casos humanos de LV é rara. Em 10 anos, apenas dez casos foram confirmados. Paradoxalmente outra situação pode ser observada na região do Pantanal do Mato Grosso do Sul; em cidades como Corumbá e Aquidauana que se destacam como sendo municípios de transmissão intensa.(49,51)

A Leishmaniose Visceral é uma zoonose de evolução crônica, com acometimento sistêmico e, se não tratada, pode levar a óbito até 90% dos casos.(49) O agente etiológico tem como preferência, parasitar as células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro, e apresenta duas formas principais: uma promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, e outra amastigota, encontrada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados.

No Brasil, os estudos referentes à LV equina foram realizados por levantamentos sorológicos e moleculares. Ferreira (52), no Estado do Maranhão, detectaram 25,4% (35/138) de cavalos reativos pela técnica de ELISA. Já Feitosa(53) apontou 14,59% utilizando-se da mesma técnica no município de Araçatuba, SP.

A Leishmaniose ocorre geralmente na forma de surtos epidêmicos no Brasil, principalmente em áreas de desmatamento onde há ocupação recente, urbanização desordenada, desmatamento e especulação imobiliária levando a invasão do habitat de animais silvestres que serão importantes reservatórios de *Leishmania*. As queimadas juntamente com a destruição de vegetação nativa e alterações climáticas contribuem também para a destruição dos habitats naturais dos flebotomíneos, obrigando esses insetos a buscar alimento e abrigo nas habitações humanas, bem como nos locais onde vivem animais domésticos (50, 54)

1.4 Toxoplasmose

Toxoplasma gondii é um protozoário parasita intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa, família Sarcocystidae, gênero *Toxoplasma* e representa a única espécie desse gênero. (55) Este protozoário mostra uma carência total de especificidade da espécie pelo hospedeiro intermediário, seus oocistos não esporulados são excretados nas fezes de gatos e de outros felídeos e são capazes de infectar todo animal de sangue. (56)

O *T. gondii* parasita normalmente seu hospedeiro de forma assintomática, porém em alguns casos é capaz de causar uma doença grave, principalmente na sua forma congênita. Entre os animais destinados à alimentação humana, os suínos, ovinos e caprinos são mais infectados que equinos e bovinos, sendo que esta última espécie, pode reduzir ou eliminar os cistos de *T. gondii* viáveis de seus tecidos. (57)

O consumo de carnes ou derivados crus tem sido a principal via de transmissão para os humanos, sendo que as de ovinos, caprinos, suínos e equinos têm maior importância, por normalmente apresentarem maior frequência de cistos teciduais, enquanto as de bovinos e aves comerciais possuem menor relevância (58)

Embora o consumo de carne equina no país seja inexpressivo, o Brasil exporta esse produto, principalmente para países da União Europeia e Ásia onde o uso da carne de cavalo para consumo humano é uma prática comum, aumentando a preocupação sobre o consumo de carne crua ou malpassada de cavalos infectados, que pode ser uma das principais vias de transmissão do *Toxoplasma gondii*. (59)

Na ausência de gatos domésticos, a alta prevalência da doença pode ser atribuída aos felinos selvagens como a jaguatirica, onça e o jaguarundi. (54) Em um estudo com onças no Pantanal Matogrossense, Onuma (60) encontraram 90% dos animais soropositivos para *T. gondii*.

Pesquisas de anticorpos anti *T. gondii* em soros de equinos no Brasil indicam soroprevalência de 10,8% a 47,2% nos estados Alagoas, Bahia, Minas Gerais, Pará, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul em animais de abatedouros, fazendas e utilizados para esporte ou tração. (62)

Guerra (62), encontrou 12,5% de equídeos soro reagentes em Pernambuco, dados muito semelhantes com os encontrados por Evers (59) em diversos estados do Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, onde encontrou 11,6% dos animais

positivos em cavalos de abatedouros e por Rocha (62) que apontou 13,3% de soro reagentes na Ilha do Marajó, Pará.

1.5 Neosporose

Neospora caninum é um parasito intracelular obrigatório, formador de cistos pertencente ao filo Apicomplexa, causador da doença conhecida como neosporose. Este coccídio acomete vários animais domésticos e silvestres, tendo maior importância nas espécies canina e bovina.(64)

Em 1984, na Noruega, cães foram diagnosticados com uma doença neurológica com quadro semelhante à toxoplasmose e taquizoítos estavam presentes no cérebro e músculos, anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* não foram detectados no soro destes cães, os quais tampouco responderam ao bioensaio em camundongos. (65) O primeiro isolado desse coccídio foi obtido nos Estados Unidos, em cães, o que levou o agente a ser nomeado *Neospora caninum*. (66) Os canídeos do gênero *Canis* são os hospedeiros definitivos do *N. caninum*, nos quais ocorre a fase sexuada da reprodução, resultando na eliminação dos oocistos pelas fezes. Estes se infectam ingerindo tecidos de bovinos e de outras espécies que contenham cistos teciduais. Os oocistos eliminados com as fezes contaminam água e alimentos consumidos pelos hospedeiros intermediários, dentre os quais estão os equinos. (67,68)

Neospora caninum é considerado como um dos principais causadores de aborto em bovinos em várias regiões do mundo, sendo que o impacto econômico da infecção por esse parasito está relacionado diretamente com o valor dos fetos abortados, quanto com os custos indiretos como auxílio profissional, redução da vida produtiva da vaca, alteração no tempo de lactação e possíveis quedas na produção de leite.(69)

Nos animais domésticos há registros de *N. caninum* em tecidos de cães, que podem fazer o papel de hospedeiros definitivos e intermediários (66), bovinos (70,71), ovelhas (72,73), cabras (74), equinos (75), suínos (76) e búfalos (77). Em tecidos de galinhas *N. caninum* já foi detectado por métodos moleculares. (78)

Anticorpos anti-*N. caninum* já foram encontrados em animais silvestres como alpacas, lhamas, camelos (79,80), gambás (81), capivaras (82), raposas

(83), cervídeos (84, 85) e coiotes (86), dentre outros.

O primeiro estudo para detectar a presença de anticorpos anti-*N. caninum* em equinos foi realizado por Dubey (75), quando os autores examinaram 296 amostras de soro de equinos destinados ao abate utilizando o *Neospora* Agglutination Test (NAT). No Brasil, foram encontrados anticorpos anti-*Neospora* spp em equinos dos estados de Minas Gerais, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul e Goiás pelo ELISA (87), e em São Paulo (88) e Paraná (89), pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).

Em equinos a neosporose pode causar aborto, doenças neonatais, viscerais e neurológicas, um exemplo foi o diagnóstico da doença em cavalos adultos com sinais clínicos semelhantes aos da mieloencefalite protozoária equina (EPM), causada pelo protozoário *Sarcocystis neurona*. (90) O primeiro caso de neosporose em feto equino abortado foi relatado em 1986 por Dubey e Portfield.(91)

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Diagnosticar e rastrear as principais doenças causadas por hemoparasitas e parasitas teciduais de importância veterinária e saúde pública em equinos do Pantanal brasileiro.

2.2 Objetivos Específicos

- Detectar o DNA *T. equi* e *B. caballi* por exames moleculares.
- Detectar o DNA de *Leishmania infantum* por exames moleculares.
- Avaliar a exposição a *Toxoplasma sp*, *Neospora sp* e *Rickettsia spp* por exames sorológicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de estudo e obtenção das amostras

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UNISA, sob número 63/2021.

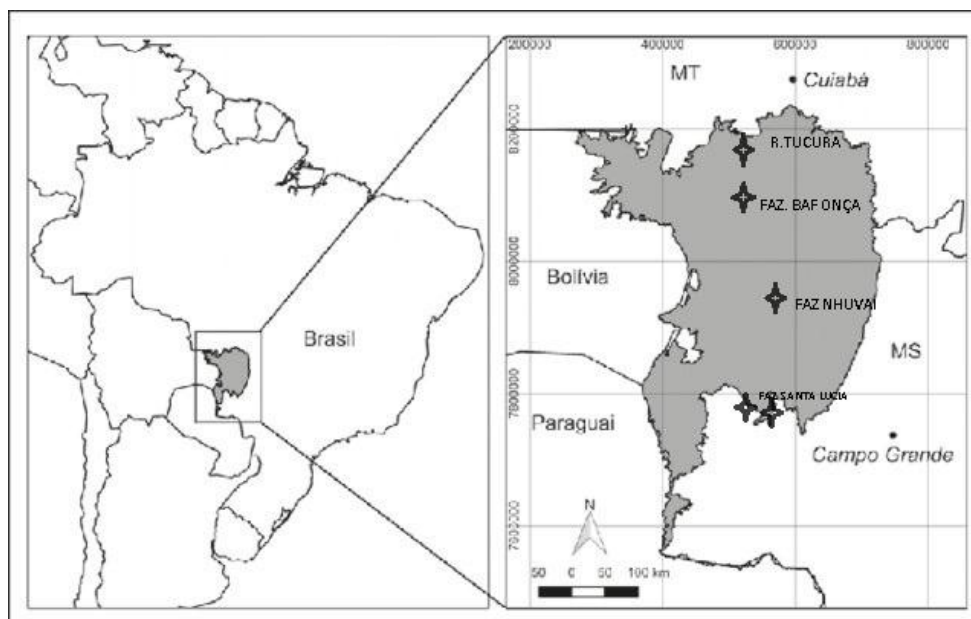
As amostras foram obtidas de equinos dos municípios de Miranda e Corumbá no estado do Mato Grosso do Sul e no município de Poconé no estado do Mato Grosso, nas microrregiões e Miranda, Nhecolândia e Poconé. Todos os municípios são pertencentes ao bioma Pantanal.

Foram amostrados animais utilizados para trabalho em propriedades particulares em cada um dos municípios (Tabela 1).

Tabela 1. Municípios que foram amostrados nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul e número de animais amostrados por município.

Município	Estado	Número de Propriedades	Número de Animais
Corumbá	MS	1	19
Miranda	MS	2	26
Poconé	MT	2	121

Figura 1. Localização dos pontos de coleta



Foram obtidas amostras de sangue total através punção da veia jugular após antissepsia com álcool 70% com seringa de 3ml com agulha 40x12mm. Após a colheita, as amostras de sangue total foram preservadas em álcool absoluto (v/v) e as de soro congeladas, e posteriormente enviadas ao LabVet-URC da Universidade Santo Amaro.

3.2 Diagnóstico sorológico

3.2.1 Detecção sorológica de anticorpos anti *N. caninum*

Os soros dos equídeos foram analisados utilizando a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), para anticorpos anti-*N. caninum* com ponto de corte de 50 conforme descrito por Dubey (63). Os soros foram diluídos a 1:50 em tampão fosfato ph 7,2 (0,0084M Na_2HPO_4 , 0,0018M NaH_2PO_4 e 0,147M NaCl) acrescentado de soro albumina bovina 1%, sendo ems eguida distribuídos 20 μL por orifício em lâminas contendo o antígeno específico fixado.

Após 30 minutos de incubação em estufa a 37°C, as lâminas foram lavadas com solução tampão carbonatada pH 9,0 (0,108M Na_2CO_3 , 0,4M NaHCO_3 e 0,145M NaCl) por três vezes e, em seguida, incubadas com conjugado IgG de

coelho anti-IgG equino (KPL – EUA) marcado com isotiocianato de fluoresceína. As lâminas foram novamente incubadas por 30 minutos a 37°C e lavadas como descrito anteriormente. Após a secagem à temperatura ambiente, foi realizada a montagem com lamínula utilizando glicerina tamponada pH 8,0.

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio epifluorescente (OLYMPUS BX-FLA, Japão) e foram considerados positivos os soros capazes de determinar fluorescência em todo contorno do antígeno. As amostras positivas foram diluídas na razão dois, para obtenção do título final. Em cada série foram incluídos soros testemunhas de títulos positivo e negativo previamente conhecidos. Os soros também foram diluídos a 1:25, mas a fluorescência ocorreu apenas em região apical, sendo considerados como inespecíficos.

3.2.2 Detecção sorológica de anticorpos anti -*T.gondii*

Os soros dos equídeos foram analisados para *T. gondii* pela RIFI conforme descrito por Camargo (98). Os soros dos animais foram diluídos a 1:64 (92) em tampão fostato pH 7,2 acrescentado de soro albumina bovina 1%, sendo em seguida distribuídos 20 µL por orifício em lâminas contendo o antígeno específico fixado.

Após 30 minutos de incubação em estufa a 37°C, as lâminas foram lavadas por três vezes e, em seguida, incubadas com conjugado IgG de coelho anti-IgG equino (KPL- EUA) marcado com isotiocianato de fluoresceína. As lâminas foram novamente incubadas por 30 minutos a 37°C e lavadas como descrito anteriormente. Após a secagem à temperatura ambiente, foi realizada a montagem com lamínula utilizando glicerina tamponada pH 8,0. A leitura foi realizada em microscópio epifluorescente (OLYMPUS BX-FLA, Japão).

Foram considerados positivos os soros capazes de determinar fluorescência em todo contorno do antígeno. As amostras positivas foram diluídas na razão dois, para obtenção do título final. Em cada série foram incluídos soros testemunhas de títulos positivo e negativo previamente conhecidos.

3.2.3 Exame sorológico para pesquisa de anticorpos IgG anti-*Rickettsia*

Os soros dos animais domésticos foram testados pela RIFI frente aos antígenos de *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyommii*, *R. rhipicephali* e *R. bellii*. A RIFI foi realizada segundo Horta (93). Em cada lâmina, soros conhecidamente negativos e positivos foram utilizados como controles. Os soros reativos na diluição 1:64 para qualquer espécie de *rickettsia* foram testados em diluições seriadas (64, 128, 256, 512, 1024, 2048...) para determinação do título final de reatividade. Os soros que demonstraram, para uma determinada espécie de rickettsia, um título quatro vezes maior que para as demais, foi considerado homólogo para aquela primeira, conforme padrões previamente definidos (92).

3.3 Diagnóstico molecular

3.3.1 Extração de DNA

As amostras de sangue total foram submetidas à extração de DNA, utilizando o Kit PureLink Genomic DNA (Thermo Fisher) conforme as especificações do fabricante.

3.3.2 Diagnóstico molecular de *Leishmania*.

Os oligonucleotídeos e condições das reações que foram utilizadas para a amplificação da SSU rDNA, Citocromo b, gGAPDH e Catepsina L-like estão descritos em trabalhos anteriores. (94,95,96)

3.3.3 Diagnóstico molecular de *Babesia/Theileria*

Para detecção foram utilizados os primers BAB-33-e BAB-432-409 correspondentes às regiões conservadas do gene 18S rRNA de *Babesia* spp., que amplifica um fragmento de cerca de 370-pb, conforme previamente estabelecido.(97)

3.3.4 Leitura e análise dos produtos de PCR

Todos os produtos de PCR foram corados com brometo de etídio e visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

3.3.5 Purificação, clonagem e sequenciamento.

Fragmentos de DNA amplificados por PCR (produtos amplificados em três reações independentes) foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% e corados com Gel-Red (Biotium). Os fragmentos foram cortados dos géis e os DNAs purificados pelo kit Exosap-IT(Thermo Fisher). Fragmentos purificados de DNAs foram submetidos a reações de sequenciamento utilizando o kit Big Dye Terminator (Perkin Elmer), de acordo com especificações do fabricante, em sequenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer). As reações foram submetidas a 30 ciclos: 15 s 96 °C; 15 s 50 °C; 4 min 60 °C, com um ciclo inicial de 1 min 96 °C.

4. RESULTADOS

4.1 Pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum*

Anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* foi detectado em apenas uma amostra (0,6%) no Rancho Tucura do município de Poconé no estado do Mato Grosso com título de 1:512.

Todas as amostras foram negativas na pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum*.

4.2 Pesquisa de anticorpos anti-*Rickettsia* sp

Foram detectados anticorpos anti-*Rickettsia* sp. em 36,7% (61/166) dos equinos amostrados, sendo 2,2% (1/45) para os animais amostrados no estado do Mato Grosso do Sul e 49,58% (60/121) das amostras provenientes do Mato Grosso. (Tabela 1).

Tabela 1. Ocorrência de *Rickettsia* sp. em equinos amostrados em diferentes propriedades no estado do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul.

Propriedade	Município	Estado	Positividade (%)
Fazenda Santa Lúcia 1	Miranda	MS	12,5% (1/8)
Fazenda Santa Lúcia 2	Miranda	MS	0% (0/18)
Fazenda Nhuvai	Corumbá	MS	0% (0/19)
Rancho Tucura	Poconé	MT	41,3% (24/58)
Fazendo Bafo da Onça	Poconé	MT	57,1% (36/63)
Total			36,7% (91/166)

Os títulos obtidos variaram de 1:64 a 1:16384. *Rickettsia amblyommatis* foi o antígeno homologado na totalidade, 32,78% (20/61), das amostras em que foi possível esta determinação (Tabela 2).

4.3 Diagnóstico molecular de *Babesia* sp./*Theileria* sp. e *Leishmania infantum*

Um total de 24,09% (40/166) das amostras foram positivas para *Babesia* sp./*Theileria* sp., sendo 26,4% (32/121) dos equinos amostrados no estado do Mato Grosso e 17,7% (8/45) dentre os provenientes do estado do Mato Grosso do Sul (Tabela 3).

Tabela 2. Ocorrência de parasitas dos gêneros *Babesia* e *Theileria* em equinos amostrados em diferentes propriedades no estado do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul.

Propriedade	Município	Estado	Positividade (%)
Fazenda Santa Lúcia 1	Miranda	MS	25% (2/8)
Fazenda Santa Lúcia 2	Miranda	MS	33,4% (6/18)
Fazenda Nhuvai	Corumbá	MS	0% (0/19)
Rancho Tucura	Poconé	MT	32,2% (19/59)
Fazendo Bafo da Onça	Poconé	MT	20,9% (13/62)
Total			24,09% (40/166)

A ocorrência de *L. infantum* foi de 25,9% (43/166) nos equinos amostrados, sendo 14% (17/121) dos equinos amostrados no estado do Mato Grosso e 57,7% (26/45) dos provenientes do estado do Mato Grosso do Sul sendo 100% dos animais do Município de Miranda (Tabela 4).

Tabela 3. Ocorrência de *Leishmania infantum* em equinos amostrados em diferentes propriedades no estado do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul.

Propriedade	Município	Estado	Positividade (%)
Fazenda Santa Lúcia 1	Miranda	MS	100% (8/8)
Fazenda Santa Lúcia 2	Miranda	MS	100% (18/18)
Fazenda Nhuvai	Corumbá	MS	0% (0/19)
Rancho Tucura	Poconé	MT	20,3% (12/59)
Fazendo Bafo da Onça	Poconé	MT	8% (5/62)
Total			25,9% (43/166)

Foram diagnosticadas infecções mistas entre todos os agentes pesquisados, sendo 7,3% (12/166) de *L. infantum* com *Babesia* sp./*Theileria* sp. em (Tabela 5); 6,7% (11/166) de *Rickettsia* sp. com *Babesia* sp./*Theileria* sp.; 2,4% (4/166) de *L.*

infantum, *Babesia* sp./*Theileria* sp. e *Rickettsia* sp. e 0,6% (1/166) de *L. infantum*, *T. gondii* e *Babesia* sp./*Theileria* sp..

Tabela 4. Ocorrência de infecções mistas de *Leishmania infantum* e parasitas dos gêneros *Babesia*/*Theileria* em equinos amostrados em diferentes propriedades no estado do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul.

Propriedade	Município	Estado	Positividade (%)
Fazenda Santa Lúcia 1	Miranda	MS	25% (2/8)
Fazenda Santa Lúcia 2	Miranda	MS	27,8% (5/18)
Rancho Tucura	Poconé	MT	6,8% (4/59)
Total			7,3% (12/166)

5. DISCUSSÃO

O Pantanal brasileiro é a maior área inundável do mundo, sendo este fenômeno de extrema importância para a produtividade da pecuária e pesca, para o controle natural de queimadas, a abundância e distribuição da fauna e flora da região. A sazonalidade das inundações está diretamente relacionada ao regime de precipitação pluviométrica, entretanto há áreas que permanecem secas ou inundadas durante todo o ano (99).

O cavalo pantaneiro tem sua origem dos cavalos Ibéricos trazidos ao Brasil na época da colonização. Apesar dos cavalos terem sido usados pelos índios Guaicurús e colonizadores da região, sua importância foi intensificada com os surgimentos das fazendas de criação de bovinos de corte no início do século XVIII que necessitavam de cavalos para o manejo do gado (8). Entretanto são escassos os estudos com estes equinos tão importantes neste bioma.

A ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* e anti-*N. caninum* em equinos é muito variável no Brasil (75,100,101,102,103). No presente estudo nos cavalos pantaneiros, somente um animal (0,6%) foi positivo para *T. gondii* e nenhum animal apresentou anticorpos frente a *N. caninum*. Em estudo conduzido com cavalos pantaneiros no município de Poconé (Mato Grosso) foram detectados 15% e 2,5% dos animais com anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii*, respectivamente (104).

Neste estudo, 36,7% (61/166) das amostras foram positivas na pesquisa de anticorpos anti-Rickettsia sp., sendo que o estado do Mato Grosso representa quase a totalidade das amostras positivas 98,36% (60/61).

Os cavalos e as capivaras têm grande importância na cadeia epidemiológica da doença, pois são os principais reservatórios dos carrapatos transmissores da febre maculosa. Os animais mantidos em pastos sujos, com vegetação alta, ou em matas ciliares, encontram um ambiente bastante propício para a infestação pelo *A. cajennense* (37).

Os principais carrapatos que parasitam equinos no Brasil são o *D. nitens* (carrapato da orelha do cavalo) e o *A. cajennense*, sendo este último o principal responsável pela manutenção da rickettsia na natureza (105).

No estado do Maranhão, Amorin Filho e colaboradores (106) testaram 258 animais e encontraram 58,91% de cavalos sororreativos para pelo menos uma espécie de *Rickettsia* sp. No Pantanal, pesquisa realizada em equinos e vetores, observou a ocorrência de cinco espécies do gênero *Rickettsia*, sendo *R. parkeri*, *R. rickettsii*, *R. amblyommatis*, *R. belli* e *R. rhipicephali* com 61,6% de equídeos reativos com os maiores títulos para *R. amblyommatis* sugerindo pela primeira vez a participação do *A. cajennense* com possível envolvimento na transmissão de rickettsioses. (41)

A. cajennense e *D. nitens* são as espécies comumente encontradas infestando equinos no Pantanal (107), além de *Rhipicephalus microplus* (21), corroborando a presença de *R. amblyommatis* como o antígeno homólogo.

A piroplasmose equina é relatada como uma doença parasitária comum em equinos e é uma das enfermidades que mais gera prejuízos no Brasil. Nogueira e colaboradores (108) observaram através de diagnóstico molecular prevalências de 13,40%, para *T. equi* e 3,09% para *B. caballi* no estado do Maranhão. No estado do Rio Grande do Sul, Rodrigues (109) encontrou 36,8% de animais positivos para *T. equi* pela mesma técnica.

Na região do Pantanal, no estado do Mato Grosso foi observado 14% de positividade (20) e na região do Pantanal do Mato Grosso do Sul a prevalência foi de 43,5% (110). No presente estudo, um total de 24,09% (40/166) das amostras foram positivas para *Babesia* sp./*Theileria* sp., sendo 26,4% (32/121) de equinos

amostrados no estado do Mato Grosso e 17,7% (8/45) provenientes do estado do Mato Grosso do Sul.

A Leishmaniose vem sendo descrita em vários municípios brasileiros, apresentando mudanças importantes no padrão de transmissão, inicialmente predominando em ambientes silvestres e rurais e mais recentemente em centros urbanos. (49). As modificações de origem humana e a antropização das áreas silvestres com o aumento do uso da terra vem ameaçando os ecossistemas naturais dos flebotomíneos e de alguns mamíferos, promovendo a adaptação desses insetos e hospedeiros silvestres aos ambientes urbanizados (111). A biodiversidade é importante para impedir expansão de doenças como as leishmanioses para o meio urbano uma vez os ambientes de mata nativa são detentores da maior riqueza e abundância de espécies de flebotomíneos mostrando-se importantes para sua manutenção (111).

Infecções por *Leishmania* em equinos, relacionadas à *L. (V.) braziliensis*, têm sido descritas em vários estados do Brasil e suspeita-se que os equinos possam ser reservatórios deste parasito (112).

No Brasil, os estudos referentes à LV equina foram realizados por levantamentos sorológicos e moleculares. Ferreira (52), no Estado do Maranhão, detectaram 25,4% (35/138) de cavalos soropositivos pela técnica de ELISA, no município de Araçatuba em São Paulo a soropositividade foi de 14,6% (51). Pela técnica de PCR foi determinada a ocorrência em 38% dos animais examinados no RS (113), já no município de Ilha Solteira em São Paulo, 100% dos equinos amostrados foram positivos para o gênero *Leishmania* pela técnica de PCR (112).

Existem poucos estudos sobre o gênero *Leishmania* e seus vetores na região do Pantanal, entretanto em estudos na região apontam *Lu. cruzi* e *Lu. longipalpis* como principais espécies transmissoras de LV. Tais espécies podem ser encontradas em alta densidade em ambientes rurais e urbanos, demonstrando alto grau de adaptação que os flebotomíneos vêm sofrendo em resposta às mudanças antrópicas, mormente *Lu. cruzi* (50,51)

A Leishmaniose ocorre geralmente na forma de surtos epidêmicos no Brasil, principalmente em áreas de desmatamento onde há ocupação recente, urbanização desordenada, desmatamento e especulação imobiliária, levando a invasão do habitat de animais silvestres que serão importantes reservatórios de *Leishmania*. As

queimadas juntamente com a destruição de vegetação nativa e alterações climáticas contribuem também para a destruição dos habitats naturais dos flebotomíneos, obrigando esses insetos a buscar alimento e abrigo nas habitações humanas, bem como nos locais onde vivem animais domésticos. (50,54)

Apesar de o cão ser o principal reservatório de *L. infantum* no ciclo zoonótico da LV diversos outros mamíferos como raposas, gambás, roedores e equídeos podem ser infectados, todavia o DNA de *L. infantum* encontrado no sangue de equídeos não os define como reservatórios de LV, mas sugerem que possam ser sentinelas ou hospedeiros acidentais, uma vez que há estudos concluíram que muares foram capazes de superar a infecção experimental por *Leishmania* e não infectaram seu vetor. (114, 115)

A ocorrência de *L. infantum* neste estudo foi de 25,9% (43/166) nos equinos amostrados, sendo 14,0% (17/121) de equinos amostrados no estado do Mato Grosso e 57,7% (26/45) provenientes do estado do Mato Grosso do Sul. A ocorrência em Miranda foi de 100% das amostras. Tais resultados coincidem com a atual situação epidemiológica da região em relação a casos em humanos notificados. Este é o primeiro estudo que demonstra a presença de *L. infantum* em equinos através de diagnóstico molecular específico baseado no gene de Catepsina L-like.

Nos anos de 2019 e 2020, com a região assolada por uma forte seca e enchentes que nunca chegaram, o Pantanal foi acometido por fortes incêndios de junho a setembro que deixaram vastas áreas do Pantanal enegrecidas. Os incêndios cobriram cidades próximas e distantes com uma nuvem de fumaça. A queima foi severa em 2019, carbonizando cerca de 16.000 quilômetros quadrados e em 2020 um terço de todo o bioma, 39.000 quilômetros quadrados, uma área do tamanho da Suíça (116). Coincidentemente segundo Kumar (117) as mesmas áreas descritas por Cardoso e Marcuzzo (2010) por estarem apresentando anomalias nos índices pluviométricos, foram as mais afetadas pelas queimadas. As áreas de queimada podem estar relacionadas a um grande decréscimo na população de flebotomíneos (118).

Uma das propriedades amostradas no Mato Grosso do Sul pertence ao Município de Corumbá que possui um dos maiores índices de notificação de Leishmaniose visceral em humanos e considerado como alto risco de infecção (49).

Entretanto, a propriedade está localizada a mais de 160km a nordeste da cidade e todos os equinos amostrados foram negativos.

Os resultados obtidos evidenciam a importância dos equinos no ciclo epidemiológico das doenças transmitidas por vetores e a necessidade constante de vigilância epidemiológica nos hospedeiros e vetores na região do Pantanal brasileiro.

6. CONCLUSÃO

O Bioma Pantanal é uma área com baixa distribuição de *T. gondii* e *Neospora* spp. entretanto demonstra ser enzoótica para *B. caballi* e *T. equi* apresentando positividade em quase todos os locais amostrados, sugerindo a presença de animais cronicamente infectados que contribuem para a manutenção destes hemoparasitas na região.

A ocorrência de anticorpos Anti-*Rickettsia* nos animais amostrados foi bastante superior no Município de Poconé evidenciando equinos como possíveis reservatórios da doença.

A ocorrência de *L. infantum* foi bastante superior no Pantanal do estado do Mato Grosso do Sul, com 100% de positividade em Miranda, região próxima a dois municípios considerados de alto risco de infecção pelo Ministério da Saúde, revelando o equino como possível sentinela para Leishmaniose.

7. REFERÊNCIAS

- 1-IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA.[internet] 2019 [acesso em 2021 ago 14] Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br>.
- 2- Lima RAS, Cintra AG. Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo [internet]. MAPA. 2016. [Acesso em 2021 ago 6] Disponível em <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/>
- 3-BRASIL. Ministério do Interior. Departamento Nacional de Obras e Saneamento - DNOS. Estudos hidrológicos da Bacia do Alto Paraguai. Fluviometria. Rio de Janeiro. 1974; 4:664.
- 4- MT, Serviço de Informação ao Cidadão.[internet] Pantanal: gestão e proteção ambiental. Cuiabá, 2022 [acesso em 2023 jan 08] disponível em www.mt.gov.br.
- 5-Cardoso MRD, Marcuzzo FFN. Mapeamento de Três Décênios da Precipitação Pluviométrica Total e Sazonal no Bioma Pantanal. In: III Simpósio de Geotecnologias no Pantanal. Anais III Simpósio de Geotecnologias no Pantanal. Corumbá. EMBRAPA, 2010;1:84-94.
- 6-Alfonsi RR, Camargo MBP. Condições climáticas para a região do Pantanal Mato-grossense. In: SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAIS E SÓCIOECONÔMICO DO PANTANAL, Corumbá, MS. Brasília: EMBRAPA/CPAP, 1986.
- 7-Zavatini J.A.A dinâmica atmosférica e a distribuição das chuvas no Mato Grosso do Sul. [Tese] . Universidade de São Paulo. São Paulo. 1990.
- 8-Santos AS, Santos SM, Comastri Filho, JA. Cavalo Pantaneiro: rústico por natureza. Brasília, DF: Embrapa SPI. 2016. p. 147-179
- 9-Almeida FQ, Silva VP. Progresso científico em equideocultura na 1ª década do século XXI. Ver. Bras de Zootec 2010; 39; 119-129.
- 10-Cunha CW, Silva S, Silva B, Osório L, Dutra C. Alterações hematológicas e sorológicas em equinos experimentalmente infectados com *Babesia equi*. Revista Ciência Rural. Santa Maria. 1998; 28(2): 283-286.
- 11-Rodríguez-Vivas LA, Cob-Galera JL. Domínguez-Alpizar. Hemoparásitos en bovinos, caninos y equinos diagnosticados en el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de La Universidad Autónoma de Yucatan (1984-1999). Ver. Biomed. 2000; 11(4):277-282.
- 12-Mehlhorn H, Schein E. Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein 1998. Veterinary Parasitology. 1998; 84: 467–475.
- 13- Uilemberg G. Babesia – A historical overview. Vet.par. 2006;138: 3-10.

- 14-Wise LN, Kappmeyer LS, Mealey RH, Knowles DP. Review of equine piroplasmosis. *J Vet Intern Med.* 2013;27(6): 1334-46
- 15- Zanet S et al. Horses infected by Piroplasms different from *Babesia caballi* and *Theileria equi*: species identification and risk factors analysis in Italy. *Veterinary parasitology.* 2017;236:38-41.
- 16- Onyiche TE et al. A Review on Equine Piroplasmosis: Epidemiology, Vector Ecology, Risk Factors, Host Immunity, Diagnosis and Control. *Int J Environ Res Public Health.* 2019; 16(10): 1736
- 17- Schein FB. infecção e diversidade genética de *Babesia caballi* e *Theileria equi* em equinos do estado do Mato Grosso. [Tese]. Cuiabá: Universidade Federal do Mato Grosso, 2018
- 18-OIE (Organização Mundial de Saúde Animal), OIE Terrestrial Manual 2019 Equine Piroplasmosis, [internet] 2021 [acesso em 2022 nov 15] Disponível em: https://www.woah.org/es/documento/equine_piroplasmosis-3/
- 19- Wise LN et al. Review of equine piroplasmosis. *J. vet. Int. medicine.*2013;27(6): 1334-1346.
- 20-Barros EM et al. Detecção de *Theileria equi* e *Babesia caballi* e anticorpos anti-*Ehrlichia* spp. em equídeos do Pantanal Mato-Grossense, Brasil. *Arq. Bras. de Med. Vet. e Zootec.* 2015; 67(3):716-722.
- 21- Campos JBV et al. Assessment of equine piroplasmids in the Nhecolândia sub-region of Brazilian Pantanal wetland using serological, parasitological, molecular, and hematological approaches. *Ticks and Tick-Borne Diseases.* 2019;10(3):714-721.
- 22-Scoles GA, Ueti MW. Vector Ecology of Equine Piroplasmosis. *Annual Rev. of Entomology.* 2015;60:561-580.
- 23- Pal A, Chakravarty A K, Major diseases of livestock and poultry and problems encountered in controlling them. In: *Genetics and breeding for disease resistance of livestock* , 2020, 11-83.
- 24- Nicholson, WL, Sonenshine DE, Nodem BH, Brown RN. Ticks (*Ixodida*) in: *Med. and Vet Entomology* third edition. 2019, p 603-672.
- 25- Santos AC, Cunha RC, Weege GB, Vianna AM. *Theileria equi* e Piroplasmose Equina. Pelotas: Editora Santa Cruz; 2020.
- 26- Wise LN, Pelzel-Mccluskey AM, Mealey RH, Knowles DP. Equine Piroplasmosis. *Veterinary Clinics: Equine Practice.* 2014;30:677–693
- 27- Takahira RK Babesiose Canina e Outras Babesias de Animais Domésticos.In: Megid J, Ribeiro MG, Paes AC. *Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia.* Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 973-984.

- 28- Kerber CE et al. Prevalência da Piroplasmose equina e sua associação com infestação por carrapatos no Estado de São Paulo. *Rev. Bras. de Parasit. Vet.* 2009;18(4):1-8.
- 29- Peckle M et al. Molecular epidemiology of *Theileria equi* in horses and their association with possible tick vectors in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitology research.* 2013;112: 2017-2025.
- 30- Santos U, Ligia V. "Babesia." *Rev. med. Interna.* 2002: 39-44.
- 31- Ibrahim AK. Comparative Molecular and Conventional Detection Methods of *Babesia equi* in Egyptian Equine. *Global Veterinaria.* 2011; 7: 201-210.
- 32- Dumler JS et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and "HGE agent" as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. of Systematic and Ev. Microb.* 2001; 51:2145–2165.
- 33- Walker DH, Ismail N. Emerging and re-emerging Rickettsioses: Endothelial cell infection and early disease events. *Nat. Rev. Microbiol.* 2008;6:375-386.
- 34- Parola P, Christopher D, Paddock, and Didier Raoult. "Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts." *Clin. Microb. Rev.* 2005;18(4): 719-756.
- 35- Parola P, et al. "Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach." *Clinical microbiology reviews* 2013; 26(4): 657-702.
- 36- Karkouri K, Ghigo E, Raouly D, Fournier PE. Genomic evolution and adaptation of arthropod-associated *Rickettsia*. *Scientific Reports.* 2022;12(1):1-15
- 37- Del Fiol FS et al. A febre maculosa no Brasil. *Rev. Panam. de Sal. Pub.* 2010; 27(6):461-466.
- 38- Martins MEP, Martins KCS. Riquetsioses (*Rickettsia* spp.) transmitidas por carrapatos. *Enciclopédia Biosfera.* 2014;10(18):2735–56, 2014.
- 39- Pérez AM et al. Molecular detection of *Rickettsia amblyommatis* and *Rickettsia parkeri* in ticks collected from wild pigs in Campeche, Mexico, Ticks and Tick borne diseases. 2022;13(1) 101844.
- 40- Martins MEP, Brito WMED, Labruna MB, Filho JB. "Identificação e pesquisa de *Rickettsia* spp. em carrapatos colhidos em cães e equinos em Quirinópolis, Goiás, Brasil." *Multi-Science Journal* 1.1 (2015): 120-127.
- 41- Alves AS, Soroprevalência de *Rickettsia* spp. em equídeos e pesquisa de *Rickettsia* spp. em carrapatos *Amblyomma cajennense* e *Dermacentor nitens* da

região do Pantanal mato-grossense. [Dissertação]. Cuiabá: Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Agronomia; 2014.

42- Apperson CS et al. Tick-borne diseases in North Carolina: is *Rickettsia amblyommi* a possible cause of rickettsiosis reported as Rocky Mountain spotted fever? Vector-Borne and Zoonotic Diseases. 2008; 8(5): 597-606.

43- Amorim EF et al. Exposure of Baixadeiro horses to *Rickettsia* spp. and to ticks infected by *Rickettsia amblyommatis* in the Baixada Maranhense micro-region, Maranhão, Brazil. Ciência Rural. 2018; 48:9

44- Lopes MG. Infecção por *Rickettsia* spp. em equídeos e carrapatos do Centro-Norte do Piauí. [Dissertação] - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2012.

45- OMS- World Health Organization – WHO. General Information: Leishmaniasis Geneva: WHO.[internet];2019 [acesso em 22 de agosto de 2021] disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.

46- LANGONI. Leishmanioses. In: Megid J, Ribeiro M. G.; Paes A. C. Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 1013-103.

47- Grangeiro Junior et al. American cutaneous leishmaniasis in a northeast Brazilian city: clinical and epidemiological features. Rev. Soc. Bras. Med. Tropical. 2018;51(6):837-842.

48- MS, Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso. Boletim epidemiológico Leishmaniose Visceral Humana. [internet] Brasília 2021 [acesso em 2023 jan 05]. Disponível em: https://www.vs.saude.ms.gov.br/wp-content/uploads/2022/07/Boletim-epidemiologico_Leishmaniose-Visceral_2021.pdf.

49- BRASIL. Ministério da Saúde.[internet] Brasília; 2022 Leishmaniose Visceral.[acesso em 2023 jan 10] Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral>.

50- Barrios SPG et al. Synanthropy and diversity of Phlebotominae in an area of intense transmission of visceral leishmaniasis in the South Pantanal floodplain, Midwest Brazil. 2019 14 (5): 0215741

51- Brito VN, Lima AF, Dias R, Sousa VRF. Aspectos epidemiológicos das Leishmanioses na região do Pantanal de Mato Grosso. Rev. Bras. de Parasit. Vet. 2019; 28 (4): 744-749.

52- Ferreira FP et al. Prevalência de anticorpos ANTI-*Trypanosoma* spp. e ANTI-*Leishmania* spp. em cavalos baixadeiros. Rev de Ciência Vet. e Saúde Pub.. 2016; 3(3):77-79.

- 53- Feitosa FL et al. Estudo soropidemiológico de leishmaniose em equinos na região de Araçatuba-SP, Brasil, área endêmica para leishmaniose visceral. Braz. Jour. of Vet. Res. and Animal Science, v.49, n.6, p.500-502, 2012.
- 54- Lacerda AFA et al. Clinical, epidemiological and transmission cycle aspects of leishmaniasis urbanization in Barreiras, Bahia, Brazil. Spatiotemporal Epidemiology. 2021;36:1395.
- 55- Silva RC, Silva AV. Toxoplasmose em Animais Domésticos. In: Megid J, Ribeiro MG, Paes AC. Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia. Rio de Janeiro: Roca; 2016. p.1040-1053.
- 56- Taylor MA, COOP RL, Wall RL Parasitologia Veterinária. 4. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2017. p.604.
- 57- Garcia JL, Navarro IT, Ogawa L, Oliveira RCD. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii*, em suínos, bovinos, ovinos e equinos, e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do norte do Paraná-Brasil. Ciência Rural. 1999;29:91-97.
- 58- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. International Journal for Parasitology. v. 30, p. 1217-1258, 2000.
- 59- Evers F et al. Diagnosis and isolation of *Toxoplasma gondii* in horses from Brazilian slaughterhouses. Rev. Bras. de Paras. Vet. 2013;22(1):58-63.
- 60- Onuma SMM et al. Exposição de onças-pintadas a *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* e *Sarcocystis neurona* no Pantanal brasileiro. Ver. Bras. de Parasit. 2014;23(4):547-553
- 61- Dubey JP, Murata FHA, Cerqueira-Cezar CQ, Kwok OCH *Toxoplasma gondii* infections in horses, donkeys, and other equids: The last decade. 2020; 132:492-499.
- 62- Guerra NR et al. Soroprevalência de *Toxoplasma gondii* em equídeos do Nordeste do Brasil Pesq. Vet. Bras. 2018;38:400-406.
- 63- Rocha KS et al. Soroprevalência para anticorpos anti-Toxoplasma gondii em uma propriedade na ilha do Marajó, Revista de Ciências Agrárias Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences.2021;64
- 64- Dubey J, Hattel AL, Lindsay DS, Topper MJ. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. Jour. of the Am. Vet. Med. Ass.1988;193(10):1259-1263, 1988.
- 65- Bjerkas I, Mohn SF, Presthus J. Undetected cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. Zeitschrift fuer Parasitenkunde, 1984;70(2): 271-274.

- 66- Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Tooper MJ, Uggla A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. Jour. of the Am. Vet. and Med. Assoc. 1988; 192(9):1269–1285.
- 67- Mcallister MM. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. Intern. Jour. of Parasit. 1998; 28(9):1473-1479.
- 68- Lindsay DS, Dubey JP, Duncan RB. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. Vet. Parasit. 1999;82(4):327-333
- 69-Thurmond MC, Hietala SK, Blanchard PC. Herd based diagnosis of *Neospora caninum*-induced endemic and epidemic abortion in cows and evidence for congenital and postnatal infection. Jour. of Vet. Diag. Inv. 1997;9(1):44-49.
- 70-Anderson ML et al. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. Jour. Am. Vet. Med. Ass. 1991; 198(2): 241-244.
- 71-Dijkstra TH et al. A high rate of seroconversion for *Neospora caninum* in a dairy herd without an obvious increased incidence of abortions. Vet. Parasit. 2002;109(3-4):203-211.
- 72-Dubey JP et al. Fatal congenital *Neospora caninum* infection in a lamb. Jour. of Parasit. 1990; 76(1):127-30.
- 73- Pena HFJ et al. Isolation and molecular detection of *Neospora caninum* from naturally infected sheep from Brazil. Vet. Parasit. 2007;147(1-2): 61-66.
- 74-Barr BC et al. Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses: four cases (1990-1992). Jour. Amer. Vet. Med. Ass. 1993; 202(1): 113-117.
- 75-Dubey JP, Kerber CE, Granstron DE. Serologic Prevalence of *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora Caninum* in horses in Brazil. Jour. of the American Vet. Med Assoc. Schaumburg, 1999; 215(7):970-972
- 76- Azevedo SS et al. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in swine from Northeastern Brazil. Rev. Bras. Paras. Vet. 2010; 19(2):1-5.
- 77- Rodrigues AAR et al Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) From Brazil. Vet. Parasit. 2004;124(3-4):139-150.
- 78- Costa KS et al. Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. Int. Jour. for Parasit. 2008;38(2):157-159.
- 79- Hilali M et al. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in sera from camels from Egypt. Vet. Parasitology, 1998; 75(2-3)269-271, 1998.

- 80- Sadrebazzas A, Haddadzadeh H, Shayan P. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in camels (*Camelus dromedaries*) in Mashhad, Iran. *Parasit. Res.* 2008;98(6):600-601.
- 81- Yai LEO. et al. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in the South American opossum (*Didelphis marsupialis*) from the city of São Paulo, Brazil. *J. of Parasit.* 2003; 89(4):870-871.
- 82-Yai LEO. et al. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from São Paulo State, Brazil. *J. of Parasit.* 2008;94(3):766.
- 83- Buxton D et al. Examination of red fox (*Vulpes vulpes*) from Belgium for antibody to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Record.* 1997; 14(12): 308-309.
- 84- Dubey JP et al. Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. *American Jour. Vet. Res.* 1996;57(3):329-326.
- 85- Vianna MCB, Sreekumar C, Miska KB, Hill DE, Dubey JP. Isolation of *Neospora caninum* from naturally infected white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Vet. Parasit.* 2005;129(3-4):253-257
- 86- Stieve E et al. S. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibody prevalence in Alaska wildlife. *Jour. of Wildlife dis.* 2010;46(2):348-355.
- 87- Hoane JS et al. Prevalence of *Sarcocystis neurona* and *Neospora spp.* Infection in horses from Brazil based on presence of serum antibodies to parasite surface antigen. *Vet. Parasitology*, v. 136, n. 2, p. 155-159, 2006.
- 88- Villalobos EMC et al. Association between the presence of serum antibodies against *Neospora spp.* and fetal loss in equines. *Vet. Parasit.* 2006;142(3-4):372-375.
- 89- Locatelli-Dittrich R. Investigation of *Neospora sp.* and *Toxoplasma gondii* antibodies in mares and in precolostral foals from Parana State, Southern Brazil. *Vet. Parasit.* 2006;135(3-4): 215-221.
- 90- Marsh AE et al. In vitro cultivation and experimental inoculation of *Sarcocystis falcatula* and *Sarcocystis neurona* merozoites into budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *The Journal of parasitology.* 1997:1189-1192.
- 91- Dubey JP, Porterfield ML. *Toxoplasma*-like sporozoa in an aborted equine fetus. *J. of the American Vet. Med. Association.* 1986;188(11): 1312-1313.
- 92- Ishizuka MM, Miguel O, Brogliato DF. Avaliação da prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em equinos PSI clinicamente normais. *Rev. da Faculdade de Med. Vet. e Zootec. da USP.* 1975; 12(7):288-292.

- 93- Horta MC et al. 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 journal of tropical medicine and hygiene.2004;71(1):93-97.
- 94- Uliana SRB, et al. Leishmania: Genus identification based on a specific sequence of the 18S ribosomal. 1991
- 95- Maia da Silva F et al. Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. Molecular Ecology. 2007;16(16): 3361-3373.
- 96- Hamilton PB et al. Phylogenetic analysis reveals the presence of the *Trypanosoma cruzi* clade in African terrestrial mammals. Infection, Genetics and Evolution. 2009;9(1):81-86.
- 97- Spolidorio MG et al. *Hepatozoon canis* infecting dogs in the State of Espírito Santo, southeastern Brazil.2009;163(4):357-361.
- 98- Camargo ME. Improved technique of Indirect Immunofluorescent for serologic diagnosis of toxoplasmosis. Rev. do Inst. de Med. Trop., 1964; 6(3):117-118
- 99- Cardoso MRD, Marcuzzo FFN. Mapeamento de três decênios da precipitação pluviométrica total e sazonal do bioma Pantanal. Cáceres, MT, 2010.
- 100- Mendonça AO, et al. "Inquérito sorológico para toxoplasmose em equídeos procedentes de duas regiões do Estado da Bahia, Brasil." (2001).
- 101- Sangioni, LA, et al. "Pesquisa de anticorpos anti-Neospora spp. e anti-herpesvírus equino em cavalos de tração no município de Santa Maria, RS, Brasil." Ciência Rural.2011;41:321-323.
- 102- Villalobos EMC et al. Detection of Neospora spp. Antibodies in cart horses from urban areas of Curitiba, Southern Brazil. Rev. Bras.de Parasit. Vet.2012;21(1): 68-70.
- 103- Gennari SM et al. Occurrence of antibodies against Toxoplasma gondii and its isolation and genotyping in donkeys, mules, and horses in Brazil. Vet. Parasit.2015;209(1-2):129-132.
- 104- Laskoski LM et al. Occurrence of anti-Neospora caninum and anti-Toxoplasma gondii antibodies in horses in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil. Semina: Ciências Agrárias.2015;36(2):895-900.
- 105- SUCEN - Superintendência de Controle de Endemias do estado de São Paulo [internet] Manual de Vigilância Acarológica; 2004. [acesso em 2023 jan 10]. Disponível em: <https://www.saude.sp.gov.br/resources/sucen/homepage>.

- 106- Amorin Filho, EF et al. Exposição dos cavalos Baixadeiro a *Rickettsia* spp. e carrapatos infectados pela *Rickettsia amblyommatis* na Baixada Maranhense, microrregião do Estado do Maranhão, Brasil. *Ciência Rural*. 2018; 48
- 107- Cançado PHD et al. Current status of ticks and tick-host relationship in domestic and wild animals from Pantanal wetlands in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Iheringia. Série Zoologia*. 2017; 107.
- 108- Nogueira RDMS et al, Molecular and serological detection of *Theileria equi*, *Babesia caballi* and *Anaplasma phagocytophilum* in horses and ticks in Maranhão, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2017; 37: 1416-1422.
- 109- Rodrigues D. Detecção de *Theileria equi* por reação em cadeia da polimerase em amostras de sangue de equinos no Rio Grande do Sul. [Dissertação] Universidade Federal de Santa Maria. RS. 2018
- 110- Campos JBV. Fatores Determinantes para a ocorrência de piroplasmose equina no Pantanal Sul Matogrossense. [Dissertação] Campo Grande: Universidade Católica Dom Bosco; 2017.
- 111- Capucci DC. Investigação da comunidade de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em diferentes ambientes ecológicos visando o monitoramento e controle das leishmanioses [Dissertação] Instituto René Rachou. 2021.
- 112- Benassi JC et al. Molecular and serological detection of *Leishmania* spp. in horses from an endemic area for canine visceral leishmaniasis in southeastern Brazil. *Pesq. Vet. Bras*. 2018; 38(6): 1058-1063.
- 113- Chaves L et al. Leishmaniose equina em área endêmica da Fronteira oeste do Rio Grande do Sul Brasil. *Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão*. 2016 8 (2).
- 114- Leonel JAF et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA in blood samples of horses (*Equus caballus*) and donkeys (*Equus asinus*) by PCR. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2021; 63.
- 115- De Sousa Oliveira TMF, Leonel JAF, Cesar J, Spada P et al. Equídeos como hospedeiros de *Leishmania* spp. no Brasil. *Atualidades em Med. Trop. no Brasil* 2020; 8:145-162
- 116- NASA - A Human Fingerprint on the Pantanal Inferno [acesso em 2023 jan 19] Disponível em <https://landsat.visibleearth.nasa.gov/view.php?id=149398>
- 117- Kumar S et al. Changes in land use enhance the sensitivity of tropical ecosystems to fire-climate extremes. *Scientific reports*. 2022; 12(1): 964.
- 118- Galati EA. Estudo dos flebotomíneos (*Diptera, Psychodidae*), em área de leishmaniose tegumentar, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev. de Saúde Pub*. 1996; 30:115-128.