

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

**DISSERTAÇÃO**

***Neorickettsia risticii*: aspectos soro-epidemiológicos e  
estudo da malacofauna em propriedades com  
criações de equinos no estado do Rio de Janeiro**

**RENATA LINS DA COSTA**

2014



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

***Neorickettsia risticii*: ASPECTOS SORO-EPIDEMIOLÓGICOS E  
ESTUDO DA MALACOFUNA EM PROPRIEDADES COM CRIAÇÕES  
DE EQUINOS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

**RENATA LINS DA COSTA**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Huarrisson Azevedo Santos**

*e Co-Orientação do Professor*  
**Carlos Luiz Massard**

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

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2014.

636.10896

C837m

T

Costa, Renata Lins da, 1985-

Neorickettsia risticii: aspectos soropidemiológicos e estudo da malacofauna em propriedades com criações de equinos no Estado do Rio de Janeiro / Renata Lins da Costa. - 2014.

87 f.: il.

Orientador: Huarrisson Azevedo Santos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2014.

Inclui bibliografia.

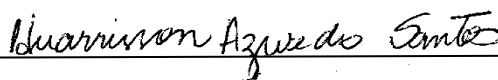
1. Equino - Doenças - Diagnóstico - Rio de Janeiro (Estado) - Teses. 2. Equino - Imunologia - Rio de Janeiro (Estado) - Teses. 3. Neorickettsia - Teses. 4. Molusco como transmissores de doenças - Rio de Janeiro (Estado) - Teses. 5. Relação hospedeiro-parasito - Teses. 6. Trematódeo - Teses. I. Santos, Huarrisson Azevedo, 1980-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

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

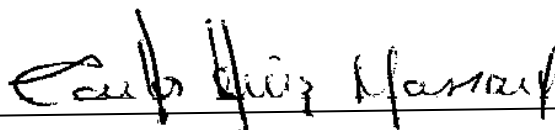
**RENATA LINS DA COSTA**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

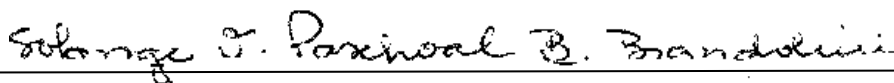
DISSERTAÇÃO APROVADA EM : 18/02/2014.



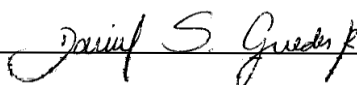
Huarrisson Azevedo Santos, *DSc*, UFRRJ  
(Orientador)



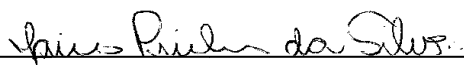
Carlos Luiz Massard, *DSc*, UFRRJ  
(Co-orientador)



Solange Viana Paschoal Blanco Brandolini, *DSc*, UFRRJ



Daniel da Silva Guedes Junior, *DSc*, FIOCRUZ



Jairo Pinheiro da Silva, *DSc*, UFRRJ

## DEDICATÓRIA

*Dedico esta dissertação a Deus, por me guiar e me manter firme durante toda a execução deste trabalho, a meus pais Renê e Luzinete pelo incentivo, apoio e torcida, às minhas irmãs Luciana e Fernanda por todas as palavras de incentivo. Ao meu orientador e co-orientador pela confiança e aos meus amigos de laboratório por todo ensinamento.*

“A coisa mais indispensável a um homem é reconhecer  
o uso que deve fazer do seu próprio conhecimento.”  
Platão.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por me manter perseverante e paciente para que trilhasse meu caminho com muita coragem.

À meus pais, Renê e Luzinete, pela vida, força e paciência por ter me ausentado em alguns momentos. As minhas irmãs, Luciana e Fernanda pelo carinho e atenção. Às minhas sobrinhas Sofia e Olivia pelos momentos de descontração e ao meu cunhado Jorge Luis por todas as palavras de incentivo.

À tia Lucila pelos primeiros passos acadêmicos.

À vó Gisélia por todas as palavras de conforto e por todas as orações quando me encontrava em aflição.

Ao Rodrigo Fortunato de Oliveira por todo apoio, incentivo e por sempre acreditar em minha capacidade profissional.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa durante o Mestrado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo suporte financeiro deste projeto.

Ao Prof. Dr. Carlos Luiz Massard (DPA/IV/UFRRJ), pela confiança, magnífica orientação e por toda contribuição em minha formação acadêmica.

Ao meu orientador Prof. Dr. Huarrisson Azevedo Santos (DESP/IV/UFRRJ) por todo ensinamento acadêmico e pela excelente orientação.

Ao Prof. Dr. Jairo Pinheiro da Silva (DCF/IB/UFRRJ) e Prof. Dr<sup>a</sup> Solange Viana Paschoal Blanco Brandolini (DBA/IB/UFRRJ) por disponibilizarem o laboratório e por todo aprendizado.

À Dr<sup>a</sup> Silvana Thiengo, Dr<sup>a</sup> Monica Lemos Ammon Fernandez e Alessandra Faria além de toda equipe do Laboratório de Malacologia do Instituto Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ – RJ pela identificação dos moluscos.

À Prof. Dr<sup>a</sup> Cristiane Divan Baldani pela utilização do Laboratório de Patologia Clínica do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

À companheira de mestrado Gabriela Lopes Vivas Vitari por toda ajuda nas coletas e em questões pessoais.

Aos companheiros de laboratório Marcus Sandes Pires, Maristela Peckle Peixoto e Claudia Bezerra da Silva por todos os ensinamentos profissionais e por estarem sempre atentos e dispostos a ajudar além dos ótimos momentos de descontração.

Aos bolsistas de iniciação científica, Candida Lucena, Nelson Meireles e Larissa Amorim por toda ajuda e incentivo.

Ao companheiro e amigo Felipe Araujo de Sá por toda ajuda e empenho dado.

À Juliana Macedo Raimundo e Andresa Guimarães por estarem sempre dispostas a ajudar e pelos momentos de descontração.

À toda equipe do Laboratório de Controle Microbiano, Isabele, Patricia, Wendel, Mariana, Caio, Michel, Simone, Alan e Luciana por todos os momentos de descontração.

Aos companheiros Camila e Fabiano Paschoal por ajudarem na utilização da sala de microscopia do Departamento de Parasitologia Animal (DPA/UFRRJ).

Aos responsáveis das propriedades, bem como os Médicos Veterinários Bruno e Nelson por estarem sempre dispostos a colaborar com as coletas.

Aos motoristas Carlos Alberto, Alfeu e Barão pelo transporte aos locais de coleta.

Aos animais, que sem eles, nenhuma pesquisa teria importância.

Obrigada a todos!

## BIOGRAFIA

Renata Lins da Costa, filha de Renê Reis da Costa e Luzinete Ramos Lins da Costa, nasceu em 26 de julho de 1985, no município do Rio de Janeiro, estado do Rio de Janeiro.

Cursou o ensino fundamental no Instituto de Educação Sarah Kubitschek (1992-1996), ginásio na Escola Municipal Amazonas (1997-2000) e ensino médio no Centro Interescolar Estadual Miécimo da Silva, em Campo Grande, Rio de Janeiro, concluindo em 2003.

No ano de 2006 ingressou na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), no curso de Medicina Veterinária.

Durante a graduação realizou estágios na área de clínica de pequenos animais na Clínica Cinco Estrelas em Campo Grande –RJ de janeiro a maio de 2007.

Atuou como bolsista Jovens Talentos II, Pré-iniciação-E FAPERJ, no Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal (LRMGA), trabalhando na área de maturação de oócitos de bovinos (2006-2007). De 2007 a 2008 atuou como bolsista de apoio acadêmico no Laboratório de Zootecnia e Nutrição Animal (LZNA), com ênfase na área de alimentação de ruminantes. Participou de projetos na área de zootecnia (LZNA) com ênfase em enriquecimento ambiental para suínos (2009-2010). Foi bolsista de extensão no Laboratório de Sanidade Animal (LSA), com ênfase na área de Microbiologia (2008-2011).

No ano de 2011, concluiu o curso de Medicina Veterinária.

Ingressou no Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, nível de Mestrado, área de concentração Parasitologia Veterinária, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no ano de 2012, sob orientação do professor Dr. Huarrisson Azevedo Santos e co-orientação do professor Dr. Carlos Luiz Massard, sendo contemplada com bolsa CAPES.

Ao longo do curso de mestrado, entre os anos de 2012 e 2014, desenvolveu trabalhos, juntamente com seus orientadores e a equipe de trabalho, e participou de alguns projetos do laboratório de Hemoparasitos e Vetores, localizado na Estação de Pesquisas Parasitológicas W.O. Neitz da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.



## RESUMO GERAL

COSTA, Renata Lins. *Neorickettsia risticii*: Aspectos soro-epidemiológicos e estudo da malacofauna em propriedades com criações de equinos no estado do Rio de Janeiro. 2014. Dissertação (Mestre em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Este trabalho foi desenvolvido em propriedades com criações de equinos nas microrregiões de Itaguaí e Serrana, ambas localizadas no estado do Rio de Janeiro. O estudo teve por objetivo avaliar o papel de moluscos e trematódeos no ciclo de *Neorickettsia risticii* nas criações localizadas na microrregião de Itaguaí e analisar a frequência de anticorpo anti-*N. risticii* em equinos da microrregião Serrana, destacando os possíveis fatores associados à soropositividade dos animais. Das treze propriedades estudadas na microrregião de Itaguaí, foram coletados 410 espécimes de moluscos límnicos, por meio de puçá adaptado por tela fina. Os moluscos foram expostos à luz incandescente (60 w) por 2-4 horas para pesquisa de formas larvais de trematódeos. Posteriormente, procedeu-se à detecção molecular de *N. risticii* através da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) tanto nas amostras de DNA dos moluscos como nas amostras de larvas de trematódeos. Foram encontrados diversos táxons de moluscos sendo 71,70% (294/410) representados por *Melanoides tuberculata*; 10,97% (45/410) por *Pomacea* sp.; 3,65% (15/410) por *Drepanotrema anatinum*; 6,58% (27/410) por *Biomphalaria tenagophila*; 0,24% (1/410) por *Biomphalaria straminea*; 5,60% (23/410) por *Physa acuta* e 1,21% (5/410) pela Família Hydobriidae. Foi observada uma frequência de 3,17% (13/410) de moluscos parasitados por trematódeos. De acordo com as características morfométricas e biológicas observada nos trematódeos foram classificados os seguintes tipos cercariais: *Megalourous cercariae*, *Pleurolophocercous cercariae* e *Furcocercous cercariae*. Não foi observada amplificação do DNA-alvo para *N. risticii* em nenhuma das amostras de DNA de moluscos e trematódeos analisados. Com relação ao estudo soro-epidemiológico de *N. risticii* em equinos da Microrregião Serrana, foram coletadas 354 amostras de sangue dos animais, residentes em 49 propriedades da região, através de venopunção jugular em tubos de 5 ml sem anticoagulante. As amostras de sangue foram submetidas à centrifugação para obtenção dos soros que foram armazenadas em freezer a -20 °C até o momento das análises. Para detecção de anticorpo anti-*N. risticii* utilizou-se a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), e as amostras foram consideradas positivas quando reagiram à *N. risticii* sob a diluição de 1:50. Dentre os municípios de Petrópolis e Teresópolis encontrou-se uma frequência de 5,9% dos equinos sorologicamente reativos. Dentre os possíveis fatores analisados, constatou-se que sexo, raça, idade, manejo sanitário e zootécnico, presença de caramujos e áreas alagadas não apresentaram associação com a soropositividade dos equinos por *N. risticii* ( $p > 0,05$ ). A região de origem ou procedência do animal foi o único fator associado ( $p < 0,05$ ) à soropositividade por *N. risticii* na área estudada. A presença de animais sorologicamente reativos para *N. risticii* em Petrópolis e Teresópolis indica a circulação do agente em mais uma área geográfica do Brasil. Logo, a pesquisa de moluscos e trematódeos que alberguem a bactéria *N. risticii* pode auxiliar no entendimento da cadeia de transmissão da Erliquiose Monocítica Equina (EME), principalmente em regiões com evidências sorológicas de animais acometidos. Além disso, o estudo dos aspectos epidemiológicos desta doença em criações de equinos do estado do Rio de Janeiro pode fornecer suporte para possíveis medidas de prevenção e controle desta enfermidade nos animais.

**Palavras-chave:** *Neorickettsia risticii*, Moluscos límnicos e Trematódeos, Epidemiologia.

## GENERAL ABSTRACT

COSTA, Renata Lins. *Neorickettsia risticii*: Sero-epidemiological aspects and study of the molluscan fauna in properties with creations of horses in Rio de Janeiro state. 2014. Dissertation (Master Science, Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

This work was developed in properties with creations of horses in the micro-regions of Itaguaí and Serrana, both located in the state of Rio de Janeiro. The study aimed to evaluate the role of molluscs and trematodes in *Neorickettsia risticii* cycle in creations located in the micro-region of Itaguaí and analyze the frequency of antibody against *N. risticii* in horses from Serrana micro-region, standing out the possible associated factors with the seropositivity of animals. Among thirteen properties studied in Itaguaí micro-region were collected 410 specimens of limnic molluscs using hand net adapted by fine screen. The molluscs were exposed to the incandescent light (60 w) during 2-4 hours for research of trematodes larval forms. Subsequently, proceeded to molecular detection of *N. risticii* by Polymerase Chain Reaction in real time (qPCR) in DNA samples of molluscs as in samples of trematodes larval. Many taxons of molluscs were found: 71.70% (294/410) represented by *Melanoides tuberculata*; 10.97% (45/410) by *Pomacea* sp.; 3.65% (15/410) by *Drepanotrema anatinum*; 6.58% (27/410) by *Biomphalaria tenagophila*; 0.24% (1/410) by *B. straminea*; 5.60% (23/410) by *Physa acuta* and 1.21% (5/410) by Family Hydrobiidae. A frequency of 3.17% (13/410) of molluscs parasited by trematodes was observed. According to the morphometric and biological characteristics observed in trematodes were classified the following cercariae types: *Megalourous cercariae*, *Pleurolophocercous cercariae* and *Furcocercous cercariae*. No amplification of the target DNA for *N. risticii* was observed in any DNA samples of molluscs and trematodes analyzed. Regarding to sero-epidemiological study of *N. risticii* in horses of Serrana micro-region, blood samples from 354 animals were collected, residing at 49 properties of region, by jugular venipuncture in tubes of 5mL without anticoagulant. Blood samples were subjected to centrifugation to obtainment of serums which were stored in freezer at -20°C until analysis moment. For detection of antibodies against *N. risticii* was used the Immunofluorescence Antibody Test (IFAT), and the samples were considered positive when reacted to *N. risticii* at 1:50 dilution. Between the municipalities of Petropolis and Teresopolis, was found a frequency of 5.9% of serologically reactive horses. Among the possible factors analyzed, it was found that gender, breed, age, zootechnical and sanitary management, presence of snails and flooded areas did not present association with seropositivity of horses by *N. risticii* ( $p > 0.05$ ). The region of origin or provenance of the animal was the only factor associated ( $p < 0.05$ ) with seropositivity for *N. risticii* in the area studied. The presence of animals serologically reactive to *N. risticii* in Petropolis and Teresopolis indicate the possible movement of the agent in one more geographical area of Brazil. Therefore, the research of molluscs and trematodes that sheltering the bacterium *N. risticii* may help in understanding the chain of Equine Monocytic Ehrlichiosis (EME) transmission, especially in regions with serological evidence of affected animals. Moreover, the study of the epidemiology aspects of this disease in horses creations of Rio de Janeiro state can provide support for possible measures to prevent and control this disease in animals.

**Keywords:** *Neorickettsia risticii*, limnics Molluscs and Trematodes, Epidemiology.

## LISTA DE TABELAS

### CAPITULO I

<b>Tabela 1.</b>	Total de moluscos límnicos coletados de janeiro a maio de 2013 nas propriedades equestres da Microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro. .....	18
<b>Tabela 2.</b>	Percentual dos espécimes de moluscos coletados nos municípios da Microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro, no período de janeiro a maio de 2013.....	19
<b>Tabela 3.</b>	Frequência de moluscos encontrados nos diferentes tipos de criadouros presentes nas propriedades da Microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.....	19
<b>Tabela 4.</b>	Frequência de moluscos encontrados nos diferentes tipos de criadouros nas propriedades dos municípios de Itaguaí, Seropédica e Mangaratiba, estado do Rio de Janeiro.....	20
<b>Tabela 5.</b>	Coordenadas de localização do criadouro, identificação e número de depósito na Coleção de Molusco do Instituto Oswaldo Cruz dos táxons coletados na Microrregião de Itaguaí/RJ, no período de janeiro a maio de 2013.....	20
<b>Tabela 6.</b>	Frequência dos táxons naturalmente infectados por trematódeos coletados em diferentes criadouros nas propriedades equestres na microrregião de Itaguaí/RJ.....	21
<b>Tabela 7.</b>	Frequência de moluscos naturalmente infectados por trematódeos nos diferentes criadouros de Seropédica, Itaguaí e Mangaratiba, Microrregião de Itaguaí/RJ, coletados de janeiro a maio de 2013.....	22

## CAPÍTULO II

<b>Tabela 1.</b>	Frequência de anticorpos anti- <i>Neorickettsia risticii</i> na diluição de 1:50 de soro equino através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função do município, na microrregião Serrana, RJ.....	47
<b>Tabela 2.</b>	Frequência de anticorpos anti- <i>Neorickettsia risticii</i> na diluição de 1:50 de soro equino através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função da altitude, na microrregião Serrana, RJ.....	47
<b>Tabela 3.</b>	Frequência de anticorpos anti- <i>Neorickettsia risticii</i> na diluição de 1:50 de soro equino através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função da condição da Propriedade, na microrregião Serrana, RJ.....	48
<b>Tabela 4.</b>	Frequência de anticorpos anti- <i>Neorickettsia risticii</i> na diluição de 1:50 de soro equino através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função da presença de bovinos na propriedade, na microrregião Serrana, RJ.....	48
<b>Tabela 5.</b>	Frequência de anticorpos anti- <i>Neorickettsia risticii</i> na diluição de 1:50 de soro equino através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função do sistema de manejo dos animais, na microrregião Serrana, RJ.....	49
<b>Tabela 6.</b>	Frequência de anticorpos anti- <i>Neorickettsia risticii</i> na diluição de 1:50 de soro equino através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função do tipo de área predominante nas propriedades, na microrregião Serrana/ RJ.....	49
<b>Tabela 7</b>	Frequência de anticorpos anti- <i>Neorickettsia risticii</i> na diluição de 1:50 de soro equino através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função da presença de caramujos, na microrregião Serrana, RJ.....	50
<b>Tabela 8</b>	Frequência de anticorpos anti- <i>Neorickettsia risticii</i> na diluição de 1:50 de soro equino através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função da origem dos animais, na microrregião Serrana, RJ.....	50
<b>Tabela 9.</b>	Frequência de anticorpos anti- <i>Neorickettsia risticii</i> na diluição de 1:50 de soro equino através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função da região de origem dos animais, na microrregião Serrana, RJ.....	50

<b>Tabela 10.</b>	Frequência de anticorpos anti- <i>Neorickettsia risticii</i> na diluição de 1:50 de soro equino através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função da utilização dos animais na propriedade, na microrregião Serrana, RJ.....	51
<b>Tabela 11.</b>	Frequência de anticorpos anti- <i>Neorickettsia risticii</i> na diluição de 1:50 de soro equino através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função do sexo, na microrregião Serrana, RJ.....	51
<b>Tabela 12.</b>	Frequência de anticorpos anti- <i>Neorickettsia risticii</i> na diluição de 1:50 de soro equino através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função da idade, na microrregião Serrana, RJ.....	52
<b>Tabela 13.</b>	Frequência de anticorpos anti- <i>Neorickettsia risticii</i> na diluição de 1:50 de soro equino através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função da raça, na microrregião Serrana, RJ.....	52

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Coleta de moluscos límnicos utilizando puçá adaptado com malha fina de 2 mm.....	14
<b>Figura 2.</b>	Moluscos embalados e enviados ao Laboratório de Malacologia/IOC/FIOCRUZ-RJ para identificação.....	14
<b>Figura 3A.</b>	Exposição dos moluscos a luz para pesquisa de trematódeos .....	15
<b>Figura 3B.</b>	Visualização da água após a exposição.....	15
<b>Figura 4.</b>	Curvas com padrões de amplificação do fragmento de 85 pb do gene <i>16S rRNA</i> de <i>N. risticii</i> em amostras de moluscos e fases larvais de trematódeos, obtidas pela PCR em tempo real utilizando o sistema TaqMan. Duas curvas deslocadas à esquerda: controle positivo.....	17
<b>Figura 5.</b>	Diferentes espécimes de moluscos límnicos presentes nas propriedades equestres da Microrregião de Itaguaí/RJ.....	18
<b>Figura 6.</b>	Diferentes espécimes larvais obtidos de moluscos límnicos naturalmente infectados nas propriedades da Microrregião de Itaguaí-RJ.....	23

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Classificação do tipo de criadouro habitado por moluscos límnicos presentes nas propriedades criadoras de equinos da microrregião de Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro, adaptado de Miyahira (2009).....	12
---	----

## LISTA DE ABREVIACOES

AFA	Álcool-Formalina-Ácido acético
AMP	Adenosina Monofosfato
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
Cl <sup>-</sup>	Cloreto
Cq	Ciclo de quantificação
DESP	Departamento de Saúde Pública
DCF	Departamento de Ciências Fisiológicas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPA	Departamento de Parasitologia Animal
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
EME	Erliquiose Monocítica Equina
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GPS	Sistema de Posicionamento Global
IB	Instituto de Biologia
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgG	Imunoglobulina G
LRNM	Laboratório de Referência Nacional em Malacologia
Na <sup>+</sup>	Sódio
PBS	Tampão Salina Fosfatado
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
rRNA	Ácido Ribonucleico
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>CAPÍTULO I- Pesquisa de <i>Neorickettsia risticii</i> na malacofauna límnic oriunda de propriedades equestres da Microrregião de Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro</b> .....	2
<b>RESUMO</b> .....	3
<b>ABSTRACT</b> .....	4
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	5
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	6
2.1 Taxonomia.....	6
2.2 Agente Etiológico .....	6
2.3 Histórico .....	6
2.4 Transmissão .....	7
2.5 Patogenia .....	8
2.6 Transmissores .....	8
2.7 Diagnóstico de <i>Neorickettsia risticii</i> em moluscos e trematódeos .....	9
2.8 Filo Mollusca .....	10
2.8.1 Classe Gastropoda .....	11
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	12
3.1 Local do Estudo .....	12
3.2 Classificação do tipo de criadouro.....	12
3.3 Tamanho da Amostra de Caramujo .....	12
3.4 Coleta e identificação dos moluscos límnicos e fases larvais de trematódeos .....	13
3.5 Diagnóstico molecular de <i>Neorickettsia risticii</i> em moluscos e trematódeos por Real Time (qPCR) .....	15
3.5.1 Controle positivo.....	16
<b>4 RESULTADOS</b> .....	17
4.1 Detecção molecular de <i>Neorickettsia risticii</i> em moluscos e trematódeos .....	17
4.2 Malacofauna .....	17
4.3 Trematódeos .....	21
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	24
5.1 Detecção molecular de <i>Neorickettsia risticii</i> em moluscos e trematódeos .....	24
5.2 Malacofauna .....	25
5.2.1 Taxa de parasitismo de moluscos por trematódeo .....	26
5.3 Trematódeos .....	26
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	28
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	29
<b>CAPÍTULO II - Aspectos sorológicos de <i>Neorickettsia risticii</i> em equinos da Microrregião Serrana, Estado do Rio de Janeiro</b> .....	37
<b>RESUMO</b> .....	38
<b>ABSTRACT</b> .....	39

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	40
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	41
2.1 Estudos soroepidemiológicos de <i>Neorickettsia risticii</i> em equinos no Mundo e no Brasil.....	41
2.2 Hospedeiros susceptíveis .....	41
2.3 Fatores associados à infecção nos equinos .....	42
2.4 Diagnóstico nos equinos .....	42
2.5 Tratamento e Profilaxia .....	43
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	44
3.1 Local do estudo .....	44
3.2 Questionário Epidemiológico.....	44
3.3 Tamanho amostral .....	45
3.4 Coleta e processamento do soro dos equinos .....	45
3.5 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	46
3.6 Análise Estatística .....	46
<b>4 RESULTADOS</b> .....	47
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	53
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	56
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	57
<b>8 CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	62
<b>ANEXOS</b> .....	63
<b>Anexo I Questionário Epidemiológico</b> .....	64
<b>Anexo II Protocolo RIFI</b> .....	68
<b>Anexo III</b> Protocolo para extração de DNA de moluscos ( <i>Wizard® Genomic DNA Purification Kit from tissue</i> ).....	69
<b>Anexo IV</b> - Protocolo para extração de DNA de fases larvais de trematódeos ( <i>Wizard® Genomic DNA Purification Kit from tissue</i> ).....	70

## INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Neorickettsia* pertence à família Anaplasmataceae que está incluída na ordem Rickettsiales (DUMLER et al., 2001). Atualmente existem três espécies reconhecidas: *Neorickettsia risticii* (Holland et al., 1985), *Neorickettsia sennetsu* (Misao; Kobayashi, 1954) e *Neorickettsia helminthoeca* (Hadlow; Hughes, 1954), que parasitam tanto trematódeos quanto mamíferos. *Neorickettsia risticii* é o agente etiológico da Erliquiose Monocítica Equina (EME). A doença também conhecida como “Potomac Horse Fever” foi diagnosticada a primeira vez em Maryland, Condado de Montgomery, Estados Unidos no final da década de 70 (HOLLAND et al., 1985).

No Brasil, a EME foi diagnosticada em 1998 em propriedades localizadas próximas a Lagoa Mirim e Mangueira, ao sul do Rio Grande do Sul, onde Dutra et al. (2001) investigaram uma doença que ocorria há mais de 100 anos, localmente chamada “churrido equino”, caracterizada por uma diarreia endêmica de equinos. Os casos clínicos de EME evidenciados no Rio Grande do Sul ocorreram no período mais quente do ano, com a concentração dos casos nos meses de novembro a janeiro. As propriedades apresentavam características geográficas semelhantes, sendo compostas de campos e áreas alagadiças (COIMBRA et al., 2006).

*Neorickettsia risticii* caracteriza-se por ser uma rickettsia e possui predileção por células do sistema mononuclear, parasitando principalmente os monócitos. Os sinais clínicos da EME são bastante variáveis e incluem febre, depressão, anorexia, redução dos borborigmos intestinais, edema subcutâneo nos membros e no abdome, desidratação, diarreia e laminite. A diarreia pode ser leve ou severa e ocorre em 10% a 30% dos casos, podendo ser também transitória, persistente ou não ocorrer. Laminite ocorre em 15% a 25% e dor abdominal severa em aproximadamente 5% a 10% dos animais acometidos (RIKIHISA; PERRY, 1985).

A transmissão é oral através da ingestão acidental de insetos aquáticos ou moluscos contendo formas larvais de trematódeos que apresentam esta bactéria (MOTT et al., 2002; PUSTERLA et al., 2000, 2003). Os equinos também são susceptíveis às transmissões intradérmica e endovenosa (DUTTA et al., 1987), sendo que estas vias de transmissão só foram observadas em infecção experimental, sendo a transmissão oral a via de transmissão mais provável de infecção (PALMER et al., 1986; BISWAS et al., 1994).

O diagnóstico da EME nos equinos pode ser realizado por métodos sorológicos como a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), ELISA e western immunoblotting e métodos moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Já nos moluscos e trematódeos a PCR é o método mais utilizado (BARLOUGH et al., 1998; LONG et al., 2003; PUSTERLA et al., 2003).

Como tratamento, deve-se realizar administração de fluidos, para correção do equilíbrio hidro-eletrolítico e ácido-básico, e administrar tetraciclina. Para profilaxia, reduzir o acesso dos animais ao pasto, principalmente nos meses de maior frequência da doença, constituem medidas eficazes de controle (MADIGAN; PUSTERLA, 2005). Os objetivos do presente estudo foram avaliar a participação de moluscos límnicos e trematódeos digenéticos na transmissão da EME na Microrregião de Itaguaí e determinar, através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), a soro prevalência de anticorpo anti-*N. risticii* e os possíveis fatores associados para os equinos criados na Microrregião Serrana, estado do Rio de Janeiro.

## **CAPÍTULO I**

**Pesquisa de *Neorickettsia risticii* na malacofauna límnic  
oriunda de propriedades equestres da microrregião de  
Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.**

## RESUMO

COSTA, Renata Lins. **Pesquisa de *Neorickettsia risticii* na malacofauna límnic oriunda de propriedades equestres da Microrregião de Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro**. 2014. Dissertação (Mestre em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Foram coletados 410 moluscos límnicos, com auxílio de um puçá adaptado com malha fina de 2mm, em treze propriedades criadoras de equinos na microrregião de Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro. Os moluscos foram separados por propriedade e táxon, 10% do total coletado em cada propriedade foram enviados ao Laboratório de Referência em Malacologia da FIOCRUZ/RJ onde foram identificados e depositados na coleção de moluscos. Para pesquisa de trematódeos, os espécimes foram expostos a luz (60 w) por 2-4h, posteriormente foram seccionados em quatro regiões anatômicas (glândula digestiva, massa cefalopodal, complexo glândula digestiva-gônadas e estruturas restantes, denominada cavidade respiratória), as quais foram submetidas a extração de DNA e analisadas através da PCR em tempo real (qPCR). Das propriedades estudadas foram coletados 410 espécimes, 71,70% (294/410) representados por *Melanooides tuberculata*; 10,97% (45/410) por *Pomacea* sp.; 3,65% (15/410) por *Drepanotrema anatinum*; 6,58% (27/410) por *Biomphalaria tenagophila*; 0,24% (1/410) por *Biomphalaria straminea*; 5,60% por (23/410) *Physa acuta* e 1,25% (5/410) por Família Hydrobiidae. Com relação à pesquisa de trematódeos nestes exemplares, observou-se uma frequência de 3,17% (13/410). Os trematódeos foram fixados e corados com hematoxilina e classificados de acordo com características morfológicas e biológicas em tipos cercarias: *Megalourous cercariae*, *Pleurolophocercous cercariae* e *Furcocercous cercariae*. Na qPCR não foi observada amplificação do DNA-alvo para *N. risticii* nos gêneros analisados. A ausência do DNA da bactéria nas amostras de moluscos e trematódeos analisadas não descarta a possibilidade destes moluscos estarem envolvidos na transmissibilidade de *N. risticii*. Fatores como sazonalidade, baixa frequência de *N. risticii* nos equinos e competência vetorial dos moluscos estudados podem ter contribuído para a não detecção do agente nas amostras analisadas. Desta forma, novos estudos são necessários para uma melhor compreensão dos aspectos relacionados aos hospedeiros intermediários e a transmissão desta bactéria aos equinos na região do estudo.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Neorickettsia risticii*, Equinos, Moluscos límnicos e Trematódeos.

## ABSTRACT

COSTA, Renata Lins. **Research of *Neorickettsia risticii* in limnic molluscan fauna from equestrian properties of Itaguaí micro-region, state of Rio de Janeiro.** 2014. Dissertation (Master Science, Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Four hundred and ten (410) limnic molluscs were collected with the aid of fine mesh netting fitted with 2mm, in thirteen properties creators of horses in Itaguaí micro-region, state of Rio de Janeiro. The molluscs were separated by taxon and property, 10% of the total collected on each property were sent to the Laboratory of Malacology FIOCRUZ/RJ, where were identified and deposited in the collection of molluscs. The specimens were exposed to the light (60 w) for 2-4h to search trematodes, posteriorly the specimens were sectioned in four anatomical regions (digestive gland, cephalopodal mass, gonads and remaining structures, denominated lung cavity), which were subjected to DNA extraction and analyzed by real-time PCR (qPCR). Of the properties studied, 410 specimens were collected, which 71.70% (294/410) represented by *Melanooides tuberculata*, 10.97% (45/410) by *Pomacea* sp., 3.65% (15/410) by *Drepanotrema anatinum*, 6.58 % (27/410) by *B. tenagophila*, 0.24 % (1/ 410) by *B. straminea*, 5.60% (23/410) by *Physa acuta* and 1.21% (5/410) by Hydobriidae family. Regarding to research these trematodes specimens, there was a frequency of 3.17% (13/410). The trematodes were fixed and stained with hematoxylin, and classified according to morphological and biological characteristics in cercariae types: *Megalourous cercariae*, *Pleurolophocercous cercariae* and *Furcocercous cercariae*. In qPCR was not observed amplification of target DNA for *N. risticii* in the genus analyzed. The absence of bacterium DNA in molluscs and trematodes samples analyzed does not rule out the possibility that these molluscs are involved in the transmission of *N. risticii*. Factors such as seasonality, low parasitemia in horses and vector competence of the studied molluscs may have contributed to the non-detection of the agent in the samples analyzed. Thus, further studies are needed for a better understanding of the related aspects to the intermediates hosts and to the transmission of this bacterium to the horses in the studied region.

**Keywords:** *Neorickettsia risticii*, Horses, Trematodes and limnic Molluscs.

## 1 INTRODUÇÃO

*Neorickettsia risticii* é o agente causal da Erliquiose Monocítica Equina (EME), doença que causa febre e sintomas gastrointestinais em cavalos. A doença teve seu primeiro surto em 1979 em Maryland (Estados Unidos) e no Brasil a doença foi diagnosticada pela primeira vez no sul do Rio Grande do Sul sendo denominada de “Churrido Equino” (DUTRA et al., 2001) e desde então evidências sorológicas tem sido descritas em diferentes estados brasileiros (COIMBRA et al., 2006; FERRÃO et al., 2007; ROIER, 2011 e MOREIRA et al., 2013). A bactéria infecta monócitos e possui afinidade por células da parede intestinal, especialmente ceco e cólon maior. Os sinais clínicos são variáveis, mas em geral ocasiona febre, anorexia, edema subcutâneo e diarreia (RIKIHISA et al., 1991).

Apesar da ocorrência da EME ter sido relatada em diferentes países, a forma de transmissão, seus reservatórios e o modo como se mantém na natureza ainda não foram totalmente esclarecidos. Até o presente momento, sabe-se que os transmissores de *N. risticii* são trematódeos que utilizam moluscos límnicos e insetos aquáticos como hospedeiros intermediários, sendo a detecção de *N. risticii* em trematódeos da família Lecithodendriidae e em moluscos límnicos das famílias: Planorbidae, Pleuroceridae e Hydrobiidae já comprovada (BARLOUGH et al., 1998; REUBEL et al., 1998; PUSTERLA et al., 2000; COIMBRA et al., 2006; PUSTERLA et al., 2013). A infecção nos equinos se dá pela ingestão destes moluscos contendo trematódeos infectados por esta bactéria sugerindo que a EME segue o padrão de transmissão oral.

Sobre a prevalência de *N. risticii* particularmente no estado do Rio de Janeiro, alguns estudos demonstraram a circulação deste agente através de estudos sorológicos dos animais (ROIER, 2011; MOREIRA et al., 2013). Particularmente, na Microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro, Roier (2011) demonstrou 26,3% de soropositividade para *N. risticii* em equinos. Logo, a partir destes estudos, o presente trabalho teve por objetivos identificar a malacofauna e detectar, a nível molecular, o agente etiológico da EME em propriedades criadoras de equinos na microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1- Taxonomia

Domínio: Eubacteria

Filo: Proteobacteria Classe:  $\alpha$ - proteobacteria

Ordem: Rickettsiales (Gieszczykiewicz, 1939)

Família: Anaplasmataceae (Philip, 1957)

Gênero: *Neorickettsia* (Philip, Hadlow ; Hughes 1953)

Espécie: *Neorickettsia risticii* (Holland., 1985)(Dumler et al., 2001)

### 2.2- Agente etiológico

*Neorickettsia risticii*, é uma Proteobacteria (do grego: *Proteus*, capaz de mudar de forma; + *bakterion*, pequeno bastão). As proteobacterias inicialmente foram descritas como classe por Stackebrandt et al. (1988), no entanto Bergey a reclassificou como filo. O filo Proteobacteria constitui um dos maiores do domínio Eubacteria, incluindo mais de duzentos gêneros e é constituído predominantemente por bactérias gram-negativas.

É um parasito intracelular obrigatório e morfológicamente apresentam-se como organismos pleomórficos (redondo, oval ou alongado) delimitado por uma membrana plasmática dupla e parede celular ondulada. O tamanho é variável, mas em geral possuem entre 0,4 e 0,75  $\mu\text{m}$  de largura e de 0,5 a 1,2  $\mu\text{m}$  de comprimento. Apresentam-se delimitadas por uma membrana vacuolar citoplasmática ou isoladamente como corpos de inclusão. Sua multiplicação ocorre por fissão binária. Podem ser cultivadas em linhagens celulares suplementadas com 20% de soro fetal bovino e sua temperatura ideal de crescimento é de 37°/38°C a 5% de CO<sub>2</sub> e o meio pode ser suplementado por L-glutamina (HOLLAND et al., 1985).

### 2.3- Histórico

*Neorickettsia risticii* é o agente etiológico da EME e é considerada uma doença infecciosa, mas não contagiosa e possui como sinonímia “Febre do Cavalo do Potomac”. A doença foi detectada pela primeira vez em 1979 ao longo do rio Potomac, no Condado de Montgomery/ Maryland, Estados Unidos por Médicos Veterinários (HOLLAND et al., 1985; RIKIHISA et al., 1985).

Entre 1979 e 1981, a maioria dos casos da EME, em Maryland, ocorreu bem próximo ao rio Potomac e entre 1982 e 1986, a incidência da doença atingiu 904 casos. Com o aumento da incidência associado à natureza focal da doença levou à hipótese de que se tratava de uma nova doença, sendo inicialmente denominada de “Síndrome da Diarreia Aguda”. O termo “Febre do Cavalo do Potomac” foi criado por um repórter de televisão local que cobria uma matéria sobre a epizootia, batizando a doença durante a reportagem (BAIRD; ARROYO, 2013). Considerando a presença desta nova doença, a busca por seu agente etiológico começou a ser realizada.

Em 1985, um grupo de pesquisadores isolou uma nova bactéria a partir do cultivo celular de equinos infectados experimentalmente. Durante a análise das células observou-se a presença de um microrganismo em leucócitos com caracteres compatíveis com as de uma Rickettsia, a partir desta descoberta achava-se que se tratava de *Erlichia equi* (Foggie, 1951), causadora da erliquiose equina, no entanto ao realizar testes sorológicos determinou-se que a bactéria não se tratava de *E. equi* pois as amostras de soro foram negativas para este agente. Apesar de não reativos para *E. equi* algumas



amostras reagiram em títulos baixos para *Erlichia canis* (Donatien; Lestoquard, 1935) e para *Neorickettsia sennetsu* (Misao; Kobayashi, 1954) sugerindo que este novo microrganismo compartilhava pelo menos o mesmo gênero. A partir destes resultados sorológicos foram realizadas técnicas de cultivo e isolamento semelhantes aos utilizados para *E. canis* e *N. sennetsu*, e ao obterem o cultivo inocularam-no em pôneis. Os animais produziram sinais clínicos compatíveis com a EME e a partir deste pônei infectado, o organismo foi reisolado em cultura de monócitos preparados a partir do sangue deste animal (cumprindo o postulado de Koch) e determinou-se que o microrganismo recentemente isolado era morfológicamente indistinguível dos outros membros do gênero, de acordo com dados morfológicos e sorológicos determinou-se que se tratava de uma nova espécie do gênero *Erlichia*, denominando-a de *E. risticii* em homenagem a Miodrag Ristic, pesquisador atuante na área das doenças rickettsiais em especial da família Anaplasmataceae (HOLLAND et al., 1985).

Em 2001, após realização de uma análise filogenética Dumler et al. determinaram que *Erlichia risticii* fosse reclassificada para o gênero *Neorickettsia* baseando-se nos caracteres morfológicos e moleculares que se assemelhavam a outras bactérias do gênero, demonstrando quase 100% de similaridade, sendo denominada de *Neorickettsia risticii* (ANNE-VÉRONNIQUE et al., 2003).

#### **2.4- Transmissão**

Estudos experimentais demonstraram que a EME pode ser transmitida via transfusão sanguínea e oral, ao inocular sangue sabidamente infectado em animais saudáveis, Dutta et al. (1988) determinaram que 71% dos equinos apresentaram os sinais clínicos compatíveis com os da erliquiose monocítica. No entanto, Palmer; Benson (1988) também determinaram que a transmissão ocorre por via oral, pois ao inocularem monócitos de ratos previamente infectados com cultivo celular de *N. risticii* via sonda nasogástrica em equinos saudáveis, puderam observar os sinais clínicos da doença em dois dos quatro animais infectados.

A transmissão transplacentária de *N. risticii* também pode ocorrer e tem sido evidenciada em infecções naturais e experimentais, a bactéria provoca aborto, promove a reabsorção do feto ou da origem a potros fracos. Dawson et al. (1987) realizaram uma infecção experimental, com cultura de *N. risticii* em uma égua com três meses de gestação, após quatro meses a égua foi abatida e necropsiada revelando no feto a presença de *N. risticii* na medula óssea, baço, linfonodos mesentéricos e cólon menor. Infecções naturais promovendo aborto também já foram relatadas, em setembro de 1991 na escola veterinária da Universidade de Illinois/ EUA, quando Long et al. (1995) observaram que éguas prenhas desenvolveram os sinais clínicos da EME e, posteriormente, abortaram no 7º mês de gestação.

Estudos demonstraram que a principal via de transmissão natural desta bactéria ocorre por via oral, da mesma forma que com outras bactérias deste gênero, sendo intermediado por moluscos aquáticos e trematódeos, e que, os equinos se infectam quando ingerem água de rios, lagos, lagoas ou riachos contendo as fases larvais dos trematódeos infectados ou ao ingerirem insetos aquáticos contendo as fases de metacercaria encistada em sua musculatura, ou ainda pela ingestão de moluscos infectados (BARLOUGH et al., 1998; PUSTERLA et al., 2003; PUSTERLA et al., 2000; GREIMAN et al., 2013; PUSTERLA et al., 2013).

## 2.5- Patogenia

*Neorickettsia risticii* parasita monócitos, macrófagos, mastócitos e células epiteliais intestinais. As células epiteliais do intestino perdem as microvilosidades e isto promove a redução do transporte de eletrólitos reduzindo a reabsorção de água. Um aumento intracelular de AMP cíclico também é observado e contribui para a absorção reduzida do transporte de eletrólitos, principalmente Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> com consequente prejuízo na reabsorção de água desenvolvendo diarreia (RIKIHISA et al., 1991; BAIRD; ARROYO, 2013).

Nas fases iniciais da doença, a febre varia de 38 a 41°C e é acompanhada por comportamento deprimido e diminuição da ingestão de alimentos. Mudanças de consistência das fezes, na maioria dos casos, ocorrendo a formação de fezes com uma consistência aquosa durante 1 a 3 dias. Vários dias após a fase aguda da doença, cerca de 30% dos animais afetados apresentam outros sinais, incluindo cólicas, edema subcutâneo nas pernas e no abdômen e por fim laminite, aproximadamente 25% dos equinos afetados ou morrem ou são eutanaziados (RIKIHISA et al., 1991).

Na necropsia, as lesões macroscópicas incluem ulceração das regiões glandulares e pilórica do estômago, congestão irregular do duodeno, áreas focais de congestionamento no ceco além do conteúdo aquoso nesses órgãos (CORDES et al., 1986). Alguns cavalos desenvolvem toxemia e desidratação grave e isto resulta em comprometimento cardiovascular que é caracterizado por aumento dos batimentos cardíacos e da frequência respiratória além das mucosas congestionadas. A laminite só é evidenciada em cavalos naturalmente infectados, o que provavelmente ocorre devido aos mecanismos fisiopatológicos indeterminados relacionados com a via de transmissão natural (MADIGAN et al. 2005).

Os achados laboratoriais incluem leucopenia com desvio a esquerda (<5000 células/μl seguida por uma leucocitose rebote (>14 000 células/μl), anemia, alterações na concentração de proteína plasmática, diminuição do hematócrito e trombocitopenia. Estes achados variam na fase inicial da EME e não podem ser utilizados para fazer diagnóstico definitivo (MULVILLE et al., 1991).

As taxas de letalidade variam de 5% - 30% dos casos dependendo da estirpe envolvida e da resposta do hospedeiro. Não há evidência da cronicidade de *N. risticii*, justificando muitas vezes o fato dos animais serem sorologicamente reativos e molecularmente negativos (ZIMERMANN; CRISMAN, 2008).

## 2.6- Transmissores

A primeira hipótese considerada na transmissão da EME foi o envolvimento de carrapatos, uma vez que *N. risticii* é membro da ordem Rickettsiales. Porém, Carroll et al. (1989) comprovou que fases de larva e ninfa de *Dermacentor variabilis* (Say, 1821) não foram capazes de albergar e nem transmitir *N. risticii*. Ainda no mesmo estudo os autores relatam a possível participação de roedores “Ratos dos pés brancos” (*Peromyscus leucopus*) como reservatório da EME, entretanto não foi possível detectar anticorpo para *N. risticii* nos mesmos, excluindo-os como membros do ciclo da EME.

A hipótese de insetos hematófagos estarem envolvidos na transmissão da EME também foi considerada. Burg et al. (1990) desafiaram moscas da espécie *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758), fazendo-as realizarem o repasto sanguíneo em pôneis previamente infectados com cepas de *N. risticii*. Como resultado, não foi possível

detectar *N. risticii* no trato digestivo de *S. calcitrans* sugerindo que esta mosca hematófaga não está envolvida na transmissão.

O fato dos casos da EME ocorrerem em áreas próximas a habitats aquáticos suscitou a possibilidade de *N. risticii* ter uma estreita relação filogenética com Rickettsias de ambientes aquáticos, como a *Neorickettsia helminthoeca* “Agente do Envenenamento por Salmão” que acomete principalmente os cães. A doença é transmitida de forma oral através da ingestão de peixes contendo as fases de metacercária encistada na musculatura (HEADLEY et al., 2009). A confirmação pela proximidade filogenética foi realizada pela análise antigênica, colocando *N. sennetsu*, *N. helminthoeca*, *N. risticii* no mesmo clado (DUMLER et al., 2001). Posteriormente, a esta associação filogenética, a hipótese de que *N. risticii* poderia ser transmitida por invertebrados aquáticos começou a ser considerada, sendo confirmada em outros estudos. Barlough et al. (1998) e Pusterla et al. (2013) detectaram *N. risticii* em moluscos da família Pleuroceridae, gênero *Juga* (Adams; Adams, 1854), e família Planorbidae, gênero *Planorbella* (Haldeman, 1843) coletados em fluxos de água próximo ao pasto dos equinos na Califórnia, região considerada enzoótica para EME.

O ciclo é complexo e estudos demonstram que espécies de trematódeos, com estágios de vida em hospedeiros intermediários, sejam os reservatórios naturais desta bactéria. Desta forma, nos digenéticos a transmissão de *N. risticii* ocorre de forma transovariana e nos morcegos, considerados hospedeiros definitivos, a transmissão ocorre por contato direto ao ingerir insetos aquáticos (GIBSON et al., 2005; CICUTTIN et al., 2013). No leste dos Estados Unidos, *N. risticii* é mantido pelo *Acanthatrium oregonense*, que tem um ciclo de vida constituído de miracídios e esporocistos em moluscos (*Elimia virginica* (Say, 1817), *Oxytrema silicula* (Lea, 1838) cercárias e metacercárias em insetos aquáticos (Trichoptera, Ephemeroptera, Odonata, Zygoptera, Odonata, Anisoptera e Plecoptera) e adultos que se reproduzem e liberam os ovos no lúmen intestinal de morcegos insetívoros. Estes insetos infectados, que vivem em estreita associação com moluscos nos córregos ou lagos, é que são responsáveis pela transmissão de *N. risticii* para os hospedeiros potenciais como peixes, anfíbios e mamíferos, sendo esta provavelmente a forma de infecção para os equinos (PUSTERLA et al., 2003; BAIRD e ARROYO, 2013). Em outros estudos demonstrou-se uma frequência de 10% (n=30) a 17,9% (n=429) de *N. risticii* em morcegos e moluscos (PUSTERLA et al., 2003; CICUTIN et al., 2013).

No Brasil, os estudos sobre os hospedeiros intermediários e definitivos da EME são escassos, havendo evidências da ocorrência de *N. risticii* em trematódeos do tipo *Parapleurolophoecous cercariae* encontrados em moluscos aquáticos do gênero *Heleobia* sp. em área com evidências clínicas de infecção em equinos no sul do país (COIMBRA et al., 2006).

## **2.7- Diagnóstico de *Neorickettsia risticii* em moluscos límnicos e trematódeos digenéticos**

As técnicas de biologia molecular têm assumido grande importância na detecção de várias espécies de microrganismos em vetores e hospedeiros, principalmente, espécies de rickettsias. A reação em cadeia da polimerase (PCR) está facilitando o diagnóstico das doenças erliquiais e tem auxiliado na classificação taxonômica destes e de outros agentes infecciosos, além do mais a PCR auxilia na identificação dos vetores das doenças erliquiais, na detecção de novas cepas ou variantes de espécies e ainda permite a detecção precoce da infecção. O diagnóstico de *N. risticii* nos moluscos e nos trematódeos é realizado a partir de técnicas moleculares visando à pesquisa do DNA do

agente etiológico, através da PCR e tem sido a única ferramenta para diagnóstico em moluscos e trematódeos (DAGNONE et al., 2001).

Barlough et al.(1998) realizaram a primeira detecção de *N. risticii* em moluscos através da técnica de “*Nested PCR*” amplificando um fragmento de 529 pares de base do gene *16S rRNA*, onde as condições de termociclagem foram idênticas as realizadas para detecção da bactéria no sangue de equinos (BARLOUGH et al., 1997). Após a primeira detecção molecular de *N. risticii* em moluscos, muito outros estudos foram conduzidos (REUBEL et al., 1998; MADIGAN et al., 1989). No Brasil, Coimbra et al. (2006) relataram o primeiro diagnóstico molecular de *N. risticii* em moluscos e trematódeos através da “*Nested PCR*”

No entanto, em estudos realizados por Pusterla et al. (2000), estes demonstraram que através da técnica de PCR em tempo real (qPCR) também foi possível detectar a presença do DNA de *N. risticii*, através da amplificação de um fragmento de 85 pb do gene *16S rRNA*. A qPCR é considerada uma técnica de alta sensibilidade, pois utiliza sonda onde é possível amplificar com eficiência fragmentos de pequenos pares de base, além disso é uma técnica rápida e oferece menos riscos de contaminação ambiental sendo a mais utilizada envolvendo estudos com agentes raros.

## **2.8- Filo Mollusca (Linnaeus, 1758)**

Neste filo, encontramos sete classes: Aplacophora, Polyplacophora, Monoplacophora, Scaphoda, Bivalvia, Gastropoda e Cephalopoda sendo que a classe Gastropoda (Cuvier, 1797) possui maior importância Médico-Veterinária. É um grupo de invertebrados que possui grande importância sócio-econômico-ambiental, estando presentes na gastronomia, economia, comércio de pérolas e ecologia. Este grupo de invertebrados possui grande importância sob a ótica da saúde pública, pois são responsáveis pela transmissão de importantes agentes infecciosos de humanos e animais (MÜLLER et al., 1998 ; KATZ; ALMEIDA, 2003).

Constitui o segundo maior grupo zoológico sendo representado por aproximadamente 100 mil espécies viventes e 70 mil espécies fósseis. São indivíduos de grande capacidade adaptativa sendo a maioria das espécies marinhas (MILLIDGE, 1998). Os estudos envolvendo o período em que surgiram ainda não estão completamente elucidados, porém acredita-se que sua existência data de cerca de 570 milhões de anos, coincidindo com o período Cambriano (COLLEY et al., 2012). De origem monofilética, diversas são as hipóteses sobre a evolução deste filo, acreditando-se que descendem de um ancestral acelomado semelhante a um platelminto tubelário; outra hipótese é que seu ancestral seria um indivíduo celomado, porém com corpo segmentado semelhante a um anelídeo; ou que descendem de uma espécie celomada, mas não metamerizada.

Suas sinapomorfias, caracteres compartilhados por dois ou mais táxons, são: presença de manto com espículas calcárias, rádula, pé com músculos retratores pares, brânquias bipectinadas e sistema nervoso tatraneuro (dois pares de cordões nervosos) (COLLEY, 2012).

### 2.8.1- Classe Gastropoda (Cuvier, 1797)

Segundo o Ministério da Saúde (2008), a Classe Gastropoda reúne o grupo de moluscos de maior importância médica-veterinária, pois incluem os moluscos envolvidos na transmissão de importantes doenças de saúde pública.

Morfologicamente as características embrionárias desta classe são: celomados, triblásticos, protostômios e com simetria bilateral. Apresentam torção da massa visceral (giro de 180°) durante o desenvolvimento embrionário, presença de rádula (dentes quitinosos móveis dispostos em séries), sistema circulatório aberto, respiração branquial, pulmonar ou tegumentar, tubo digestivo completo, cavidade palial, massa cefalopodal, músculo columelar, concha univalva e espiralar. Nos caracteres biológicos apresentam como formas de reprodução o sistema de hermafroditismo ou dioico com fecundação externa, o desenvolvimento pode ser direto ou indireto, sendo o direto por oviviparidade, oviparidade e viviparidade. Seu hábitat é variável, mas em geral é marinho, límnic ou terrestre (BRUSCA; BRUSCA, 2007).

Gastropoda é a classe mais bem sucedida dentro do filo Mollusca, contendo três subclasses: Pulmonata, Opisthobranchia e Prosobranchia. Dentro dos Prosobranquios as principais famílias de importância são: Ampullariidae, Thiaridae e Hydrobiidae. A subclasse Pulmonata engloba três principais ordens:

- Stylommatophora: moluscos terrestres, principais representantes: Achatinidae (Swainson, 1840), Strophocheilidae (Pilsbry, 1902), Bradybaenidae (Pilsbry, 1934), Subulinidae (Fischer; Crosse, 1877) e Helicidae (Rafinesque, 1815).

- Systelommatophora: moluscos sem conchas, principais representantes: Veronicellidae (Gray, 1840) e Onchidiidae (Rafinesque, 1815);

- Basommatophora: ordem com maior número de indivíduos com importância médica-veterinária: Physidae, Limnaeidae, Planorbidae e Ancyliidae (LEME, 2005).

As subclasses Pulmonata e Prosobranchia incluem espécies hospedeiras intermediárias de helmintos parasitas do homem e de vários animais. O fenômeno da adaptabilidade dos trematódeos da subclasse Digenea aos seus hospedeiros intermediários apresenta, de maneira geral, alta especificidade, visto que na maioria das espécies de parasitos, o hospedeiro intermediário adequado situa-se num único gênero ou acha-se restrito a uma única espécie de molusco, ou mesmo a determinadas linhagens geográficas (BARBOSA, 1995).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1- Local do estudo

O estudo foi realizado em propriedades equestres da microrregião de Itaguaí, localizada na mesorregião metropolitana do Rio de Janeiro. Segundo o IBGE (2010) esta microrregião é compreendida por três municípios: Itaguaí (22°51'08'' latitude Sul; 43°46'31'' longitude Oeste; altitude: 13 metros), Seropédica (22°44'38'' latitude Sul; 43°42'27'' longitude Oeste; altitude 26 metros) e Mangaratiba (22°57' 36" latitude Sul; 44°02'27'' longitude Oeste; altitude 18 metros).

A amostragem de exemplares de moluscos límnicos foi realizada de forma não probabilística por conveniência em propriedades localizadas nesta região de estudo, e após consentimento do responsável pela propriedade, as amostras foram coletadas. Foram avaliadas treze propriedades na microrregião de Itaguaí em áreas em que era conhecida a soropositividade de equinos para *N. risticii* (ROIER, 2011) no período de Janeiro a Maio de 2013. Em cada local de coleta a altitude foi registrada e os pontos georreferenciados com a utilização de receptores de Sistema de Posicionamento Global (GPS). O sistema de referência utilizado foi *GPS eTrex 30* (Garmin®).

#### 3.2- Classificação do tipo de criadouro

Foram mensurados os tipos de criadouros observados nos locais de coleta dos moluscos do estudo de acordo com a Resolução da CONAMA (2005), que define como habitat ou ambiente que apresentem corpos d'água de duas formas: lânticos, que apresenta massas d'água sem correnteza, ou lóticos, como o ambiente com massas d'águas em movimento ou correnteza. Além desta classificação foi observado também a classificação adaptada de Miyahira (2009) que propôs uma diferenciação nos diferentes habitat de grupos de moluscos límnicos (Quadro 1).

Quadro 1: Classificação do tipo de criadouro habitado por moluscos límnicos presentes nas propriedades criadoras de equinos da microrregião de Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro, adaptado de Miyahira (2009).

Criadouro	Descrição
Riacho, córrego	Ambiente lótico, volume pequeno de água, corpo d'água perene ou não com menos de quatro metros de largura.
Lagoa	Ambiente lântico, com grande volume de água contendo corpo d'água perene. Em geral é menor que um lago.
Lago	Ambiente lântico, com grande volume de água contendo corpo d'água perene. Em geral apresentam grandes dimensões.
Piscina/Tanque	Ambiente lântico, artificial com pouco volume de água.

#### 3.3 Tamanho da amostra de caramujos

Para a determinação do tamanho da amostra de caramujos foi estabelecido o grau de confiança de 95%, prevalência esperada de 50% e margem de erro de 5%. O

número mínimo de amostras de caramujos na microrregião foi de 384 amostras, segundo a equação descrita por Sampaio (2002) a seguir:

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

onde: n = tamanho da amostra; Pesp = prevalência esperada;  $d^2$  = precisão absoluta desejada.

### **3.4- Coleta e identificação dos moluscos e fases larvais de trematódeos**

Em cada propriedade selecionada para o estudo foi realizada uma busca ativa nas áreas de pastagem dos animais a procura de lagos, rios, riachos, açudes e bebedouros artificiais que servissem de fonte de água para os animais. Os moluscos foram capturados, através de um puçá adaptado com tela fina de 2 mm (figura 1). Após as coletas, os exemplares colhidos foram acondicionados em recipientes plásticos contendo água do próprio local aonde estes foram obtidos e transportados para o Laboratório de Hemoparasitos e Vetores da Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz localizado na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, onde foram previamente separados por gênero, posterior a esta separação destinou-se 10% do total coletado de cada gênero para identificação em nível de espécie no Laboratório de Referência Nacional em Malacologia do Instituto Oswaldo Cruz/ Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro (LRNM/IOC/FIOCRUZ-RJ). A identificação taxonômica foi realizada a partir da conquiologia e dissecções anatômicas (Muller,1774; Perry,1810; D'orbigny,1835; D'orbigny,1835; Dunker,1848; Linnaeus, 1758; Stimpson, 1865).

Para a pesquisa de trematódeos, os espécimes foram colocados separadamente em frascos de vidro transparente, sob superfície coberta por papel alumínio (capacidade de 10 ml) com 4 ml de água (desclorada) e expostos à luz de lâmpadas incandescentes (60W) a uma distância de 30 cm, durante 6 horas (figura 3A ). Os ampuláriídeos foram colocados em frascos maiores com aproximadamente 40 ml. Este procedimento de exposição à luz fornece uma temperatura entre 28-30° C, capaz de estimular a emissão cercariana. Para a visualização das cercárias nos frascos foi utilizado o microscópio estereoscópio (Nikon®) (figura 3B). Os espécimes que não eliminaram cercárias, após exposição à luz foram mantidos no escuro até o dia seguinte, após a troca da água contida no recipiente de armazenagem do molusco, sendo reexaminados pela manhã do dia seguinte. Este procedimento permite verificar se o molusco possui alguma forma larval de trematódeos com hábitos noturnos (COUTINHO, 1950).

Após exposição à luz, os moluscos foram retirados da concha utilizando-se martelo e de forma mecânica a parte mole foi retirada e seccionada em quatro divisões anatômicas: complexo glândula digestiva-gônadas, glândula digestiva, massa cefalopodal e cavidade respiratória. Os exemplares menores foram retirados da concha pelo método de fervura (80-100° C) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

As cercárias foram fixadas utilizando Formoldeído P.A quente (1:5), Álcool – Formalina (1:93) - Ácido acético (AFA) (1:2) quente e AFA fria, sendo coradas pela hematoxilina de Delafield (BANCROFT; STEVENS, 2008), no Laboratório de Biologia e Ecologia de Helminhos do Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia/UFRRJ recolhidos e analisados para posterior identificação.

Para determinação do grupo a que pertenciam as cercárias utilizou-se dados morfométricos, através do microscópio óptico Eclipse E20 (Nikon®) utilizando-se o Software Celd e biológicos através de comparação com descrições disponíveis na literatura (FREITAS 1977; SCHELL, 1985 apud BOGÉA et al., 2005; PINTO, 2009; VERGARA; VELASQUEZ, 2009; PINTO; MELO, 2010). Posteriormente as larvas

foram classificadas para fins de diferenciação em morfotipo 1, morfotipo 2, morfotipo 3, morfotipo 4 e morfotipo 5. Os morfotipos foram caracterizados de acordo com a espécie de molusco em que a larva foi encontrada e com relação ao seu tipo cercarial, baseado em Coimbra et al. (2006) (adaptado). Desta forma, os morfotipos 1 e 2 são descritos como larvas obtidas de *Melanooides tuberculata*, morfologicamente o morfotipo 1 apresenta o corpo alongado e cauda simples e o morfotipo 2 possui o corpo menor, cauda simples e manchas oclares. Em ambos foi possível visualizar as ventosas oral e ventral. Morfotipo 3 e 4 foram obtidos de *Biomphalaria tenagophila*, sendo o morfotipo 3 maior em comprimento quando comparado ao morfotipo 4, no entanto ambos apresentaram cauda bifurcada. Morfotipo 5 foi encontrado em moluscos da família Hydobriidae, apresentam manchas oclares, cauda simples, não sendo observadas ventosas oral e ventral.



Figura 1: Coleta de moluscos límnicos utilizando puçá adaptado com malha fina de 2 mm.



Figura 2: Moluscos embalados e enviados ao Laboratório de Malacologia/IOC/FIOCRUZ-RJ para identificação.





Figura 3A: Exposição dos moluscos a luz para pesquisa de trematódeos; 3B: Visualização da água após a exposição.

Os exemplares de moluscos foram organizados em pools, contendo 10 espécimes, e sendo organizado conforme o gênero taxonômico, a origem do criadouro coletado e o número de espécimes obtidos do mesmo *taxon*. Para proceder a extração de DNA, as amostras de moluscos foram previamente maceradas com bastões de vidro de forma que se tornassem um homogenato. Após a maceração pesou-se em balança de precisão um valor aproximado de 10-15 mg conforme preconiza o protocolo de extração com kit comercial (Wizard® Genomic DNA Purification Kit from tissue- Promega®) (anexo III). Os procedimentos de extração de DNA foram realizados conforme instruções do fabricante.

Após extração, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoDrop® 2000) para visualização do nível de pureza do DNA. Três alíquotas com 100ng/μl foram realizadas no intuito de evitar o congelamento e descongelamento da amostra, visto que tal procedimento minimiza a degradação do DNA em virtude das variações de temperatura. O DNA total foi armazenado em freezer -80°C e as alíquotas foram armazenadas em freezer -20°C até o momento das análises moleculares.

Exemplares de cercárias obtidos dos moluscos foram acondicionados em 2 ml de água destilada e dispostos em microtubos, sendo então crioarmazenados em freezer -80°C. Para o preparo das amostras, os tubos foram centrifugados a 6.000 x g por 4 minutos, e o material contido no fundo foi então utilizado no protocolo de extração de DNA, através de kit comercial (Wizard® Genomic DNA Purification Kit from tissue-Promega®) (anexo IV) seguindo recomendações do fabricante.

Após extração, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoDrop® 2000). Três alíquotas com 100ng/μl foram realizadas no intuito de evitar o congelamento e descongelamento da amostra, visando minimizar o efeito da temperatura na integridade do DNA. Após quantificação, amostras do DNA total e das alíquotas foram armazenadas em freezer -80°C, até o momento das análises moleculares.

### 3.5 Diagnóstico molecular de *Neorickettsia risticii* em moluscos e trematódeos por PCR em tempo real (qPCR)

As amostras de DNA dos caramujos e das cercárias foram analisadas por qPCR com alvo na amplificação de um fragmento de 85bp do gene 16S RNA-ribossômico para a espécie *N. risticii*, os *primers* utilizados foram ER 133f e 54r e sonda ER.77.p.

As reações foram realizadas usando o sistema de PCR em Tempo Real StepOnePlus® instrumento (Applied Biosystems). O “*Threshold*” foi padronizado entre as placas e foi atribuído manualmente três ciclos após a fluorescência de base. As amostras que apresentaram o ciclo de quantificação (Cq) menor ou igual a 40 ciclos foram consideradas positivas. Para esta análise foram utilizados os *primers* 133f (5'-GTTATTCCCTACTACCAGGCAAGTTC-3') e 54r (5'-AACGGAATCAGGGC TGCTT-3') e sonda (5'ACGCACCCGTCTGCCACGGGA 3') (PUSTERLA et al., 2000) marcadas com *reporter dye* FAM na extremidade 5' e o *quencher* TAMRA na extremidade 3'. O volume final da reação foi de 20 µl contendo: 10µL TaqMan® (1X), 0,6 µM de cada primer, 0,2 µM de sonda e 100ng de DNA total. As condições de termociclagem foram: 2 minutos a 50°C, desnaturação, 10 minutos a 95°C e 45 ciclos com desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento-extensão a 60°C por 1 minuto.

### **3.5.1- Controle Positivo**

Foi obtido a partir de cultura de célula DH 82 infectadas com *N. risticii*, fixadas em lâminas de vidro preparadas para imunofluorescência indireta (Fuller Laboratories, CA, USA). A lâmina foi raspada e o conteúdo foi eluído em solução de PBS, posteriormente realizou-se a extração de DNA utilizando o Dneasy Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), conforme recomendações do fabricante.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Detecção Molecular de *Neorickettsia risticii* em moluscos e trematódeos

Dos 410 moluscos analisados (Comp. GO-GD, MC, GO e R), não foi detectada a amplificação do DNA-alvo de *N. risticii*, através do sistema TaqMan, da qPCR.

Da mesma forma, também não foi observado a amplificação do DNA-alvo de *N. risticii* no total de 5 amostras de DNA de larvas de trematódeos obtidos destes moluscos coletados (figura 4).

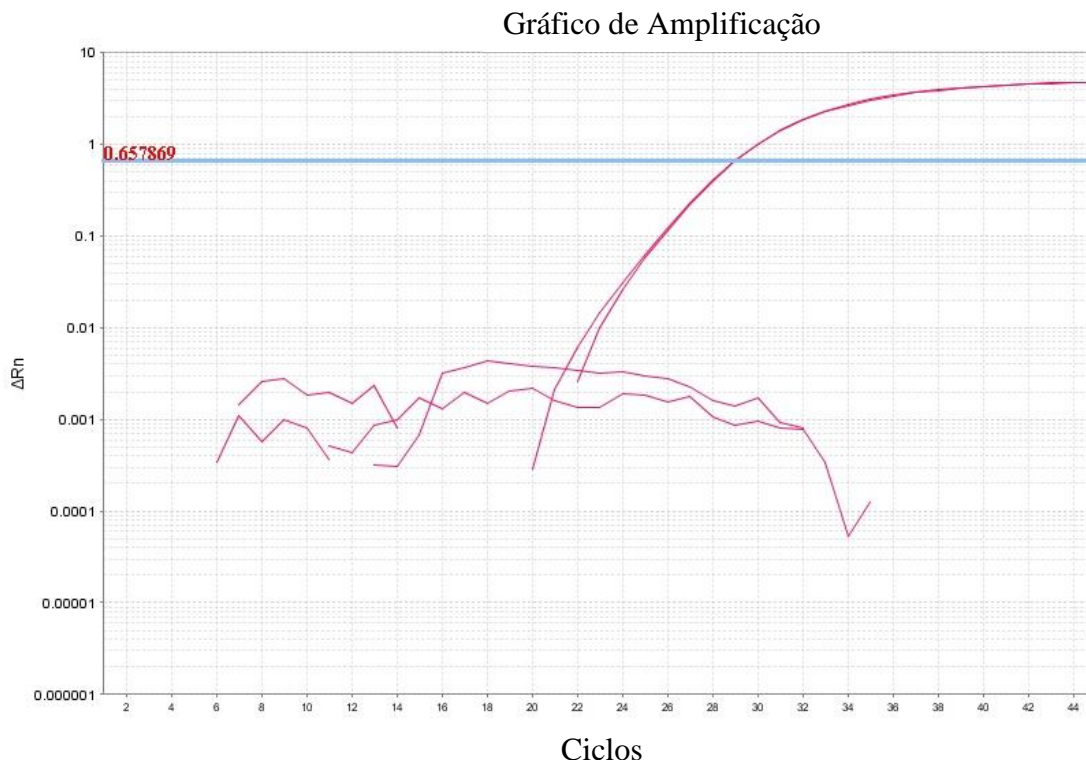


Figura 4: Curvas com padrões de amplificação do fragmento de 85 pb do gene *16S rRNA* de *N. risticii* em amostras de moluscos e fases larvais de trematódeos, obtidas pela PCR em tempo real utilizando o sistema TaqMan. Duas curvas deslocadas à esquerda: controle positivo.

### 4.2 Malacofauna

Foram coletados 410 moluscos límnicos provenientes de treze propriedades com criações de equinos na microrregião de Itaguaí. Os espécimes foram identificados nos seguintes táxons: *Melanoides tuberculata* (Muller,1774), *Pomacea* (Perry, 1810), *Drepanotrema anatinum* (d'Orbigny,1835), *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny,1835), *Biomphalaria straminea* (Dunker,1848), *Physa acuta* (Linnaeus, 1758) e Família Hydobriidae (Stimpson, 1865) (Figura 5).



**Figura 5:** Diferentes espécimes de moluscos límnicos presentes nas propriedades equestres da Microrregião de Itaguaí/RJ. A) *Pomacea* sp. B) *Physa acuta* C) *Melanoides tuberculata* D) *Biomphalaria* sp. E) *Drepanotrema anatinum* F) Família Hydrobiidae.

Dentre as espécies identificadas, *Melanoides tuberculata*, foi a mais frequente com 71,7% (n=294/410), seguido de *Pomacea* com 10,97% (n=45/410). *Biomphalaria straminea* foi à espécie menos frequente, com apenas um exemplar coletado (Tabela 1).

**Tabela 1:** Total de moluscos límnicos coletados de janeiro a maio de 2013 nas propriedades equestres da Microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.

Molusco	Total	%
<i>Melanoides tuberculata</i>	294	71,70%
<i>Pomacea</i>	45	10,97%
<i>Drepanotrema anatinum</i>	15	3,65%
<i>Biomphalaria tenagophila</i>	27	6,58%
<i>Biomphalaria straminea</i>	1	0,24%
<i>Physa acuta</i>	23	5,60%
Família Hydrobiidae	5	1,25%
Total	410	100%

Foi observado que *Melanoides tuberculata* ocorreu em todos os municípios analisados (Tabela 2) e *Biomphalaria straminea* e *Physa acuta* foram observados somente no município de Itaguaí. Da mesma forma, *Drepanotrema anatinum* e espécimes de Hydrobiidae foram somente observados no município de Mangaratiba.

**Tabela 2:** Percentual dos espécimes de moluscos coletados nos municípios da Microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro, no período de janeiro a maio de 2013.

Molusco	Seropédica	%	Itaguaí	%	Mangaratiba	%	Total
<i>Melanoides tuberculata</i>	234	79,59	26	8,84	34	11,56	294
<i>Pomacea</i>	28	62,22	17	37,77	-	-	45
<i>Drepanotrema anatinum</i>	-	-	-	-	15	100	15
<i>Biomphalaria tenagophila</i>	-	-	11	40,74	16	59,25	27
<i>Biomphalaria straminea</i>	-	-	1	100	-	-	1
<i>Physa acuta</i>	-	-	23	100	-	-	23
Família Hydobriidae	-	-	-	-	5	100	5
Total	262		78		70		410

Na tabela 3 estão demonstradas as frequências de cada espécie de molusco coletada, de acordo com o tipo de criadouro observado nos locais de coleta. Foi possível observar que 92,18% (n=271/294) da espécie *M. tuberculata* foi obtida em riachos, e apenas 7,82% (n= 23/294) em lagos. Em contrapartida, espécimes do gênero *Pomacea* foram em sua maioria obtidos de lagos (60%, n=27/45), seguido de riachos (20%, n=9/45). Exemplares de *Drepanotrema anatinum* e de Hydobriidae foram obtidos somente de criadouros do tipo “córregos”. Da mesma forma, todos os exemplares de *Biomphalaria straminea* foram obtidos do criadouro tipo “tanque d’água”. Vale destacar que alguns exemplares de *Biomphalaria tenagophila* foram obtidos de criadouros do tipo “piscina” (33%, n=9/27).

**Tabela 3:** Frequência de moluscos encontrados nos diferentes tipos de criadouros presentes nas propriedades da Microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.

Molusco	(N)	Criadouros (%)					
		Riacho	Córrego	Lago	Lagoa	Piscina	Tanque
<i>Melanoides tuberculata</i>	294	92,18	-	7,82	-	-	-
<i>Pomacea</i>	45	20,00	-	60,00	17,78	-	2,22
<i>Drepanotrema anatinum</i>	15	-	100,00	-	-	-	-
<i>Biomphalaria tenagophila</i>	27	7,41	59,26	-	-	33,33	-
<i>Biomphalaria straminea</i>	1	-	-	-	-	-	100,00
<i>Physa acuta</i>	23	86,36	-	-	-	-	13,64
Família Hydobriidae	5	-	100,00	-	-	-	-
TOTAL	410	73,65	8,78	12,19	1,95	2,19	1,21

Foi possível observar que a frequência de moluscos coletados variou conforme o tipo de criadouro observado nas propriedades, e de acordo com o município de origem (Tabela 4). Foi possível perceber que *Melanoides tuberculata* foi mais frequente em riacho (99,14%), quando coletados no município de Seropédica, mas quando coletados em Itaguaí, a maior frequência foi observada em lagos (80,76%). Contudo, para o gênero *Pomacea*, foi possível observar que independente do município de coleta, a maior frequência de coleta ocorreu em criadouros do tipo “lago”.

**Tabela 4:** Frequência de moluscos encontrados nos diferentes tipos de criadouros nas propriedades dos municípios de Itaguaí, Seropédica e Mangaratiba, estado do Rio de Janeiro.

Molusco	Município								
	Itaguaí (N=78) (%)				Mangaratiba (N=70) (%)		Seropédica (N=262) (%)		
	Riacho	Piscina	Lago	Tanque	Córrego	Riacho	Lago	Lagoa	Riacho
<i>M. tuberculata</i>	19,23	-	80,76	-	-	100	0,86	-	99,14
<i>Pomacea</i>	41,17	-	52,94	5,88	-	-	71,43	28,57	-
<i>D. anatinum</i>	-	-	-	-	100	-	-	-	-
<i>B. tenagophila</i>	18,18	81,81	-	-	100	-	-	-	-
<i>B. straminea</i>	-	-	-	100	-	-	-	-	-
<i>P. acuta</i>	82,60	-	-	17,04	-	-	-	-	-
Hydrobiidae	-	-	-	-	100	-	-	-	-

De cada propriedade destinou-se 10% dos espécimes coletados para identificação e depósito na Coleção de Moluscos do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ – RJ onde cada táxon depositado recebeu uma numeração (Tabela 5).

**Tabela 5:** Coordenadas de localização do criadouro, identificação e número de depósito na Coleção de Moluscos do Instituto Oswaldo Cruz (LRNM) dos táxons coletados na Microrregião de Itaguaí/RJ, no período de janeiro a maio de 2013.

Município	Criadouro	Coordenadas	Identificação	Nº CMIOC*
Seropédica	Riacho	S 22°45'70.9''	<i>Melanooides tuberculata</i>	8260
		W 43°45'41.5''		
Seropédica	Lagoa	S 22°45'58.9''	<i>Pomacea</i>	8261
		W 43°44'67.5''		
Itaguaí	Riacho	S 22°48'49.2''	<i>Pomacea</i>	8262
		W 43°43'28.4''		
Itaguaí	Lago	S 22°48'49.2''	<i>Melanooides tuberculata</i>	8263
		W 43°43'28.4''		
Itaguaí	Tanque de piscicultura desativado	S 22°49'47.6''	<i>Physa acuta</i>	8264
		W 43°44'16.3''		
Itaguaí	Tanque de piscicultura desativado	S 22°49'47.6''	<i>Biomphalaria straminea</i>	8265
		W 43°44'16.3''		
Itaguaí	Tanque de piscicultura desativado	S 22°49'47.6''	<i>Pomacea</i>	8266
		W 43°44'16.3''		
Itaguaí	Riacho	S 22°49'21.9''	<i>Physa acuta</i>	8267
		W 43°44'06.5''		

**Tabela 5.**  
Continuação

Itaguaí	Riacho	S 22°49'21.9'' W 43°44'06.5''	<i>Pomacea</i>	8268
Itaguaí	Riacho	S 22°49'54.2'' W 43°43'81.4''	<i>Melanooides tuberculata</i>	8269
Itaguaí	Riacho	S 22°49'00.2'' W 43°44'18.6''	<i>Biomphalaria tenagophila</i>	8270
Mangaratiba	Córrego	S 22°56'74.6'' W 44°04'47.3''	Hydrobiidae(família)	8271
Mangaratiba	Córrego	S 22°57'22.4'' W 44°05'24.1''	Hydrobiidae (família)	8272
Mangaratiba	Córrego	S 22°57'22.4'' W 44°05'24.1''	<i>Biomphalaria tenagophila</i>	8273
Seropédica	Lago	S 22°45'93.2'' W 43°41'52.0''	<i>Pomacea</i>	8274
Seropédica	Lago	S 22°45'78.0'' W 43°41'75.1''	<i>Pomacea</i>	8275
Seropédica	Lago	S 22°45'78.0'' W 43°41'75.1''	<i>Melanooides tuberculata</i>	8276

\*Número do molusco depositado na Coleção de Moluscos do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz (CMIOC).

### 4.3 Trematódeos

Em relação aos moluscos coletados, 3,17% (n=13/410) encontraram-se parasitados por larvas de trematódeos. E das espécies de moluscos analisadas, apenas *Biomphalaria tenagophila*, *Melanooides tuberculata* e membros da família Hydrobriidae encontravam-se naturalmente parasitados. *Biomphalaria tenagophila* foi a espécie que apresentou maior frequência de parasitismo por trematódeos em relação às demais espécies (Tabela 6).

**Tabela 6:** Frequência de moluscos naturalmente infectados por trematódeos coletados em diferentes criadouros nas propriedades criadoras de equinos na microrregião de Itaguaí/RJ.

Molusco	Criadouro	Total de Moluscos	Total de Moluscos parasitados	Taxa de parasitismo (%) por Trematódeos
<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Riacho	27	7	25,92%
<i>Melanooides tuberculata</i>	Riacho	294	5	1,70%
Hydrobriidae	Córrego	5	1	20%

Alem disso, foi possível observar que, de acordo com o município de coleta, a maior frequência de moluscos parasitados por trematódeos ocorreu em Itaguaí, com 6,41% (n=5/78), seguido de Mangaratiba, com 4,28% (n=2/70) (Tabela 7).

**Tabela 7:** Frequência de moluscos naturalmente infectados por trematódeos nos municípios que compõem a Microrregião de Itaguaí/RJ, coletados de janeiro a maio de 2013.

Município	Criadouro	Total de moluscos por município	Total de moluscos parasitados por trematódeos	Frequência de moluscos parasitados por trematódeos (%)
Itaguaí	Riacho	78	5	6,41%
Mangaratiba	Córrego	70	3	4,28%
Seropédica	Riacho	262	5	1,90%

De cada molusco parasitado foram identificados os estágios de desenvolvimento dos trematódeos, sendo detectada a presença de rédia, cercária e metacercária (figura 6A, 6B, 6C, 6D) na glândula digestiva e na massa cefalopodal destes moluscos. Dentre os tiarídeos foi possível observar a presença de dois morfotipos, o morfotipo 1, caracterizado como pertencente ao grupo *Megalourous cercariae*, que apresentou frequência de 1,14% dos moluscos parasitados. Deste morfotipo, observou-se que, com relação aos dados morfométricos, as rédias apresentaram  $1.197,2 \pm 170,7 \mu\text{m}$  de comprimento e  $183,1 \pm 68 \mu\text{m}$  de largura. As cercárias apresentaram  $309,7 \pm 71,08 \mu\text{m}$  de comprimento e  $85 \pm 48,3 \mu\text{m}$  de largura. Ao analisar as ventosas orais destes exemplares, observou-se  $52,5 \pm 6,5 \mu\text{m}$  de comprimento e  $58,7 \pm 17,4 \mu\text{m}$  de largura. Já as ventosas ventrais apresentaram  $43,4 \pm 14,4 \mu\text{m}$  de comprimento e  $56,2 \pm 23 \mu\text{m}$  de largura. A cauda dos exemplares analisados apresentou  $46,08 \pm 1,0 \mu\text{m}$  de comprimento por  $21,9 \pm 1,8 \mu\text{m}$  de largura. A forma de metacercária foi observada uma única vez e possuía forma piriforme e sua principal característica é o rápido encistamento, ocorrendo em torno de uma hora. Suas dimensões foram de  $216 \mu\text{m}$  de comprimento e  $170,76 \mu\text{m}$  de largura.

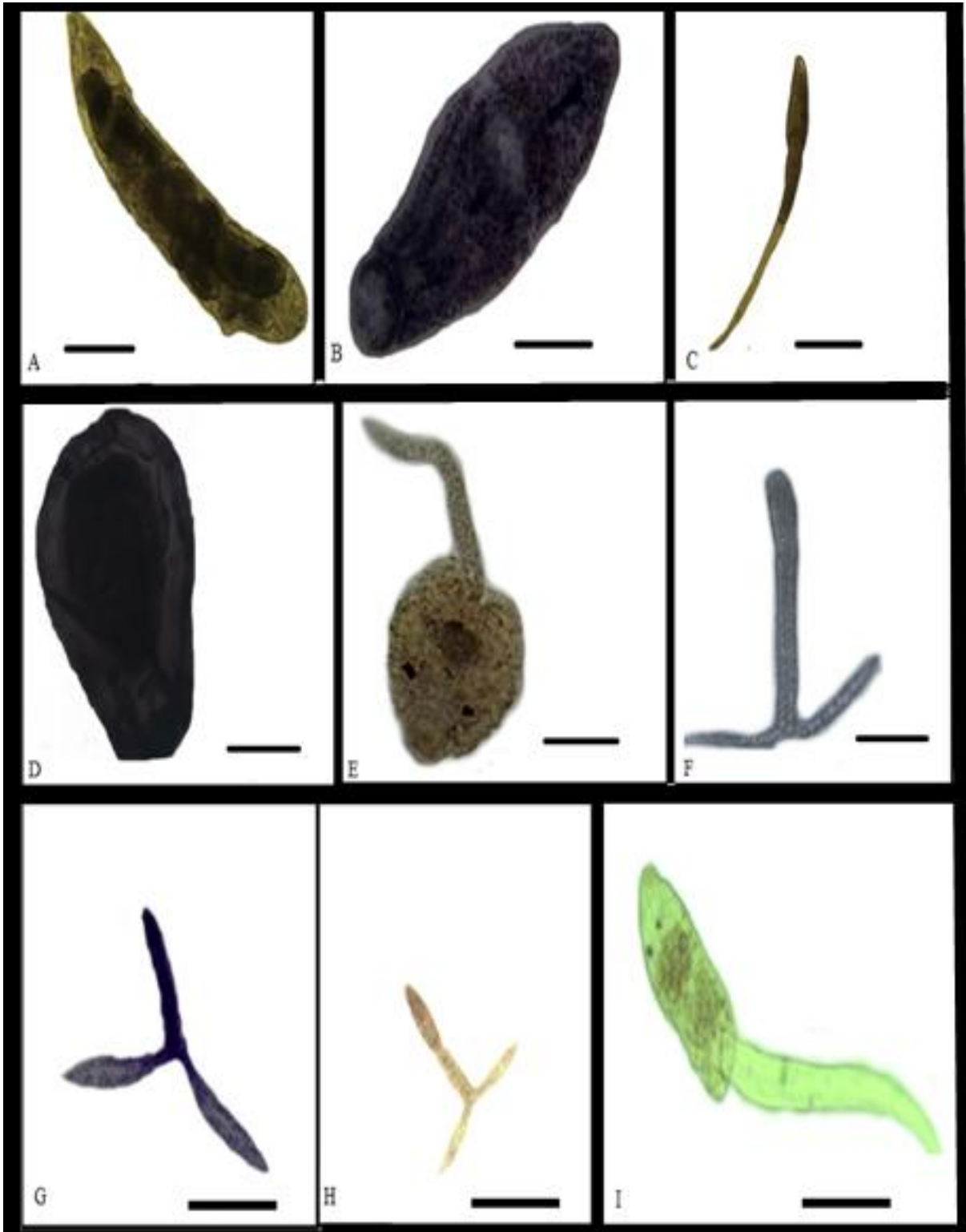
O morfotipo 2, caracterizado como pertencente ao grupo *Pleurolophocercous cercariae*, (figura 6E) foi encontrado parasitando espécimes de *M. tuberculata* numa frequência de 0,76%. Não foi observado a presença de rédia e metacercária nestes morfotipo. As cercárias observadas apresentaram  $174,3 \pm 4,2 \mu\text{m}$  de comprimento e  $88,0 \pm 1,3 \mu\text{m}$  de largura, ventosa oral com  $16,6 \pm 1,6 \mu\text{m}$  de comprimento e ventosa ventral com  $20,6 \pm 3,5 \mu\text{m}$  de comprimento foi possível observar a presença de manchas oclares tendo o ocelo direito  $6,3 \pm 1,0 \mu\text{m}$  e o esquerdo  $5,7 \pm 0,2 \mu\text{m}$  de comprimento e cauda com  $101,8 \pm 7,9 \mu\text{m}$  de comprimento e  $7,9 \pm 3,5 \mu\text{m}$  de largura.

O morfotipo 3 (figura 6F) foi obtido de *Biomphalaria tenagophila* e as cercárias foram caracterizadas como *Furcocercous cercariae*. Suas dimensões foram:  $154,8 \pm 72,3 \mu\text{m}$  de comprimento,  $37,8 \pm 27,0 \mu\text{m}$  de largura e cauda  $125,7 \pm 3,1 \mu\text{m}$  de comprimento por  $18,8 \pm 0,3 \mu\text{m}$  de largura. A distância de uma cauda a outra foi de  $57,5 \pm 3 \mu\text{m}$ .

O morfotipo 4 (figura 6G, 6H) corresponde a cercárias coletadas de *Biomphalaria tenagophila* e também foi classificada como *Furcocercous cercariae*. Suas dimensões foram:  $141,3 \pm 63,8 \mu\text{m}$  de comprimento por  $19,4 \pm 0,6 \mu\text{m}$  de largura e cauda direita com  $122,5 \pm 1,1 \mu\text{m}$  de comprimento por  $21,4 \pm 2,4 \mu\text{m}$  de largura e cauda esquerda com  $118,5 \pm 9,0 \mu\text{m}$  de comprimento por  $19,8 \pm 1,3 \mu\text{m}$  de largura. A distância de uma cauda a outra foi de  $41,2 \pm 1,1 \mu\text{m}$ .

Morfotipo 5 (Figura 6I) foi observado de moluscos da família Hydobriidae, e devido suas dimensões muito pequenas, não foi possível realizar a técnica de Delafield para corar e medir o espécime, sendo somente obtida por meio de fotografia.





**Figura 6.** Diferentes espécimes larvais obtidos de moluscos límnicos naturalmente infectados nas propriedades da Microrregião de Itaguaí- RJ. Visualizados por microscopia óptica. (A) Rédia de *Megalourous cercariae* (aumento de 100X); (B) Cercária sem cauda de *Megalourous cercariae* (corada por hematoxilina, escala: 50  $\mu$ m); (C) Cercária com cauda de *Megalourous cercariae* (aumento de 200X); (D) Metacercária de *Megalourous cercariae*, escala: 50  $\mu$ m; (E) Cercária de *Pleurolophocercous cercariae* (corada por hematoxilina, escala 50  $\mu$ m); (F) *Furcocercous cercariae* 1 (aumento de 200X); (G) *Furcocercous cercariae* 2 (corada por hematoxilina, escala 50  $\mu$ m); (H) *Furcocercous cercariae* 2 (aumento de 200X); (I) Cercária 5 (aumento de 200X)

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1- Detecção Molecular de *N. risticii* em moluscos e trematódeos

No presente estudo, não foi observado a ocorrência de amplificação do gene-alvo para *Neorickettsia risticii* nas amostras de caramujos e morfotipos cercariais. Apesar deste resultado, é importante destacar que algumas destas espécies apresentam potencial em albergarem *N. risticii* e conseqüentemente participarem do ciclo da erliquiose monocítica equina (COIMBRA et al., 2006; PUSTERLA et al., 2013). Vale destacar que, nesta área do estudo, existem evidências sorológicas da circulação do agente etiológico (ROIER, 2011). Logo, é possível que esta bactéria esteja circulando em outros gêneros de caramujos, que não foram encontrados no estudo. Além disso, a baixa prevalência observada em outras regiões endêmicas para esta enfermidade nos moluscos demonstra que este resultado negativo na PCR, não descarta a possibilidade que as espécies de moluscos e trematódeos selecionados ao estudo sejam os hospedeiros deste agente na região. Em estudos realizados por Barlough et al. (1998), os autores encontraram aproximadamente 1% (n=180) dos moluscos, gênero *Juga*, parasitados através da *Nested* PCR, Pusterla et al. (2000) através da qPCR determinaram uma frequência de 10,7% (n= 234) de moluscos do gênero *Juga* com DNA-alvo para a bactéria. Pusterla et al. (2013) ao observarem um aumento no número de casos da EME em regiões próximas a um canal de irrigação de água em Nevada/Califórnia identificaram, através da qPCR, 0,7% (n=568) dos planorbídeos positivos para *N. risticii*.

Até o presente estudo não há relato de *N. risticii* em *Megalourous cercariae* e *Pleurolophocercous cercariae*. *Furcocercous cercariae* foi encontrado em 4,6% (n=429) dos moluscos do gênero *Semisulcospira*, no entanto foi possível observar fragmento de DNA-alvo para *N. risticii* (CHAE et al., 2003). O fato de *N. risticii* estar presentes em alguns tipos cercariais e ausentes em outros, pode estar relacionado a especificidade por tipos cercariais que contenham nutrientes ou outros componentes necessários à sua sobrevivência, como ocorre em diferentes relações de endossimbiose (FERRI et al., 2011). Greiman et al. (2013) em um estudo experimental, infectaram ovos de trematódeos da espécie *Plagiorchis elegans* (Bayer, 1954) com *N. risticii* e não obteve 100% de infecção na prole. Não há registros deste trematódeo infectado naturalmente por *N. risticii*, talvez estes resultados reforcem a ideia da especificidade que *N. risticii* possui por seu hospedeiro natural. Desta forma, a vigilância de caramujos potencialmente transmissores da EME na região estudada podem auxiliar como uma importante ferramenta para o monitoramento da doença.

Alguns fatores como a sazonalidade da doença, competência vetorial e a baixa frequência nos equinos podem ter influenciado no resultado obtido no estudo, contribuindo para a ausência do DNA de *N. risticii* nos moluscos estudados. Assim, as condições climáticas, e as mudanças das estações do ano podem influenciar na distribuição da doença, devido a influencia que o clima produz na biologia dos transmissores. O carácter sazonal dos casos de EME nos EUA foi reportado por Knowles et al. (1983), sendo de maior ocorrência nos meses mais quentes, entre agosto e novembro. Embora o período de coleta dos moluscos tenha sido realizado nos meses mais quentes do ano, é possível que devido as altas temperaturas da região de estudo possam ser um pouco diferenciadas, quando comparadas à regiões endêmicas da América do Norte.

O segundo fator é a competência vetorial, ou seja, capacidade intrínseca do vetor para infecção, replicação e transmissão. Esses fatores estão intimamente associados com

o número de barreiras anatômicas que determinam a eficiência da infecção no vetor. Isto inclui a susceptibilidade à infecção, ou seja, o desenvolvimento do patógeno, duração do período de incubação extrínseco e a eficiência da transmissão (GONÇALVES, 2010). Esta definição aplica-se a estudos envolvendo a capacidade vetorial de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) para o vírus da Dengue tipo 2. Porém, podemos pensar analogamente para os moluscos límnicos envolvidos na transmissão da EME presentes na microrregião de Itaguaí, talvez estes invertebrados possuam fraca competência vetorial seja por interferências morfológicas, bióticas ou abióticas.

O terceiro fator é a baixa frequência de *N. risticii* nos equinos da área analisada, pois estudos sorológicos no estado do Rio de Janeiro indicam soro positivities relativamente baixas (MOREIRA et al., 2013). Ainda é possível observar que reações sorológicas só nos demonstram que o animal esteve exposto a bactéria, mas se o animal desenvolveu a doença clínica, não é possível saber. O fato da EME não produzir fase crônica também dificulta a caracterização epidemiológica da doença e isto justifica muitas das vezes o fato de serem sorologicamente positivos e molecularmente negativos. Esta baixa frequência de *N. risticii* nos equinos reflete na dificuldade da detecção do agente no trematódeo e no molusco (PUSTERLA et al., 2003; REUBEL et al., 1998).

## 5.2- Malacofauna

Nos diversos trabalhos existentes sobre a fauna de moluscos límnicos no Brasil, estudos demonstram a presença das famílias Thiaridae, Ampullaridae, Planorbidae, Physidae e Hydrobiidae na microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro (THIENGO et al., 1998; THIENGO et al., 2001; THIENGO et al., 2004; THIENGO et al. 2006) bem como em diferentes regiões do Brasil como Minas Gerais, Rio Grande do Sul e São Paulo (VIDIGAL et al., 2005; MARTELLO et al., 2008; MOTA et al., 2012).

Em um levantamento malacológico na microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro não foi observado a presença das espécies *B. straminea*, *B. tenagophila* e *P. acuta* (THIENGO et al. 2001), este resultado difere ao observado no presente estudo. Além disso, outros estudos não demonstraram a presença de *M. tuberculata* e *Pomacea* no município de Seropédica, diferindo do presente estudo. A recente dispersão dos espécimes encontrados nestas regiões pode ser justificada pelo tipo de habitat, pois modificações podem ter ocorrido no ambiente, como a maior disponibilidade de nutrientes, brejos e outros criadouros naturais, pois estas variáveis podem proporcionar aos moluscos condições microclimáticas favoráveis, oferecendo proteção contra a radiação solar e altas temperaturas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). A interferência antrópica também pode ter contribuído para presença destes táxons nas regiões em questão, pois comumente observamos a criação de moluscos com peixes, já que atuam como ótimos bioindicadores da qualidade da água além de controlar a população de peixes comendo seus ovos, utilizando-se principalmente o gênero *Pomacea* sp. (ABÍLIO et al., 2009).

*Melanooides tuberculata* foi o único táxon presente nos três municípios. É considerada uma espécie invasora e foi introduzida no território nacional na década de sessenta (VAZ et al., 1986) apresentando hoje ampla distribuição (MARCO, 1999; PEREIRA, 2000; SANTOS et al., 2003; MIYAHIRA, 2009). Historicamente foi introduzido nas ilhas do Caribe de forma intencional para controlar biologicamente as espécies que atuam como hospedeiros da esquistossomose, pois competiriam com os planorbídeos fazendo-os se deslocar da região, no entanto nem sempre o controle

biológico ocorre com eficácia (COWIE, 2001) e os tiarídeos tornaram-se pragas se disseminando por toda América incluindo o Brasil.

Os tiarídeos representam ameaça à saúde humana, pois participam do ciclo e constituem um dos elos na cadeia de transmissão natural de *Paragonimus westermani* (Kerbert, 1878) e de *Clonorchis sinensis* (Cobbold, 1875), ambos patogênicos para o homem. O primeiro não tem possibilidade de instalar-se na microrregião de Itaguaí por falta do segundo hospedeiro intermediário. Já o mesmo não acontece com *Clonorchis* (VAZ et al., 1986).

O gênero *Pomacea* ainda não foi encontrado no município de Mangaratiba corroborando com outros autores (THIENGO et al., 2001). Não foi possível observar a presença de lagos, lagoas ou criadouros com fluxo de água parada neste município, talvez a ausência deste tipo de hábitat associado a presença de inimigos naturais constituem fatores de impedimento da implantação e colonização de novos biótopos na região (GUIMARÃES, 1981).

Só foi possível observar a presença de *D. anatinum* e Hydobriidae em córregos de Mangaratiba, o que é compatível com outros autores, pois estes indivíduos preferem ambientes com águas rasas, tendo como substrato o leito lodoso ou rochoso, e a vegetação enraizada ou flutuante (PARAENSE 1972).

A presença de moluscos Planorbídeos como *B. tenagophila* e *B. straminea*, também constituem fontes de risco a saúde pública, pois atuam como hospedeiros intermediários do trematódeo digenético *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907), agente etiológico da esquistossomose, na região do estudo a doença já foi relatada chegando a 14 o número de casos no meado da década de 90 (THIENGO et al., 2001).

A maior diversidade de espécimes está no riacho (73,65%) e córrego (8,7%) onde há pelo menos a presença de três táxons, esta diversidade de espécies em um ambiente está relacionada com a boa qualidade do mesmo, desta forma quanto maior a diversidade de espécies maior a estabilidade do ambiente (ABÍLIO et al., 2006).

### **5.2.1- Taxa de parasitismo de moluscos por trematódeos**

A taxa de parasitismo de trematódeos nos moluscos amostrados no presente estudo (3,17%) foi alto quando comparado com o percentual de 0,23% (n=2.954) encontrado por Eduardo et al. (2012) em moluscos límnicos de coleções hídricas de Santo André/ SP e baixo quando comparados com o percentual de 8,13% observado por Thiengo et al. (2001) em outras investigações na mesma microrregião e por Chontanarith e Wongsawad (2013) que observaram uma frequência de 17,27% em moluscos parasitados por larvas de trematódeos. No entanto, alguns fatores como temperatura, umidade, sazonalidade e perturbação antropogênia no habitat natural dos moluscos como lixiviação ou até mesmo a interrupção de um fluxo de água podem contribuir para a diminuição de hospedeiros definitivos no local o que diminui proporcionalmente o número de trematódeos no ambiente (PINTO, 2013).

### **5.3- Trematódeos**

Três diferentes famílias de moluscos límnicos, Thiaridae, Planorbidae e Hydobriidae encontraram-se naturalmente infectadas por fases larvais de trematódeos digenéticos, confirmando a participação destes moluscos límnicos como hospedeiros intermediários nos ciclos biológicos de trematódeos (PINTO; MELO, 2011; THIENGO, 2001; COIMBRA, 2005).

Em *M. tuberculata* foi possível observar dois morfotipos distintos, 1 e 2. Com relação ao morfotipo 1 as características morfométricas e biológicas encontradas no presente trabalho são compatíveis com outros estudos envolvendo infecção natural e experimental de *M. tuberculata* (VERGARA; VELASQUEZ, 2009; PINTO; MELO, 2010). De acordo com as medidas dos estágios larvais deste trematódeo podemos inferir que os mesmos pertencem ao grupo *Megalourous cercariae* (CORT, 1914). O grupo *Megalourous cercariae* é encontrado comumente na família Philophthalmidae e possui como hospedeiro intermediário *M. tuberculata* e hospedeiro definitivo aves e mamíferos. No Brasil, já detectou-se aves (*Gallus gallus*) (Linnaeus, 1758) naturalmente infectadas por indivíduos da família Philophthalmidae, sendo observado neste mesmo trabalho que os trematódeos adultos possuem tropismo pelos olhos do hospedeiro e que a principal forma de contaminação é a eliminação de ovos pelos olhos, ocorrendo desta forma a contaminação da água (PINTO, 2009). A presença deste tipo cercarial na área do estudo indica que este grupo pode ter distribuição em mais de uma área geográfica no Brasil, a presença de aves da ordem galiforme, na região do estudo, pode constituir fontes naturais de infecção para os tiarídeos.

O morfotipo 2 contém caracteres morfométricos e biológicos sugestivos ao grupo *Pleurolophocercous cercariae*, este grupo tem sido descrito nas famílias Acanthostomidae, Cryptogonimidae, Opisthorchiidae e Heterophyidae (SCHELL, 1985 apud BOGÉA et al., 2005). A família Heterophyidae já foi encontrada parasitando naturalmente aves e mamíferos como cães, gatos, macacos camundongos, hamsters, ratos e coelhos (HERNANDÉZ et al., 2003). No Brasil, formas larvais foram encontradas parasitando naturalmente *M. tuberculata*, porém o adulto só foi obtido por meio de infecção experimental em peixes (BOGÉA et al., 2005; PINTO ; MELO, 2010).

Os morfotipos 3 e 4 obtidos de *B. tenagophila* não foi possível classificá-las em um grupo cercarial, caracterizando-as somente como pertencentes ao tipo *Furcocercous cercariae* de acordo com chave taxonômica de Freitas (1977). Também não foi possível classificar o morfotipo 5 encontrado na família Hydobriidae.

Os trematódeos digenéticos comumente utilizam moluscos para completarem seus ciclos biológicos, no presente estudo pode-se observar a presença de cinco diferentes tipos cercariais, porém não foi possível realizar uma investigação mais aprofundada para encontrar o hospedeiro definitivo. O que indica a necessidade de continuação do presente estudo.

## 6 CONCLUSÕES

- Não foi possível determinar a participação de moluscos e trematódeos no ciclo da EME na Microrregião de Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro;

- Na área do estudo foi possível comprovar ampla diversidade de gêneros de moluscos límnicos em diferentes tipos de criadouros;

- *M. tuberculata* e *B. tenagophila* atuam como hospedeiros intermediários de *Megalourous cercariae*, *Pleurolophocercous cercariae* e *Furcocercous cercariae* na área do estudo.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABÍLIO, F.J.P.; FONSECA-GESSNER, A.A.; LEITE, R.L.; RUFFO, T.L.M. Gastrópodes e outros invertebrados do sedimento associados à macrófita *Eichhornia crassipes* de um açude hipertrófico do semi-árido paraibano. **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, v.1, p.165-178, 2006.
- ABÍLIO, F. J. P.; RUFFO, T. L. M.; SOUZA, A. H. F. F.; FLORENTINO, H. S.; JUNIOR, E. T. O.; MEIRELES, B. N.; SANTANA, A. C. D. Macroinvertebrados bentônicos como bioindicadores de qualidade ambiental de corpos aquáticos da caatinga. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, p. 397- 409, 2009.
- ANNE-VÉRONNIQUE, T.B.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M. RNA polymerase b-subunit-based phylogeny of *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Neorickettsia* spp. and *Wolbachia pipientis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 455-458, 2003.
- BAIRD, J.D.; ARROYO, L.G. Historical aspects of Potomac horse fever in Ontario (1924–2010). **Canadian Veterinary Journal**, n. 54, p. 565–572, 2013.
- BANCROFT, J.D.; STEVENS, A. **Theory and Practice of Histological Techniques**. New York, Churchill Livingstone, p. 725, 2008.
- BARBOSA, F. S. Relação molusco/parasita resistência e suscetibilidade à infecção por *Schistosoma mansoni* em caramujos do gênero *Biomphalaria*: Tópicos em malacologia médica. **Scielo Books**, 1995.
- BARLOUGH, J.E.; RIKIHISA, Y.; MADIGAN, J. E. Nested polymerase chain reaction for detection of *Ehrlichia risticii* genomic DNA in infected horses. **Veterinary Parasitology**, n. 68, p. 367-373, 1997.
- BARLOUGH, J.E.; REUBEL, G.H.; MADIGAN, J.E.; VREDEVOE, L.K.; MILLER, P.E.; RIKIHISA, Y. Detection of *Ehrlichia risticii*, the Agent of Potomac Horse Fever, in Freshwater Stream Snails (Pleuroceridae: *Juga* spp) from Northern California. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.2888-2893, 1998.
- BISWAS, B.; VEMULAPALLI, R.; DUTTA, S. Detection of *Ehrlichia risticii* from feces of infected horses by immunomagnetic separation and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n. 9, p. 2147-2151, 1994.
- BOGÉA, T.; CORDEIRO, F. M.; GOUVEIA, J. S. *Melanoides tuberculata* (Gastropoda: Thiaridae) as intermediate host of Heterophyidae (Trematoda: Digenea) in RIO DE JANEIRO Metropolitan area, Brazil. **Revista Instituto Medicina Tropical**, v. 47, n.2, p. 87-90, 2005.
- BRUSCA, R.C.; BRUSCA, G.J. 2007. **Invertebrados**. 2a.ed., Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 968p.

BURG, J.G.; ROBERTS, A.W.; WILLIAMS, N.M.; POWELL, D.C.; KNAPP, F.W. Attempted Transmission of *Ehrlichia risticii* (Rickettsiaceae) with *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 27, n. 5, 1990.

CARROLL, J. F.; SCHMIDTMANN, E. T.; RICE, R. M. White-footed Mice: Tick Burdens and Role in the Epizootiology of Potomac Horse Fever in Maryland. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 25, n. 3, p. 397-400, 1989.

CICUTTIN, G. L.; BOERI, E. J.; BELTRÁN, F. J.; DOHMEN, F. E. G. Molecular detection of *Neorickettsia risticii* in Brazilian free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*) from Buenos Aires, Argentina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 5, p.648-650, 2013.

CHAE, J. S.; KIM, E. H.; KIM, M. S.; KIM, M. J.; CHO, Y. H.; PARK, B. K. Prevalence and Sequence Analyses of *Neorickettsia risticii*. **New York Academy of Sciences**, n. 990, p. 248–256, 2003.

CHONTANANARTH, T.; WONGSAWAD, C. Epidemiology of cercarial stage of trematodes in freshwater snails from Chiang Mai province, Thailand. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n.3, p. 237-243, 2013.

COIMBRA, H.S.; SCHUCH, L.F.D.; VEITENHEIMER-MENDES, I.L.; MEIRELES, M.C.A. *Neorickettsia (Ehrlichia) risticii* no sul do Brasil: *Heleobia* spp. (Mollusca: Hydrobilidae) e *Parapleurolophoecous cercariae* (Trematoda: Digenea) como possíveis vetores. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.3, p.325-329, 2005.

COIMBRA, H.S.; FERNANDES, C.; SOARES, M.P. MEIRELES, M.C.A.; RADAMES, R.; SCHUCH, L.F.D. Erliquiose monocítica equina no Rio Grande do Sul: Aspectos clínicos, anátomo-patológicos e epidemiológicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, p. 97-101, 2006.

COLLEY, E. Moluscos terrestres e a malacologia paranaense: histórico e importância no cenário nacional. **Estudos de Biologia: Ambiente e Diversidade**, v. 34, n.82, p. 75-81, 2012.

COLLEY, E. SIMONE, L. R.; SILVA, J. R. Uma viagem pela história da Malacologia. **Estud. Biol., Ambiente Divers**, v. 34, n.83, p. 175-190, 2012.

CONAMA, 2005 – **Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução Conama N° 357, de 17 de março de 2005. Capítulo I das definições Art. 2° - Para efeito desta Resolução são adotadas as seguintes definições.** Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Último acesso em: 31/01/2014.

CORDES, D.O.; PERRY, B.D.; RIKIHISA, Y.; CHICKERING, W.R. Enterocolitis Caused by *Ehrlichia* sp. in the Horse (Potomac Horse Fever). **Veterinary Pathology**, n. 23, p. 471- 477, 1986.

CORT, L. Larval Trematodes From Snails. **The Journal of Parasitology**, p.72-74, 1914.



COUTINHO, J. O. 1950. Índices de infestação natural dos planorbídeos pelas cercárias do *Schistosoma mansoni* na cidade do Salvador- Bahia. **Anais da Faculdade de Medicina de São Paulo**, n. 25, p. 29-53.

COWIE, R.H. Can snails ever be effective and safe biocontrol agents? **International Journal of Pest Management**, v. 47, n.1, p. 23-40, 2001.

DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.S.A.; VIDOTTO, O. Erliquiose nos animais e no homem. **Ciências agrárias**, v.22, n.2, p. 191-201, 2001.

DAWSON, J.E; RISTIC, M.; HOLLAND, C.J. Isolation of *Ehrlichia risticii*, the causative agent of Potomac horse fever, from the fetus of an experimentally infected mare. **Veterinary Records**, v.121, n. 232, 1987.

DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.J.; 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 BHGE agent as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.2145–2165, 2001.

DUTTA, S.K.; PENNEY, B.E.; MYRUP, A.C; ROBL, M.G; RICE, R.M. Disease features in horses with induced equine monocytic ehrlichiosis (Potomac Horse Fever). **American Journal Veterinary Research**, v.49, p.1747- 1751, 1988.

DUTRA, F.; SCHUCH, L.D.F., DELUCCHI, E.; CURCIO, B.R. COIMBRA, H.F. RAFFI, M.B.; DELAGOSTIN, O.; RIET-CORREA, F. Equine monocytic Ehrlichiosis (Potomac horse fever) in 51 horses in Uruguay and southern Brazil. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v.13, p.433-437, 2001.

EDUARDO, J. M.; TAKAHASHI, F. Y.; HOLCMAN, M. M.; COSTA, C. B. T. L.; OHLWEILER, F. P. Gastrópodes dulciaquícolas e helmintos associados, em coleções hídricas de Santo André, São Paulo, Brasil. **Revista Biociências**, v. 18, n.1, p. 22 - 34, 2012.

FERRÃO, C.M.; ABOUD-DUTRA, A.E.; LOPES, R.S.; CANDEIAS, M.L.; GAZÊTA, G.S. Equine Monocytic Ehrlichiosis (EME) in Rio de Janeiro State, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.6, p. 1575-1578, 2007.

FERRI, E.; BAIN, O.; BARBUTO, M.; MARTIN, C.; LO, N.; UNI, S.; LANDMANN, F.; BACCEI, S.G.; GUERRERO, R.; DE SOUZA LIMA, S.; BANDI, C.; WANJI, S.; DIAGNE, M.; CASIRAGHI, M. New insights into the evolution of *Wolbachia* infections in filarial nematodes inferred from a large range of screened species. **PLoS**, v. 6, 2011.

FREITAS, M. G. **Helmintologia Veterinária**. 3º Ed, editora: Rabelo, p. 396, 1977.

GIBSON K.E.; RIKIHISA Y.; ZHANG C.; MARTIN C. *Neorickettsia risticii* is vertically transmitted in the trematode *Acanthatrium oregonense* and horizontally transmitted to bats. **Environmental Microbiology**. v. 7, p. 203-212, 2005.

GONÇALVES, C.M. 2010. **O Estudo da Competência Vetorial das Populações de *Aedes aegypti* da Cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, ao Dengue vírus 2**. Dissertação de Mestrado- Fundação Oswaldo Cruz/Belo Horizonte- FIOCRUZ.

GREIMAN, S. E.; TKACH, V. V.; VAUGHAN, J. A. Transmission rates of the bacterial endosymbiont, *Neorickettsia risticii*, during the asexual reproduction phase of its digenean host, *Plagiorchis elegans*, within naturally infected lymnaeid snails. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 303, 2013.

GUIMARÃES, C. T. Algumas observações de campo sobre biologia e ecologia de *Pomacea haustrum* (REEVE, 1856) (Mollusca, Pilidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 76, n. 4, p. 343-351, 1981.

HEADLEY, S. A.; SCORPIO, D. G; VIDOTTO, C.; J.; DUMLER, J. *Neorickettsia helminthoeca* and salmon poisoning disease: A review. **The Veterinary Journal**, p.1-9, 2009.

HERNÁNDEZ, L. E.; DÍAZ, M. T.; Description of different developmental stages of *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924) (Digenea: Heterophyidae). **Revista Científica**, v. 13, n. 4, p. 285-292, 2003.

HOLLAND, C.J.; RISTIC, M.; COLE, A.I.; JOHNSON, P.; BAKER, G.; GOETZ, T. Isolation, Experimental transmission, and characterization of Causative Agent of Potomac Horse Fever. **Science**, v.227, p.522-524, 1985.

KATZ, N.; ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. **Endemias artigos**, p. 38-41, 2003.

KNOWLES, R.C.; ANDERSON, C.W.; SHIPLEY, W.D.; WHITLOCK, R.H.; PERRY, B.D.; DAVISON, J.P. **Acute equine diarrhea syndrome (AEDS): a preliminary report**. In:PROCEEDINGS OF THE 29TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, Lexington, KY, p.353-357, 1983.

LEME, J.L.M. **Sistemática e biogeografia** morfologia geral dos moluscos, em particular da classe gastropoda. Tópicos especiais em Malacologia Médica, Scielo books, p. 37, 2005.

LONG, M. T.; GOETZ, T. E.; WHITELEY, H. E.; KAKOMA, I.; LOCK, T. E. Identification of *Ehrlichia risticii* as the causative agent of two equine abortions following natural maternal infection. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 7, p. 201-205, 1995.

LONG, M.T. **Equine Monocytic Ehrlichiosis**. ROBINSON, N.E. In: Current Therapy in Equine Medicine, ed. Saunders, 5 ed., St. Louis, Missouri, p.74-77, 2003.

MADIGAN, J.E.; DEROCK, E.; LAVAN, R.P. Clinical significance of a recent serologic survey on the incidence of Potomac horse fever in California. In: PROCEEDINGS 34th ANNUAL CONFERENCE EQUINE PRACTITIONERS, 4-7 December 1988, San Diego, CA. **American Association of Equine Practitioners**, p. 571-576, 1989.

MADIGAN, J.E.; PUSTERLA, N.; JOHNSON, E.; CHAE, J.S.; PUSTERLA, J. B.; DEROCK, E.; LAWLER, S.P. Transmission of *Ehrlichia risticii*, the agent of Potomac horse fever, using naturally infected aquatic insects and helminth vectors: preliminary report. **Equine Veterinary Journal**, v. 32, p.275–279, 2005.

MARCO J., P. Invasion of the introduced aquatic snail *Melanoides tuberculata* (Müller 1774) (Gastropoda; Prosobranchia; Thiariidae) of the Rio Doce State Park, Minas Gerais, Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, Lisse, Netherlands, v. 34, n. 3, p. 186-189, 1999.

MARTELLO, A. R.; NUNES, I. G. W.; BOELTER, R. A.; LEAL, L. A. Malacofauna límnic associada à macrófitas aquáticas do rio Iguariaçá, São Borja, RS, Brasil. **Ciência e Natura**, v. 30, n. 1, p. 27 - 41, 2008.

MILLIDGE, J. **Conchas: Guia prático**. Nobel: São Paulo, 64 p., 1998.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2008. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Nota Técnica – Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica**. 2008,178p.Disponível em:<[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia\\_controle\\_moluscos\\_import\\_epidemio\\_2ed.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia_controle_moluscos_import_epidemio_2ed.pdf)>. Acessado em 17/01/2014.

MIYAHIRA, I.C. 2009. **Moluscos de água doce da Ilha Grande, Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brasil: diversidade e distribuição**. Trabalho de conclusão de curso-Monografia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ.

MOREIRA, L.M.C.; CARDOSO, K.M.; ABOUD-DUTRA, A.E.; FERRÃO, C.M.; GAZÊTA, G.S. Frequency of Equine Monocytic Ehrlichiosis (EME) in Brazil<sup>1</sup>. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 6, p. 697-699, 2013.

MISAO, T.; KOBAYASHI, Y. Studies on infectious mononucleosis. I. Isolation of etiologic agent from blood, bone marrow and lymph node of a patient with infectious mononucleosis by using mice. **Tokyo Iji Shinshi**, n. 71, p. 683–686, 1954.

MOTA, D. G.; MORAES, J.; NASCIMENTO, C.; KAWANO, T.; PINTO, P. L. S. Malacofauna límnic em pesqueiro de Itapeçerica da Serra, São Paulo, Brasil: risco potencial na transmissão de helmintoses. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 38, n. 4, p. 297 – 312, 2012.

MOTT J.; MURAMATSU Y.; SEATON E.; MARTIN C.; REED S.; RIKIHISA Y. Molecular analysis of *Neorickettsia risticii* in adult aquatic insects in Pennsylvania, in horses infected by ingestion of insects, and isolated in cell culture. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 690-693, 2002.

MÜLLER, G.; LARA, S.I.M.; SILVEIRA, J. P.; ANTUNES, P. Acompanhamento laboratorial do ciclo biológico de *Lymnaea viatrix*, hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica*. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 4, n. 3, p. 172-176, 1998.

MULVILLE, P. Equine Monocytic Erlichiosis (Potomac Horse Fever): a review. **Equine Veterinary Journal**, v. 23, n. 6, p. 400-404, 1991.

PALMER, J.E; WHITLOCK, R.H.; BENSON, C.E. Equine ehrlichial colitis (Potomac horse fever): Recognition of the disease in Pensylvania, New Jersey, New York, Ohio, Idaho and Connecticut. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 189, p. 197-199, 1986.

PALMER, J.E.; BENSON, C.E. Oral transmission of *Ehrlichia risticii* resulting in Potomac Horse Fever. **Veterinary Record**, v.122, p.635-639, 1988.

PARAENSE, W. L. Fauna planorbídica do Brasil. In: Lacaz, C. S.; Baruzzi, R. G. ; Siqueira Jr., W. (eds). **Introdução à geografia médica do Brasil**. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, p. 213-239, 1972.

PHILIP, C.B.; HUGHES, L.E. Studies on salmon poisoning disease of canines. I. The rickettsial relationships and pathogenicity of *Neorickettsia helmintheca*. **Experimental Pathology**, n. 3, p. 337–350, 1954.

PEREIRA, P. A. C. Dispersão do gastrópode invasor *Melanoides tuberculata* (Muller, 1774) (Mollusca; Prosobranchia; Thiaridae) no Estado do Paraná- Brasil, em biótopos lênticos ou semilênticos. **Biociências**, Porto Alegre, v. 8, n. 2, p. 197-114, 2000.

PINTO, H. A. 2009. **Infecção natural de *Melanoides tuberculata* (Mollusca: Thiaridae) por *Centrocestus formosanus* (Trematoda: Heterophyidae) e por *Philophthalmus gralli* (Trematoda: Philophthalmidae) no Brasil**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais- UFMG.

PINTO, H. A. 2013. **Biologia e taxonomia de trematódeos transmitidos por moluscos dulciaquícolas na represa da Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais- UFMG. 2013.

PINTO, H. A.; MELO, A. L. A checklist of trematodes (Platyhelminthes) transmitted by *Melanoides tuberculata* (Mollusca: Thiaridae). **Zootaxa**, n. 2799, p. 15-28, 2011.

PINTO, H. A.; MELO, A. L. *Melanoides tuberculata* as intermediate host of *Philophthalmus gralli* in Brazil. **Revista Instituto Medicina Tropical**, v. 52, n.6, p. 323-327, 2010.

PUSTERLA, N.; JOHNSON, E.; CHAE, J.; PUSTERLA, J.B.; DeROCK, E.; MADIGAN, J.E. Infection rate of *Ehrlichia risticii*, the agent of Potomac Horse Fever, in freshwater stream snails (*Juga yrekaensis*) from northern California. **Veterinary Parasitology**, v.92, p. 151-156, 2001.

PUSTERLA, N.; LEUTENEGGER, C.M.; SIGRIST, B.; CHAE, J-S.; LUTZ, H.B.; MADIGAN, J.E. Detection and quantitation of *Ehrlichia risticii* genomic DNA in infected horses and snails by real-time PCR. **Veterinary Parasitology**, v. 90, p. 129-135, 2000.

PUSTERLA, N.; JOHNSON, E.M.; CHAE, J.S.; MADIGAN, J.E. Digenetic trematodes *Acanthatrium* sp. and *Lecithodendrium* sp., as vectors of *Neorickettsia risticii*, the agent of Potomac horse fever. **Journal of Helminthology**, n.77, p. 335–339, 2003.

PUSTERLA, N.; HAGERTY, D.; MAPES, S.; VANGEEM, J.; GROVES, L.T.; DINUCCI, M.; FIELDING, C.L; HIGGINS, J.C. Detection of *Neorickettsia risticii* from various freshwater snail species collected from a district irrigation canal in Nevada County, California. **The Veterinary Journal**, 2013.

REUBEL, G. H.; BARLOUGH, J.E.; MADIGAN, J.E. Production and Characterization of *Ehrlichia risticii*, the Agent of Potomac Horse Fever, from Snails (Pleuroceridae: *Juga* spp.) in Aquarium Culture and Genetic Comparison to Equine Strains. **Journal Of Clinical Microbiology**, v.36, n.6, p.1501-1511, 1998.

RIKIHISA, Y.; PERRY, B.D.; CORDES, D.O. Rickettsial link with acute equine diarrhea. **Veterinary Records**, v.115, p.554, 1985.

RIKIHISA Y.; STILLIS H.; ZIMMERMAN, G. Isolation and continuous culture of *Neorickettsia helminthoeca* in macrophage cell line. **Journal Clinical Microbiology** v.29, n.9, p.1928 -1933, 1991.

ROIER, E.C.R. 2011. *Neorickettsia risticii*: aspectos clínicos, hematológicos, sorológicos e moleculares em eqüinos na Microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro- UFRRJ.

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

SANTOS, S. B.; MAGALHÃES-FRAGA, S. A. P.;BRAUN, B. S.; MOULTON, T. P. The first list of freshwater molluscs in the “Pedra Branca State Park”, Rio de Janeiro, Brazil. **BIOCIÊNCIAS**, v. 11, n. 2, p. 185-186, 2003.

STACKEBRANDT, E.; MURRAY, R.G.E. and TRÜPER,H.G. *Proteobacteria* classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the "purple bacteria and their relatives". **International Journal of Systematic Bacteriology**, n. 38, p. 321-325, 1988.

THIENGO, S. C.; FERNANDEZ, M. A.; STORTTI, M. A. A Survey of Freshwater Gastropods in the Microrregião Serrana of the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Memória Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 93, Suppl. I, p. 233-234, 1998.

THIENGO, S. C.; FERNANDEZ, M. A.; BOAVENTURA, M. F.; GRAULT, C.; SILVA, H. F.; MATTOS, A. C.; SANTOS, S. B. Freshwater Snails and Schistosomiasis Mansoni in the State of Rio de Janeiro, Brazil: I – Metropolitan Mesoregion. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 96, p. 177-184, 2001.

THIENGO, S. C.; MATTOS, A. C.; BOAVENTURA, M. F.; FERNANDEZ, M. A. Freshwater Snails and Schistosomiasis Mansoni in the State of Rio de Janeiro, Brazil: IV - Sul Fluminense Mesoregion. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n.3, p. 275-280, 2004.

THIENGO, S. C.; MATTOS, A. C.; SANTOS, S. B.; FERNANDEZ, M. A. Freshwater snails and Schistosomiasis mansoni in the state of Rio de Janeiro, Brazil: VI – Noroeste Fluminense Mesoregion. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, Suppl. I, p. 239-245, 2006.

VAZ, J. F.; TELES, H. M. S.; CORREA, M. A.; LEITE, S. P. S. Ocorrência no Brasil de *Thiara (Melanoides) tuberculata* (O. F. Muller, 1774) (Gastropoda, Prosobranchia), primeiro hospedeiro intermediário de *Clonorchis sinensis* (Cobbold, 1875) (Trematoda, Platyhelminthes). **Revista Saúde Pública**, v. 20, n. 4, p. 318-322, 1986.

VERGARA, D.; VELÁSQUEZ, L. E. Larvas de Digenea en *Melanoides tuberculata* (Gastropoda: Thiaridae) en Medellín, Colombia. **Acta biol. Colomb.**, v. 14, n. 1, p. 135 – 142, 2009.

VIDIGAL, T. H. D. A.; MARQUES, M. M. G. S. M.; LIMA, H. P.; BARBOSA, F. A. R. Gastrópodes e bivalves límnicos do trecho médio da bacia do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil. **Lundiana**, n. 6, p. 67-76, 2005.

ZIMMERMAN, K. L.; CRISMAN, M. V. Diagnostic Equine Serology. **Veterinary Clinical Equine**, v. 24, p. 311-334, 2008.

## **CAPÍTULO II**

**Aspectos sorológicos de *Neorickettsia risticii* em equinos da  
Microrregião Serrana, estado do Rio de Janeiro.**

## RESUMO

COSTA, Renata Lins. **Aspectos sorológicos de *Neorickettsia risticii* em equinos da Microrregião Serrana, Estado do Rio de Janeiro**. 2014. Dissertação (Mestre em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

O presente estudo apresenta uma análise sorológica de equinos da microrregião Serrana, estado do Rio de Janeiro e teve por objetivo determinar a soropositividade dos equinos e estabelecer os possíveis fatores associados à infecção por *Neorickettsia risticii*. Desta forma, coletou-se sangue de 354 animais em 49 propriedades localizadas nos municípios de Petrópolis e Teresópolis. As coletas foram realizadas através de venopunção jugular e em seguida 5mL de sangue foram dispostos em tubos sem anticoagulante, e acondicionados em recipientes contendo gelo para serem transportados ao Laboratório de Hemoparasitos e Vetores da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. As amostras de sangue foram submetidas a centrifugação para obtenção do soro, estes foram acondicionados em microtubos de 1,5mL e congelados a -20 °C até o momento das análises. Para detecção de anticorpo - *N. risticii* utilizou-se a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). As amostras foram consideradas positivas quando reagiram à *N. risticii* sob a diluição de 1:50. Nos municípios de Petrópolis e Teresópolis encontrou-se uma frequência de 5,9% dos equinos sorologicamente reativos à *N. risticii*. Destes 354 animais analisados 54,23 % pertenciam ao município de Petrópolis e 45,76% eram do município de Teresópolis sendo encontrada uma frequência de positividade para esse agente de 5,2% e 6,8% respectivamente. Foi possível perceber que apesar de não ter sido observada diferença significativa, animais que são criados em áreas com altitude acima de 800 metros, em sistema de confinamento e com raça definida apresentaram maior soropositividade (6,8%, 9,8%, 7,4%) para *N. risticii* quando comparados às outras variáveis. O único fator associado à infecção de *N. risticii* foi a região de origem dos animais ( $p < 0,05$ ), animais oriundos de outros estados do Brasil ou de outros países apresentaram maior soropositividade (11%), isto sugere que possivelmente o animal tenha sido exposto ao agente em uma área endêmica para EME (Erliquiose Monocítica Equina). A presença de *N. risticii* em Petrópolis e Teresópolis indica a circulação do agente em mais uma área geográfica do Brasil; elucidar o ciclo biológico bem como a participação de moluscos e trematódeos na cadeia de transmissão da EME pode esclarecer a epidemiologia da doença e os seus fatores associados no estado do Rio de Janeiro, pois é uma patologia que produz graves alterações clínicas nos animais.

**Palavras-chave:** *Neorickettsia risticii*, Erliquiose Monocítica Equina, Epidemiologia.



## ABSTRACT

COSTA, Renata Lins. **Serological aspects of *Neorickettsia risticii* in equines of Serrana micro-region, state of Rio de Janeiro.** 2014. Dissertation (Master Science, Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

The present study was performed in the Serrana micro-region, state of Rio de Janeiro and aimed to determine the seropositivity of equines and establish the possible factors associated with infection by *Neorickettsia risticii*. Thus, blood was collected from 354 animals in 49 properties located in the municipalities of Teresopolis and Petropolis. The collections were made by jugular venipuncture and then 5mL of bloods were placed in tubes without anticoagulant, and kept in containers containing ice for transport to the Laboratory of Hemoparasites and Vectors of Federal Rural University of Rio de Janeiro. Blood samples were subjected to centrifugation for obtainment of serums, which were stored in microtubes of 1.5mL, and frozen at -20°C until analysis. For detection of antibody against *N. risticii*, was used the Immunofluorescence Antibody Test (IFAT). The samples were considered positive when reacted to *N. risticii* at 1:50 dilution. At the municipalities of Petropolis and Teresopolis, was found a frequency of 5.9% of horses serologically reactive against *N. risticii*. Of these 354 animals analyzed, 54.23% belonged to the municipality of Petropolis, and 45.76% were in the municipality of Teresopolis, being found a frequency of positivity for this agent of 5.2% and 6.8% respectively. It could be observed that although do not have significant difference, animals that are raised in areas with altitude above 800 meters in confined system and with defined breed presented the high seropositivity (6.8%, 9.8%, 7.4%) for *N. risticii* when compared to the others variables. The unique factor associated with infection of *N. risticii* was the region of origin of the animals ( $p < 0.05$ ), animals from other states of Brazil or other countries (11%), this suggests that perhaps the animal was exposed to the agent in an endemic area to EME (Ehrliquiosis Monocytic Equine). The presence of *N. risticii* in Petropolis and Teresopolis indicate the movement of the agent in another geographical area of Brazil; elucidate the biological cycle and the involvement of molluscs and trematodes in the chain of EME transmission can clarify the epidemiology of the disease and its associated factors in the state of Rio de Janeiro, because it is a pathology that produces severe clinical abnormalities in animals.

**Keywords:** *Neorickettsia risticii*, Ehrliquiosis Monocytic Equine, Epidemiology.

## 1 INTRODUÇÃO

Erliquiose Monocítica Equina (EME) ou *Potomac Horse Fever* (PHF) é uma doença que pode ser fatal e afeta os equinos. *Ehrlichia risticii* é considerada o agente etiológico desta doença, entretanto, esta bactéria foi recentemente renomeada por conter caracteres morfológicos, moleculares e biológicos compatíveis com o gênero *Neorickettsia* (HOLLAND et al., 1985; DUMLER et al., 2001). A EME foi descrita pela primeira vez em áreas próximas ao rio Potomac (noroeste de Washington, EUA) no final da década de 70. Desde, então, têm sido descritos casos da doença em muitas outras partes dos Estados Unidos, como Minnesota, Califórnia e Pensilvânia (BAIRD; ARROYO, 2013).

*Neorickettsia risticii* parasita principalmente monócitos e células da parede intestinal do ceco e cólon maior (OLIVER; STÄMPFLI, 2006). A EME possui um período de incubação de aproximadamente 1 a 3 semanas e a parasitemia persiste por 1 a 2 semanas após o desaparecimento dos sintomas clínicos (MESSICK; RIKIHISA, 1994).

A doença é caracterizada por produzir febre e sintomas gastrointestinais nos equinos, e dentre as principais alterações patológicas observadas na EME, destaca-se a presença de áreas com extensa hiperemia no trato digestivo (CORDES et al., 1986). Todos os equinos são susceptíveis à doença, sendo que animais transportados de áreas indenes para áreas endêmicas parecem ser susceptíveis a infecções mais graves do que aqueles nascidos nas áreas endêmicas (DUTRA et al., 2001). A transmissão ocorre via oral intermediada por moluscos límnicos e trematódeos infectados pela bactéria (BARLOUGH et al., 1998; PUSTERLA et al., 2003; GIBSON et al., 2005).

Os fatores associados a soropositividade de equinos para *N. risticii*, incluem a raça, o sexo, a idade e a época do ano. Atwill et al. (1992) demonstraram que equinos da raça puro sangue inglês, com idade avançada e do sexo feminino foram as categorias avaliadas associadas ao desenvolvimento da EME. Neste mesmo estudo, os autores observaram que um maior número de casos da EME ocorria no verão, caracterizando a doença como estacional. Levantamentos sorológicos indicam que na América do Norte, a EME ocorre em 43 estados dos Estados Unidos, e uma província do Canadá (MCLAUGHLIN; GOUGH, 1996; MADIGAN et al., 2005). No Brasil, a exposição de equinos a *N. risticii* já foi descrita no Estado do Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul por meio de diagnóstico molecular e sorológico (COIMBRA et al., 2006; ROIER, 2011; MOREIRA et al., 2013).

Determinar a frequência de anticorpos contra *N. risticii* através da técnica de Imunofluorescência Indireta e estabelecer os fatores associados à presença de anticorpos em equinos de propriedades equestres localizadas na Microrregião Serrana, estado do Rio de Janeiro foram os objetivos do presente estudo.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1- Estudos soropidemiológicos de *Neorickettsia risticii* em equinos no Mundo e no Brasil

A EME é endêmica nos EUA e possui caráter sazonal, ocorrendo nos meses mais quentes do ano. Goetz et al. (1989) registraram prevalência de 16% em junho e 62% em agosto em cavalos aparentemente saudáveis. Em alguns estados americanos como Nova Iorque a soroprevalência chega a 75%, principalmente nas fronteiras ou regiões muito próximas ao Rio Hudson (ATWILL et al., 1992). No estado de Minnesota, de um total de 2.549 amostras, Timothy et al. (1990) observaram que 26% dos equinos tiveram sorologia positiva para o agente da EME. Dentre o grupo dos positivos, 25% foram atendidos no hospital veterinário, e o principal sinal clínico era a diarreia. Em Ohio, detectou-se uma frequência de 13% dos animais com sorologia positiva em uma região que os animais já possuíam histórico de reatividade para *N. risticii*, confirmando a circulação do agente da EME na região (RIKIHISA et al., 1991). Em outras áreas como Illinois, a soroprevalência de *N. risticii* chega a 38% (GOETZ et al., 1986). No leste de Ontário, no meado da década de 90, quatro equinos apresentaram sinais clínicos da EME e foram diagnosticados com *N. risticii* (SHAPIRO; THOMSON, 1995).

O inquérito sorológico da doença demonstra que, apesar da soropositividade nos estados americanos, também possui registros em outros países. Na França e na Holanda, *N. risticii* já foi diagnosticada em éguas com sinais clínicos da doença (VIDOR et al., 1988; KOLK et al., 1991).

No Brasil, entre as décadas de 30 a 40 no Sul do Rio Grande do Sul, aproximadamente 200 cavalos vieram a óbito e a doença foi denominada “churrido equino”. No entanto, somente em 1998 é que Dutra et al. (2001) determinaram que a doença era a EME. A EME no Brasil também parece seguir um caráter sazonal, ocorrendo nas épocas mais quentes do ano. Evidências sorológicas com prevalências de 48,2% no Rio Grande do Sul (COIMBRA et al., 2006), 26% na microrregião de Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro (ROIER et al., 2011), 11,36% (FERRÃO et al. 2007) 9,38% e 14,29% nos estados de Santa Catarina e São Paulo (MOREIRA et al., 2013) têm sido descritas.

### 2.2- Hospedeiros susceptíveis

Os equinos são os hospedeiros mais susceptíveis, porém a procura pelo agente em outros mamíferos já foi realizada por Perry et al. (1989) que demonstraram evidências sorológicas de *N. risticii* em gatos, porcos e pequenos ruminantes.

Suksawat et al. (2001) detectaram prevalência sorológica de 38% dos cães investigados na Tailândia. Gatos também parecem ser susceptíveis a doença. Através do diagnóstico molecular foi possível observar a presença de *N. risticii* em felinos (LAPIN et al., 2006). Talvez a prevalência em cães e gatos seja baixa devido à forma de infecção, pois a mesma é realizada no pastoreio e pela ingestão de água de rios, lagos e lagoas (COHN, 2003).

Por meio de infecção experimental, Pusterla et al. (2001) comprovaram que bovinos podem ser susceptíveis a esta bactéria, sem desenvolverem sinais clínicos e alterações hematológicas. *Neorickettsia risticii* foi ainda isolada, neste estudo, das fezes dos animais infectados, corroborando os resultados de infecções experimentais em

equinos (PUSTERLA et al., 2000). Os autores ainda sugerem que os bovinos podem atuar como hospedeiros acidentais ou como reservatórios do agente etiológico.

### 2.3 Fatores associados à infecção nos equinos

Os fatores que estão intimamente associados aos riscos de soro positividade para os equinos incluem a raça, o sexo, a idade e a época do ano (ATWILL et al., 1992). No entanto, Olchowy et al. (1990) não demonstraram associações dessas variáveis com a positividade, ao observar uma soroprevalência de até 47% em equinos de Minnessota.

A associação da raça com a infecção pela EME está relacionada à origem destes animais, pois por vezes, a região de criação de uma raça específica pode ser endêmica para a doença (KIPER et al., 1992). A época do ano parece ter relação com o aparecimento da EME, principalmente entre os meses de novembro e dezembro (ATWILL et al., 1992; COIMBRA et al., 2005). Atwill et al. (1994) ao realizarem um levantamento dos possíveis fatores relacionados à EME, determinaram que equinos em sistema de criação extensivo apresentaram 2-3 vezes mais chances de estarem infectados do que os animais estabulados. Os mesmos autores ainda determinaram que animais sorologicamente testados de janeiro a março apresentaram até seis vezes mais chance do que os coletados em outras épocas do ano, indicando mais uma vez que os meses mais quentes do ano tem relação com a infecção por *N. risticii*

### 2.4- Diagnóstico nos equinos

A detecção do agente pode ser realizada de várias formas: identificação por microscopia óptica de mórulas em monócitos durante a fase aguda da doença ou a partir de capa leucocitária; através de técnicas sorológicas como a RIFI (RISTIC et al., 1986) e o ELISA (DUTTA et al., 1987; PRETZMAN et al., 1987); além disso, pode-se utilizar técnicas moleculares como a PCR de amostras de capa leucocitária ou fezes (RISTIC et al., 1986; BISWAS et al., 1994).

Os testes sorológicos incluem a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e *Western Blotting*. Estes testes podem ser utilizados na detecção de anticorpos anti-*N. risticii* (HOLLAND et al., 1985; TIMOTHY et al., 1990). A RIFI é indicada como ferramenta de diagnóstico, pela praticidade, especificidade e sensibilidade, sendo utilizada em estudos de soroprevalência. A alta especificidade da RIFI foi observada em um ensaio onde equinos de regiões não endêmicas para *N. risticii* foram submetidos à esta técnica de diagnóstico e nenhuma amostra foi considerada positiva (RISTIC et al., 1986).

Os anticorpos podem ser detectados por longos períodos após a infecção ou vacinação (RIKIHISA; PERRY, 1985). A possibilidade de ocorrer reação cruzada com outras espécies do gênero *Neorickettsia* e *Ehrlichia* já foi considerada, porém equinos ainda não se mostraram susceptíveis a estes outros agentes no Brasil. Apenas os cães apresentaram-se naturalmente infectados por bactérias da espécie *N. helminthoeca* e *Ehrlichia canis* (HEADLEY et al. 2009; AGUIAR et al., 2013).

O desenvolvimento recente dos ensaios moleculares facilitou consideravelmente o diagnóstico da EME. Em animais experimentalmente e naturalmente infectados, a PCR realizada em amostras de fezes e sangue periférico foi mais sensível comparada ao cultivo celular (MADIGAN et al., 2005). As variantes da PCR, como *Nested PCR* e *qPCR* têm sido amplamente utilizadas para a confirmação do diagnóstico. A *qPCR* tem a vantagem de ser uma PCR quantitativa, e não precisar de etapas pós PCR. Além disso,

tanto na qPCR quanto na *Nested* PCR é possível observar um aumento na sensibilidade da técnica comparada à PCR convencional. Estas técnicas têm sido amplamente utilizadas para detecção de *N. risticii* em equinos (BISWAS et al., 1994; PUSTERLA et al., 2000).

## **2.5- Tratamento e profilaxia**

Para os animais com sintomatologia aguda, o tratamento deve ser de suporte consistindo na reposição hidroeletrólítica (correção do equilíbrio ácido-básico), além da administração de anti-inflamatório não esteroidal (Flunixin meglumine) a fim de prevenir a endotoxemia e também o quadro de laminite. O antibiótico de eleição no combate a esta bactérias é a tetraciclina. A doxiciclina não é recomendada já que em estudos experimentais constataram que por via endovenosa este antibiótico possui efeitos tóxicos para equinos (RIKIHISA; JIANG, 1988; MULVILLE, 1991).

Como medidas profiláticas recomenda-se restringir o acesso dos equinos aos pastos, principalmente os que possuem áreas alagadiças. Este acesso pode ser restrito principalmente nos meses de maior incidência da doença. A redução do número de moluscos por meio de dragagem dos rios também pode ser realizada como medida profilática em áreas endêmicas para EME (LONG, 2003; MADIGAN; PUSTERLA, 2005).

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1- Local do estudo

O estudo foi realizado em propriedades equestres de dois municípios da Microrregião Serrana, Petrópolis e Teresópolis. Petrópolis está localizado a 809m acima do nível do mar, a latitude Sul é de 22°30'18'' e longitude Oeste de 43°10'44'', enquanto Teresópolis encontra-se a 910m acima do nível do mar, e está localizado a 22°24'43'' na latitude Sul e 42°57'57'' na longitude Oeste.

A amostragem foi realizada de forma não probabilística. Foram selecionadas 49 propriedades nesta Microrregião para compor o estudo, sendo 17 pertencentes à Teresópolis e 32 pertencentes à Petrópolis. No intuito de não enviesar o estudo foi estabelecido que nas propriedades onde o número de equinos fosse inferior a dez, todos os animais seriam coletados. Entretanto, quando o número de animais fosse superior a dez, a coleta se restringiria a 10% da população de equinos da propriedade. Dessa forma, foram realizadas visitas, e, após consentimento do responsável, amostras de sangue de 354 equinos foram coletadas. Em cada local de amostragem, a altitude foi registrada e os pontos georreferenciados com a utilização de receptores de Sistema de Posicionamento Global (GPS). O sistema de referência utilizado foi *South American Datum 1969* (SAD69).

### 3.2- Questionário epidemiológico

Foi aplicado um questionário semi-estruturado aos proprietários, contendo informações sobre as características de cada propriedade, condição de manejo e questões referentes a cada equino no intuito de relacionar os possíveis fatores associados à soropositividade desses animais à *N. risticii* (Anexo 1).

As características acima discriminadas foram analisadas considerando as seguintes variáveis:

(a) Município:

- Teresópolis;
- Petrópolis.

(b) Manejo sanitário e zootécnico da propriedade:

- Satisfatório (instalações zootécnicas apropriadas à criação, animais recebem alimentação adequada, presença de controle sanitário e assistência veterinária constante);

- Razoável (instalações zootécnicas mínimas necessárias para criação, os animais recebem alimentação balanceada, conforme recurso existente pelo proprietário, o controle sanitário é facultativo e a assistência veterinária esporádica);

- Insatisfatório (Instalações zootécnicas inadequadas à criação, os animais não recebem alimentação balanceada rotineiramente, o controle sanitário não é sistemático e a assistência veterinária, quando existe, é esporádica ou utilizada em casos de emergência).

(c) Sistema de Criação:

- Confinado (Animal sem acesso à áreas de pastos, sistema restrito à baia);

- Extensiva / Semi-extensivo (acesso somente à pastagem ou com acesso parcial à pastagem);

(d) Presença de bovinos na propriedade:

- Sim (presença de bovinos na mesma pastagem ou próximos aos equinos);

- Não (não tem contato com bovinos).
- (e) Tipo de área predominante na pastagem:
  - Presença de áreas pouco alagadas/áreas secas;
  - Presença de áreas muito alagadas/lagos, rios e riachos.
- (f) Caramujo na propriedade:
  - Presença (caramujos relatados pelos responsáveis como presentes na propriedade);
  - Ausência (caramujos relatados pelos responsáveis como ausentes na propriedade).
- (g) Gênero do equino:
  - Macho;
  - Fêmea.
- (h) Origem do equino:
  - Interna (animal que nasceu na região serrana);
  - Externa (animal que nasceu fora da região serrana).
- (i) Região de origem dos animais:
  - Da região Serrana do estado do Rio de Janeiro;
  - Fora da região Serrana do estado do Rio de Janeiro;
  - De outros estados do Brasil ou de outros países.
- (j) Idade:
  - <1 ano;
  - $\geq 1 < 5$ ;
  - $\geq 5 < 10$ ;
  - $\geq 10$ .
- (k) Raça do equino:
  - Com raça definida;
  - Sem raça definida.
- (l) Altitude da propriedade:
  - $\geq 500 < 800$  metros (em relação ao nível do mar);
  - $\geq 800 < 1000$  metros (em relação ao nível do mar).
- (m) Utilização do equino na propriedade:
  - Esporte/exposição;
  - Reprodução;
  - Trabalho/Passeio.

### 3.3- Tamanho amostral

Para a determinação do tamanho amostral foi estabelecido o grau de confiança de 95%, prevalência esperada de 26% (ROIER, 2011) e margem de erro de 5%. O número mínimo de amostras na Microrregião Serrana foi de 292 amostras, segundo a equação utilizada descrita por Sampaio (2002):

$$n = \frac{1,962^2 \times \text{Pesp} (1 - \text{Pesp})}{d^2}$$

onde: n = tamanho da amostra; Pesp = prevalência esperada;  $d^2$  = precisão absoluta desejada.

### 3.4- Coleta e processamento do soro dos equinos

De cada equino foram coletados 5mL de sangue total em tubo sem EDTA com ativador de coágulo, através da punção da veia jugular. Os tubos contendo sangue foram

mantidos em recipiente térmico à aproximadamente 4°C, até o retorno ao laboratório de Hemoparasitos e Vetores da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

Os tubos foram centrifugados a 6.000 x g por 10 minutos para obtenção do soro, o qual foi acondicionado em microtubos de polipropileno de 1,5mL, estéreis, mantidos à temperatura de -20°C até a realização do diagnóstico sorológico.

### **3.5- Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)**

A detecção de anticorpos anti-*N. risticii* (IgG) foi realizada pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), utilizando o kit de diagnóstico da *Fuller Laboratories*. A reação foi realizada conforme recomendações do fabricante (anexo II). A titulação mínima considerada para as amostras positivas foi de 1:50.

A reação entre o antígeno fixado e o anticorpo presente nas amostras foi visualizada em microscópio Bx 51 (Nikon®) binocular equipado para fluorescência, em aumento de 400 vezes.

### **3.6- Análise Estatística**

A prevalência de anticorpos anti-*N. risticii* nos animais avaliados nas diferentes categorias foi calculada e, possíveis diferenças foram avaliadas através do teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) em nível de 5% de significância utilizando programa R versão 2.11.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2010).



## 4 RESULTADOS

A frequência de anticorpos anti- *N. risticii* encontrada em equinos na Microrregião Serrana foi de 5,93% (21/354) nos equinos avaliados com título igual a 1:50. Dos 354 animais analisados, 54,23% (192/354) pertenciam ao município de Petrópolis e 45,76% (162/354) ao município de Teresópolis, sendo encontrada uma frequência de 5,2% (n=10/192) e 6,8% (n=11/162) de positividade para os municípios de Petrópolis e Teresópolis respectivamente (Tabela 1). Apesar de ter sido observada maior frequência de positividade nos animais de Teresópolis, não houve diferença estatística entre as frequências de cada município ( $p>0,05$ ).

**Tabela 1.** Frequência de anticorpos anti-*Neorickettsia risticii* na diluição de 1:50 de soro equino através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função do município, na microrregião Serrana, RJ.

Município	RIFI				$\chi^2$	P
	N	Positivos				
		N	(%)			
Teresópolis	139	11	6,8 <sup>a</sup>	0,39	0,68	
Petrópolis	215	10	5,2 <sup>a</sup>			
TOTAL	354	21	5,9			

<sup>a</sup>Valores seguidos da mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente pelo teste Qui-quadrado a 5% de significância.  $\chi^2$ : Valor do Qui-quadrado, P: p-valor.

Os aspectos relacionados às características, condições e manejo dos equinos nas propriedades avaliadas foram relacionados a soro-positividade dos animais para *N. risticii*. Com relação à altitude da propriedade foi possível observar que, 4,9% (n=8/163) dos animais positivos pertenciam as áreas com altitude variando de 500 a 800 metros em relação ao nível do mar e 6,8% (n=13/191) dos animais positivos pertenciam a áreas com altitude acima de 800 metros (Tabela 2), não havendo diferença significativa entre as frequências de positividade observadas em cada nível de altitude ( $p>0,05$ ).

**Tabela 2.** Frequência de anticorpos anti-*Neorickettsia risticii* na diluição de 1:50 de soro equino através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função da altitude, na Microrregião Serrana, RJ.

Altitude	RIFI				$\chi^2$	P
	N	Positivos				
		n	(%)			
$\geq 500 < 800$	163	8	4,9 <sup>a</sup>	0,56	0,59	
$\geq 800 < 1000$	191	13	6,8 <sup>a</sup>			
TOTAL	354	21	5,9			

<sup>a</sup>Valores seguidos da mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente pelo teste Qui-quadrado a 5% de significância.  $\chi^2$ : Valor do Qui-quadrado, P: p-valor.

Foi observada uma positividade de 11,6% (n=14/121) dentre os animais cuja condição manejo sanitário e zootécnico da propriedade foi considerada satisfatória (Tabela 3). No manejo considerado razoável obteve-se uma positividade de 5,0% (n=7/140) e os animais provenientes de manejo considerado insatisfatório não

apresentaram (n= 0/93) positividade. Não houve diferença estatística entre as frequências de positividade com relação ao manejo sanitário e zootécnico (p>0,05).

**Tabela 3.** Frequência de anticorpos anti-*Neorickettsia risticii* na diluição de 1:50 de soro equino através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função da condição de manejo sanitário e zootécnico da propriedade, na microrregião Serrana, RJ.

Condição da Propriedade	RIFI				$\chi^2$	P
	N	Positivos				
		N	(%)			
Insatisfatório	93	0	0,0 <sup>a</sup>			
Razoável	140	7	5,0 <sup>a</sup>	*	0,06	
Satisfatório	121	14	11,6 <sup>a</sup>			
TOTAL	354	21	5,9			

<sup>a</sup>Valores seguidos da mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente pelo teste exato de fisher a 5% de significância.  $\chi^2$ : Valor do Qui-quadrado, P: p-valor.  
\*Teste Exato de Fisher a 5% de significância.

Não houve presença de animais positivos (n=0/51) nas criações consorciadas de equinos e bovinos (Tabela 4). Em criações de equinos na ausência de bovinos 6,9% (n=21/303) dos animais foram reagentes ao anticorpo anti-*N. risticii*, não sendo observada diferença estatística entre os grupos analisados (p>0,05).

**Tabela 4.** Frequência de anticorpos anti-*Neorickettsia risticii* na diluição de 1:50 de soro equino através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função da presença de bovinos na propriedade, na Microrregião Serrana, RJ.

Presença de bovinos	RIFI				$\chi^2$	P
	N	Positivos				
		n	(%)			
Sim	51	0	0,0 <sup>a</sup>			
Não	303	21	6,9 <sup>a</sup>	*	0,10	
TOTAL	354	21	5,9			

<sup>a</sup>Valores seguidos da mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente pelo teste Exato de Fisher a 5% de significância.  $\chi^2$ : Valor do Qui-quadrado, P: p-valor.  
\*Teste Exato de Fisher a 5% de significância.

Na Tabela 5 podemos observar que, com relação ao sistema de criação empregado na propriedade, 9,8% (n=5/51) dos animais criados em sistema de confinado, 6,7% (n=16/238) dos animais criados em sistema semi-confinado e 0% (n=6/65) dos animais criados em sistema extensivo foram sorologicamente positivos para o agente etiológico da EME. Não houve diferença estatística significativa entre os percentuais de positividade dos grupos avaliados (p>0,05).

**Tabela 5.** Frequência de anticorpos anti-*Neorickettsia risticii* na diluição de 1:50 de soro equino através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função do sistema de manejo dos animais, na Microrregião Serrana, RJ.

Sistema de Manejo	RIFI				$\chi^2$	P
	N	Positivos				
		n	(%)			
Extensivo/ Semi-extensivo	303	16	5,3 <sup>a</sup>	1,60	0,34	
Confinado	51	5	9,8 <sup>a</sup>			
TOTAL	354	21	5,9			

<sup>a</sup>Valores seguidos da mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente pelo teste Qui-quadrado a 5% de significância.  $\chi^2$ : Valor do Qui-quadrado, P: p-valor.

Na presença de áreas alagadiças e fontes naturais de água como lagos, lagoas, córregos e riachos, 5,2% (n=3/58) dos animais foram positivos. Já em áreas secas ou pouco alagadas foi observado que 6,1% (n=18/296) dos animais apresentaram positividade (Tabela 6). Não houve diferença significativa entre a positividade observada em ambas as áreas (p>0,05).

**Tabela 6.** Frequência de anticorpos anti-*Neorickettsia risticii* na diluição de 1:50 de soro equino através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função do tipo de área predominante nas propriedades, na Microrregião Serrana, RJ.

Tipo de Área	RIFI				$\chi^2$	P
	N	Positivos				
		n	(%)			
Seca / Pouco alagadas	296	18	6,1 <sup>a</sup>	*	0,99	
Muito alagadas / Lagos e rios e riachos	58	3	5,2 <sup>a</sup>			
TOTAL	354	21	5,9			

<sup>a</sup>Valores seguidos da mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente pelo teste exato de Fisher a 5% de significância.  $\chi^2$ : Valor do Qui-quadrado, P: p-valor.

\*Teste Exato de Fisher a 5% de significância.

Nenhum animal reagiu sorologicamente a *N. risticii* (n=0/30) em propriedades onde a presença de caramujos foi relatada pelo responsável entrevistado (Tabela 7). Foi observada a positividade de 6,5% (n=21/324) dos animais criados em propriedades onde a presença do caramujo não foi relatada pelo responsável. Entre as frequências de positividade observadas nestes grupos, não houve diferença estatística significativa (p>0,05).

**Tabela 7.** Frequência de anticorpos anti-*Neorickettsia risticii* na diluição de 1:50 de soro equino através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função da presença de caramujos, na Microrregião Serrana, RJ.

Presença de caramujos	RIFI				$\chi^2$	P
	N	Positivos				
		n	(%)			
Sim	30	0	0,0 <sup>a</sup>	*	0,30	
Não	303	21	6,5 <sup>a</sup>			
TOTAL	354	21	5,9			

<sup>a</sup>Valores seguidos da mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente pelo teste exato de fisher a 5% de significância.  $\chi^2$ : Valor do Qui-quadrado, P: p-valor.

\*Teste Exato de Fisher a 5% de significância.

Com relação à origem dos animais na propriedade, 7,3% (n=20/274) dos animais de origem externa reagiram sorologicamente a *N. risticii*. Já os animais de origem interna, 1,3% (n=1/80) foram positivos (Tabela 8), não havendo diferença significativa entre a positividade do grupo de animais externos e internos (p>0,05). Além disso, foi avaliada especificamente a procedência do animal em relação à região de origem. Observou-se que 11% dos animais positivos vieram de fora do estado do Rio de Janeiro ou tinham procedência desconhecida, 8,7% veio de fora da região Serrana e apenas 2,6% procedentes da própria região Serrana (Tabela 9). Entre os índices de positividade destas categorias houve diferença estatística significativa (p<0,05).

**Tabela 8.** Frequência de anticorpos anti-*Neorickettsia risticii* na diluição de 1:50 de soro equino através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função da origem dos animais, na Microrregião Serrana, RJ.

Origem dos animais	RIFI				$\chi^2$	P
	N	Positivos				
		N	(%)			
Interna (nascido na propriedade)	80	1	1,3	*	0,05	
Externa (nascido fora da propriedade)	274	20	7,3			
TOTAL	354	21	5,9			

<sup>a</sup>Valores seguidos da mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente pelo teste exato de fisher a 5% de significância.  $\chi^2$ : Valor do Qui-quadrado, P: p-valor.

\*Teste Exato de Fisher a 5% de significância.

**Tabela 9.** Frequência de anticorpos anti-*Neorickettsia risticii* na diluição de 1:50 de soro equino através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função da região de origem dos animais, na Microrregião Serrana, RJ.

Região de origem	RIFI				$\chi^2$	P
	N	Positivos				
		N	(%)			
Da região Serrana do RJ	189	5	2,6 <sup>a</sup>	8,22	0,01	
Fora da região Serrana do RJ	92	8	8,7 <sup>b</sup>			
De outros estados do Brasil ou de outros países	73	8	11,0 <sup>b</sup>			
TOTAL	354	21	5,9			

<sup>a</sup>Valores seguidos da mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente pelo teste Qui-quadrado a 5% de significância.  $\chi^2$ : Valor do Qui-quadrado, P: p-valor.

Vinculado as análises referentes às propriedades, questões inerentes aos animais também foram avaliadas (Tabela 10). Dentre estas foi avaliada a aptidão de cada animal em relação a sua utilização na propriedade. Constatou-se que os animais utilizados para esporte e exposição tiveram uma positividade de 7,9% (n=15/190), os animais utilizados na reprodução tiveram uma positividade de 5,7% (n=2/35) e os utilizados para trabalho e passeio 3,1% (n=4/129). Não houve diferença estatística significativa entre as frequências de positividade destes grupos (p>0,05).

**Tabela 10.** Frequência de anticorpos anti-*Neorickettsia risticii* na diluição de 1:50 de soro equino através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função da utilização dos animais na propriedade, na Microrregião Serrana, RJ.

Utilização dos animais	RIFI				$\chi^2$	P
	N	Positivos				
		N	(%)			
Reprodução	35	2	5,7 <sup>a</sup>			
Esporte/Exposição	190	15	7,9 <sup>a</sup>	3,16	0,20	
Trabalho / Passeio	129	4	3,1 <sup>a</sup>			
TOTAL	354	21	5,9			

<sup>a</sup>Valores seguidos da mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente pelo teste Qui-quadrado a 5% de significância.  $\chi^2$ : Valor do Qui-quadrado, P: p-valor.

Na Tabela 11 está demonstrada a relação dos gêneros com a positividade, os machos (6,5%, n=14/215) apresentaram maior percentual quando comparados às fêmeas (5,0%, n=7/139). No entanto, não foi observada diferença estatística significativa entre eles (p>0,05).

**Tabela 11.** Frequência de anticorpos anti-*Neorickettsia risticii* na diluição de 1:50 de soro equino através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função do sexo, na Microrregião Serrana, RJ.

Gênero	RIFI				$\chi^2$	P
	N	Positivos				
		N	(%)			
Fêmea	139	7	5,0 <sup>a</sup>			
Macho	215	14	6,5 <sup>a</sup>	0,33	0,73	
TOTAL	354	21	5,9			

<sup>a</sup>Valores seguidos da mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente pelo teste Qui-quadrado a 5% de significância.  $\chi^2$ : Valor do Qui-quadrado, P: p-valor.

Foi possível observar que equinos menores de 1 ano de idade não apresentaram soropositividade para *N. risticii*, e a maior frequência de positividade foi observada na categoria de animais com idade de 5 a 10 anos (7,2%, n=10/138), contudo sem apresentar diferença estatística significativa (p>0,05) (tabela 12).

**Tabela 12.** Frequência de anticorpos anti-*Neorickettsia risticii* na diluição de 1:50 de soro equino através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função da idade, na Microrregião Serrana, RJ.

Idade	RIFI				$\chi^2$	P
	N	Positivos				
		N	(%)			
<1	29	0	0,0 <sup>a</sup>			
≥1< 5	90	6	6,7 <sup>a</sup>	*	0,48	
≥ 5 < 10	138	10	7,2 <sup>a</sup>			
≥ 10	97	5	5,2 <sup>a</sup>			
TOTAL	354	21	5,9			

<sup>a</sup>Valores seguidos da mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente pelo teste exato de Fisher a 5% de significância.  $\chi^2$ : Valor do Qui-quadrado, P: p-valor. \* Teste Exato de Fisher a 5% de significância.

Ainda sobre os aspectos inerentes aos animais foi possível observar que equinos com raça definida foram os que apresentaram maior frequência de positividade (7,4%, n=19/257) em relação aos equinos sem raça definida, porém sem associação estatística (p>0,05) (Tabela 13).

**Tabela 13.** Frequência de anticorpos anti-*Neorickettsia risticii* na diluição de 1:50 de soro equino através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função da raça, na Microrregião Serrana, RJ.

Raça	RIFI				$\chi^2$	P
	N	Positivos				
		N	(%)			
SRD	97	2	2,1 <sup>a</sup>	*	0,07	
Com raça	257	19	7,4 <sup>a</sup>			
TOTAL	354	21	5,9			

<sup>a</sup>Valores seguidos da mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente pelo teste exato de Fisher a 5% de significância.  $\chi^2$ : Valor do Qui-quadrado, P: p-valor. \*Teste Exato de Fisher a 5% de significância.

## 5 DISCUSSÃO

Evidências sorológicas demonstram a circulação do agente no Brasil, sendo a ocorrência de casos clínicos tanto na região sul como na região sudeste do país (COIMBRA et al., 2005; FERRÃO et al., 2007). Particularmente no estado do Rio de Janeiro estudos demonstraram que a soroprevalência variou de 11,36% a 26% (ROIER, 2011; FERRÃO et al., 2007; MOREIRA et al., 2013). Neste mesmo estado, em estudo realizado por Ferrão et al. (2007) demonstraram uma elevada soroprevalência em equinos de áreas que apresentavam animais com suspeita clínica da EME. Em áreas endêmicas para EME nos Estados Unidos, estudos demonstram que esta soroprevalência pode variar de 16% a 75% (GOETZ et al., 1989; ATWILL et al., 1992). A soroprevalência para *N. risticii* também já foi relatada no Canadá, Europa e Austrália (PALMER et al., 1986; BREIDER; HENTON, 1987; RIKIHISA, 1998). Na América do Sul evidências moleculares só foram descritas no Uruguai e na região sul do Brasil (DUTRA et al., 2001; COIMBRA et al., 2006).

No presente estudo foi observada uma baixa frequência de equinos soropositivos para *N. risticii*. Este fato pode ser explicado por diferentes fatores, dentre eles a coleta de animais sem sintomatologia clínica na região, a possível influência do clima da microrregião sobre os vetores da doença, a estação do ano em que as amostras foram coletadas, dentre outros. Este fato é reforçado pelos estudos de Gordon et al. (1988) e Madigan et al. (1989) que observaram uma elevada variação na soroprevalência dos equinos em Estados americanos devido a presença ou não de animais com sinais clínicos compatíveis da EME. O clima da região, considerado mais frio por estar numa área de altas altitudes, talvez apresente influência na biologia do vetor, pois os caramujos incriminados como vetores da doença são associados a climas de temperaturas mais elevadas. Além disso, as coletas foram realizadas no mesmo período em que se observa maior endemicidade da EME, demonstrando que mesmo em estação do ano compatível com pico de soroprevalência a frequência de animais positivos foi baixa (CORDES et al., 1986).

Foi observada uma soroprevalência relativamente baixa em ambos os municípios da Região Serrana (Petrópolis e Teresópolis). Estudos realizados por Moreira et al. (2013) demonstraram evidências sorológicas de *N. risticii* nos equinos do município de Petrópolis no bairro de Itaipava com frequência de 5,13% (n= 06/347). Da mesma forma, estudo realizado por Ferrão et al. (2007) observaram equinos sorologicamente reativos para *N. risticii* e com sinais clínicos, oriundos da região Serrana do Estado do Rio de Janeiro. Desta forma estes dados corroboram com o presente estudo demonstrando a possibilidade da circulação do agente na região avaliada.

Em relação à altitude da propriedade e a soropositividade dos equinos para *N. risticii* não houve associação destas variáveis, é importante destacar que ambos os municípios analisados no presente estudo apresentam altitudes acima de 500 metros do nível do mar. Este resultado difere do estudo realizado por Atwill et al. (1994) em Nova Iorque, onde os autores observaram que a ocorrência deste agente foi diretamente influenciada pela altitude das propriedades criadoras de equinos, demonstrando que áreas de baixa altitude apresentam maior quantidade de vales fluviais, o que favorece a presença de possíveis vetores. Em outras regiões do estado do Rio de Janeiro também foi possível perceber que regiões de baixas altitudes, favorecem a circulação do agente entre os equinos (ROIER, 2011).

No presente estudo a presença de caramujos na criação equestre não apresentou associação com a soropositividade nos animais, no entanto sabe-se que estes invertebrados são os principais vetores da EME sendo comprovada em estudos nos

EUA e no Brasil (REUBEL et al., 1998; BARLOUGH et al., 1998; COIMBRA et al., 2006). Embora não tenha tido associação a presença de caramujos e a soropositividade dos animais não se pode descartar a importância destes no ciclo da doença na microrregião avaliada.

Embora não tenha sido observada associação estatística entre a condição da propriedade e a positividade dos animais, observou-se que animais criados em melhores condições zootécnicas foram os mais acometidos (11,6%) contrapondo os resultados obtidos por Roier (2011) que constatou maior soropositividade em animais cujo manejo sanitário e zootécnico foi classificado como “insatisfatório”. Este achado esteve relacionado também ao sistema de criação dos equinos que, embora não tenha diferença significativa, foi observado que os animais no sistema confinado foram os mais soropositivos (9,8%). Da mesma forma, este resultado difere ao demonstrado por Kiper et al. (1992) que demonstraram que equinos criados em sistema de estabulação apresentavam um “efeito protetor” em relação aos criados extensivamente uma vez que este efeito diminui o acesso dos animais às áreas de pastagens reduzindo os riscos de contato com o agente.

Os resultados obtidos no presente estudo sobre o sistema de manejo e a condição da propriedade podem estar relacionados a questões inerentes a raça dos animais, uma vez que muitos equinos criados em propriedades com melhores condições de manejo são da raça Puro Sangue Inglês, que adotam o sistema de criação por estabulação. Logo, é provável que mais do que o fator racial atrelado a doença esteja a utilização e o manejo adotados na propriedade com esses animais, o que pode favorecer o contato destes com possíveis vetores da doença, conforme demonstrado por Atwill et al. (1992). No presente estudo foi observado que animais com raça definida apresentaram maior frequência de positividade, sem associação estatística. Este resultado, da mesma forma que o estudo de Atwill et al. (1992) pode estar demonstrando que a raça não é um fator associado a este agente, mas sim a utilização que determinadas raças possuem como finalidade.

Este resultado é confirmado quando ao analisar o tipo de utilização dos animais na propriedade, observou-se maior percentual de positividade para os animais utilizados em esporte/exposição. Vale lembrar ainda que raças envolvidas nestas atividades (esporte/exposição), na região estudada, são muitas vezes obtidas da região sul do país, área com evidências da ocorrência do agente e da doença (DUTRA et al., 2001; COIMBRA et al., 2006).

O consórcio de bovinos com equinos, apesar de não ter apresentado diferença estatística no presente estudo, em outros trabalhos é possível perceber que os bovinos apresentam a capacidade de albergar esta bactéria e, portanto podem participar do ciclo enzoótico da doença como possíveis reservatórios da EME na natureza (PUSTERLA et al., 2001). Estudos demonstram que além de bovinos, cães e os gatos também podem se infectar com esta bactéria (SUKSAWAT et al., 2001; LAPIN et al., 2006). No Brasil, até o presente momento não foi observada a presença desta bactéria em bovinos (VELHO, 2013).

Sobre o tipo de área predominante nas propriedades não houve associação entre a positividade dos animais e a presença de áreas alagadas ou rios, lagos e riachos. Roier (2011) também não observou associação desta variável e a soropositividade, mas em seu estudo a soropositividade dos animais foi mais elevada em propriedades com áreas alagadas ou que apresentavam rios, riachos ou açudes em suas pastagens. Pesquisas demonstram que a presença de rios, riachos, lagoas são fatores de risco para a infecção dos animais devido a este ambiente ser propício tanto para moluscos quanto para insetos aquáticos vinculados a transmissão (MOTT et al. 2002, GIBSON et al., 2005). A



respeito do sistema de criação dos animais, o tipo confinado foi o que apresentou maior frequência de positividade, demonstrando que o pouco ou nenhum contato destes animais com o tipo de área alagada existente na propriedade não foi um fator que influenciou na positividade dos animais nesta região como demonstrado em outros estudos (BARLOUGH et al., 1998).

Sobre os aspectos relacionados ao próprio animal, Atwill et al. (1992) demonstraram que as fêmeas eram mais susceptíveis a infecção por *N. risticii* do que os machos. Contudo muitos estudos demonstram que não há associação entre o sexo dos animais e a soropositividade para EME (OLCHOWY et al., 1990; RIKIHISA et al., 1991; GOETZ et al., 1989). Estes resultados corroboram com o obtido no presente estudo.

Em relação a idade dos animais, embora não tenha associação estatística com a soropositividade, equinos menores que um ano não apresentaram anticorpo anti-*N. risticii* (n=0/29), sendo a frequência de animais positivos maior nas faixas etárias mais elevadas. Este resultado está de acordo com o observado por Roier (2011), que não observou soropositividade em potros, além de observar nos animais mais velhos maior soroprevalência. Estudos demonstram que com o aumento da idade aumentam as chances dos animais entrarem em contato com vetores infectados pelo agente da EME (MADIGAN et al., 1989; ATWILL et al., 1992). Vale destacar que animais jovens podem ainda não apresentar anticorpos contra este agente devido a ausência de contato com o agente.

No presente estudo, outra variável analisada foi a origem dos animais. Foi possível perceber que entre as razões de frequência de animais soropositivos, observou-se que a frequência de equinos soropositivos obtidos de outras propriedades (não nascidos na própria propriedade) foi 5,8 vezes maior do que os nascidos na própria propriedade. Este resultado é reforçado quando se observa que equinos obtidos de outras regiões ou de outros estados demonstraram maior frequência de soropositividade. Logo, é possível perceber com os resultados obtidos neste estudo demonstram que a elevada positividade nos animais relacionados a região de origem pode demonstrar de forma indireta questões inerentes a positividade dos animais em regiões ou estados onde ocorra maior circulação deste agente etiológico. Este resultado corrobora com os estudos de Dutra et al. (2001) que demonstram a ocorrência de animais com sintomatologia clínica quando oriundos de áreas não endêmicas para áreas endêmicas. Assim é possível que muitos dos animais soropositivos presentes na Microrregião Serrana provenham de outras regiões ou estados do país ou até mesmo de outros países com maior circulação do agente. Com isso, a evidência sorológica observada neste estudo pode estar relacionada não só com a circulação de possíveis vetores na região, mas também com a obtenção de animais de áreas endêmicas para esta Microrregião localizada no estado do Rio de Janeiro.

## 6 CONCLUSÕES

-Evidências sorológicas demonstram que *N. risticii* circula na Microrregião Serrana do Estado do Rio de Janeiro.

-Possivelmente o agente da EME foi introduzido na microrregião Serrana do Estado do Rio de Janeiro através da aquisição de animais portadores (sintomáticos ou assintomáticos) de áreas endêmicas, sem a prévia avaliação sanitária.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, D. M.; ZHANG, X.; MELO, A. L. T.; PACHECO, T. A.; MENESES, A. M. C.; ZANUTTO, M. S.; HORTA, M. C.; SANTAREM, V. A.; CAMARGO, L. M. A.; MCBRIDE, J. W.; LABRUNA, M. B. Genetic diversity of *Ehrlichia canis* in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.164, p. 315-321, 2013.

ATWILL, E.R.; MOHAMMED, H.O.; DUBOVI, E.; LOPES, J. Retrospective evaluation of factors associated with the risk of seropositivity to *Ehrlichia risticii* in horses in New York state. **American Journal Veterinary Research**, v.53, p.1931-1934, 1992.

ATWILL, E.R.; MOHAMMED, H.O.; RUA-DOMENECH, D. L. R. Geographical variation of seropositivity to *Ehrlichia risticii* (equine monocytic ehrlichiosis) of horses in New York state. **Equine Veterinary Journal**, v. 26, p. 143–147, 1994.

BAIRD, J.D.; ARROYO, L.G. Historical aspects of Potomac horse fever in Ontario (1924–2010). **Canadian Veterinary Journal**, v. 54, p. 565–572, 2013.

BARLOUGH, J.E.; REUBEL, G.H.; MADIGAN, J.E.; VREDEVOE, L.K.; MILLER, P.E.; RIKIHISA, Y. Detection of *Ehrlichia risticii*, the Agent of Potomac Horse Fever, in Freshwater Stream Snails (Pleuroceridae: *Juga* spp) from Northern California. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.2888-2893, 1998.

BISWAS, B.; VEMULAPALLI, R.; DUTTA, S. Detection of *Ehrlichia risticii* from feces of infected horses by immunomagnetic separation and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n. 9, p. 2147-2151, 1994.

COIMBRA, H.S.; SCHUCH, L.F.D.; VEITENHEIMER-MENDES, I.L.; MEIRELES, M.C.A. *Neorickettsia (Ehrlichia) risticii* no sul do Brasil: *Heleobia* spp. (Mollusca: Hydrobilidae) e *Parapleurolophocecous cercariae* (Trematoda: Digenea) como possíveis vetores. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.3, p.325-329, 2005.

COIMBRA, H.S.; FERNANDES, C.; SOARES, M.P. MEIRELES, M.C.A.; RADAMES, R.; SCHUCH, L.F.D. Erliquiose monocítica equina no Rio Grande do Sul: Aspectos clínicos, anátomo-patológicos e epidemiológicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, p. 97-101, 2006.

COHN, L. A. Ehrlichiosis and related infections. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v. 33, np. 863–884, 2003.

CORDES, D.O.; PERRY, B.D.; RIKIHISA, Y.; CHICKERING, W.R. Enterocolitis Caused by *Ehrlichia* sp. in the Horse (Potomac Horse Fever). **Veterinary Pathology**, v. 23, p. 471- 477, 1986.

DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.J.; 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 BHGE agent as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.2145–2165, 2001.

DUTRA, F.; SCHUCH, L.D.F., DELUCCHI, E.; CURCIO, B.R. COIMBRA, H.F. RAFFI, M.B.; DELAGOSTIN, O.; RIET-CORREA, F. Equine monocytic Ehrlichiosis (Potomac horse fever) in 51 horses in Uruguay and southern Brazil. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v.13, p.433-437, 2001.

DUTTA, S.K.; RICE, R.M.; SAVAGE, P.K.; MYRUP, A.C. Detection of serum antibodies against *Ehrlichia risticii* in potomac horse fever by enzyme-linked Immunosorbent assay. **Veterinary Immunologic. Immunopathologic.**, v.14, p. 85-92, 1987.

FERRÃO, C.M.; ABOUD-DUTRA, A.E.; LOPES, R.S.; CANDEIAS, M.L.; GAZÊTA, G.S. Equine Monocytic Ehrlichiosis (EME) in Rio de Janeiro State, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.6, 1575-1578, 2007.

GIBSON K.E.; RIKIHISA Y.; ZHANG C.; MARTIN C. *Neorickettsia risticii* is vertically transmitted in the trematode *Acanthatrium oregonense* and horizontally transmitted to bats. **Environmental Microbiology**. v. 7, p. 203-212. 2005.

GOETZ, T. E.; HOLLAND, C. J.; DAWSON, J. E.; RISTIC, M.; SKIBBE, K.; KEEGAN, K. G.; JOHNSON, P. J.; SCHAEFFER, D.J.; BAKER, G. J. Monthly prevalence (in 1986) of antibody titers against equine monocytic ehrlichiosis in apparently healthy horses in Illinois. **American Journal Veterinary Research**, v. 50, n.11, 1986.

GOETZ, T.E.; HOLLAND, C.J.; DAWSON, J.E.; RISTIC, M.; SKIBBE, K.; KEEGAN, K.G.; JOHNSON, P.J.; SCHAEFFER, D.J.; BAKER, G.J. Monthly prevalence (in 1986) of antibody titers against equine monocytic ehrlichiosis in apparently healthy horses in Illinois. **American Journal Veterinary Research**, v.50, n.11, p. 1936-1939, 1989.

GORDON, J.C.; BECH-NIELSEN, S.; KOHN, C.; FARRAR, W.; PARSONS, M.; FOSTER, W. An Epidemiological Investigation of Farms with Potomac Horse Fever (Equine Monocytic Ehrlichiosis). **Acta Veterinaria Scandinavia**, v. 84, p.319-322, 1988.

HEADLEY, S. A.; SCORPIO, D. G; VIDOTTO, C.; J.; DUMLER, J. *Neorickettsia helminthoeca* and salmon poisoning disease: A review. **The Veterinary Journal**, p.1-9, 2009.

HOLLAND, C.J.; RISTIC, M.; COLE, A.I.; JOHNSON, P.; BAKER, G.; GOETZ, T. Isolation, Experimental transmission, and characterization of Causative Agent of Potomac Horse Fever. **Science**, v.227, p.522-524, 1985.

KIPER, M. L.; TRAUB-DARGATZ, J. L.; SALMAN, M. D.; RIKIHISA, Y. Risk factors for equine monocytic ehrlichiosis seropositivity in horses in Colorado. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 13, p.251-259, 1992.

KOLK, J.H., BERNADINA, W.E., VISSER, I.J.R., VAN-DER-KOLK, J.H. A horse serologically positive for *Ehrlichia risticii* in the Netherlands. *Abs. Vet. Bull*, v. 116, n. 2, p. 69-72, 1991.

LAPIN, M. R.; GRIFFIN, B.; BRUNT, J.; RILEY, A.; BURNEY, D.; HAWLEY, J.; BREWER, M. M.; JENSEN, W. A. Prevalence of Bartonella species, haemoplasma species, *Ehrlichia* species, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Neorickettsia risticii* DNA in the blood of cats and their fleas in the United States, **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 8, p. 85-90, 2006.

LONG, M.T. **Equine Monocytic Ehrlichiosis**. ROBINSON, N.E. In: *Current Therapy in Equine Medicine*, ed. Saunders, 5 ed., St. Louis, Missouri, p.74-77, 2003.

MADIGAN, J.E.; DEROCK, E.; LAVAN, R.P. Clinical significance of a recent serologic survey on the incidence of Potomac horse fever in California. In: *PROCEEDINGS 34<sup>th</sup> ANNUAL CONFERENCE EQUINE PRACTITIONERS*, 4-7 December 1988, San Diego, CA. **American Association of Equine Practitioners**, p. 571-576, 1989.

MADIGAN, J.E.; PUSTERLA, N.; JOHNSON, E.; CHAE, J.S.; PUSTERLA, J. B.; DEROCK, E.; LAWLER, S.P. Transmission of *Ehrlichia risticii*, the agent of Potomac horse fever, using naturally infected aquatic insects and helminth vectors: preliminary report. **Equine Veterinary Journal**, v. 32, p.275–279, 2005.

MCLAUGHLIN, B.; GOUGH, J. Potomac horse fever in southwestern Ontario. **Canadian Veterinary Journal**, v. 37, n. 5, p. 367, 1996.

MESSICK, J.B; RIKIHISA, Y. Inhibition of binding, entry or survival of *Ehrlichia risticii* in P388D1 cells by anti-*N. risticii* IgG and Fab fragments, **Infection Immunity**, v.62, p.3156, 1994.

MOREIRA, L.M.C.; CARDOSO, K.M.; ABOUD-DUTRA, A.E.; FERRÃO, C.M.; GAZÊTA, G.S. Frequency of Equine Monocytic Ehrlichiosis (EME) in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 6, p. 697-699, 2013.

MOTT, J.; MURAMATSU, Y.; SEATON, E.; MARTIN, C.; REED S.; RIKIHISA, Y. Molecular analysis of *Neorickettsia risticii* in adult aquatic insects in Pennsylvania, in horses infected by ingestion of insects, and isolated in cell culture. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 690-693, 2002.

MULVILLE, P. Equine Monocytic Ehrlichiosis (Potomac Horse Fever): a review. **Equine Veterinary Journal**, v. 23, n. 6, p. 400-404, 1991.

OLCHOWY, T.W.J.; AMES, T.R; MOLITOR, T.W. Serodiagnosis of equine monocytic ehrlichiosis in selected groups of horses in Minnesota. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 15, n. 12, p.1967-1970, 1990.

OLIVER, O. E.; STAMPFLI, H. Acute Diarrhea in the Adult Horse: Case Example and Review. **Veterinary Clinical Equine**, v. 22, p. 73–84, 2006.

PALMER, J.E.; WHITLOCK, R.H.; BENSON, C.E. Equine ehrlichial colitis (Potomac horse fever): Recognition of the disease in Pennsylvania, New Jersey, New York, Ohio, Idaho and Connecticut. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 189, p. 197–199, 1986.

PERRY, B.D.; SCHMIDTMANN, E.T.; RICE, R.M. Epidemiology of Potomac horse fever: An investigation into the possible role of non-equine mammals. **Veterinary Records**, v. 125, p.83–86, 1989.

PRETZMAN, C.T.; RIKIHISA, Y.; RALPH, D. Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting Potomac horse fever disease, **Journal of Clinical Microbiology**, v.25, p.31, 1987.

PUSTERLA, N.; LEUTENEGGER, C.M.; SIGRIST, B.; CHAE, J-S.; LUTZ, H.B.; MADIGAN, J.E. Detection and quantitation of *Ehrlichia risticii* genomic DNA in infected horses and snails by real-time PCR. **Veterinary Parasitology**, v.90, p. 129-135, 2000.

PUSTERLA, N.; JOHNSON, E.; CHAE, J.; PUSTERLA, J.B.; DeROCK, E.; MADIGAN, J.E. Infection rate of *Ehrlichia risticii*, the agent of Potomac Horse Fever, in freshwater stream snails (*Juga yrekaensis*) from northern California. **Veterinary Parasitology**, v.92, p.151-156, 2001.

PUSTERLA, N.; JOHNSON, E.M.; CHAE, J.S.; MADIGAN, J.E. Digenetic trematodes *Acanthatrium* sp. and *Lecithodendrium* sp., as vectors of *Neorickettsia risticii*, the agent of Potomac horse fever. **Journal of Helminthology**, v.77, p. 335–339, 2003.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2009. ISBN 3-900051-07-0, Disponível em: <http://www.R-project.org>. Acesso em 31 de janeiro de 2010.

REUBEL, G. H.; BARLOUGH, J.E.; MADIGAN, J.E. Production and Characterization of *Ehrlichia risticii*, the Agent of Potomac Horse Fever, from Snails (Pleuroceridae: *Juga* spp.) in Aquarium Culture and Genetic Comparison to Equine Strains. **Journal Of Clinical Microbiology**. v.36, n.6, p.1501-1511, 1998.

RIKIHISA, Y.; PERRY, B.D.; CORDES, D.O. Rickettsial link with acute equine diarrhea. **Veterinary Records**, v.115, p.554, 1994.

RIKIHISA, Y.; PERRY, B.D. Causative Ehrlichial organism in Potomac horse fever. **Infection and Immunity**., v. 49, n. 3, p. 513-517, 1985.

RIKIHISA, Y.; JIANG, B.M. In vitro susceptibilities of *Ehrlichia risticii* to eight antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.32, n.7, p. 986-991, 1988.

RIKIHISA, Y.; STILLS, H.; ZIMMERMAN, G. Isolation and continuous culture of *Neorickettsia helminthoeca* in macrophage cell line. **Journal Clinical Microbiology**, v.29, n.9, p.1928-1933, 1991.

RIKIHISA, Y. **Rickettsial diseases**. In: REED, S.M. & BAYLY, W.M.A. (Eds). Equine internal medicine. Philadelphia: W.B. Saunders, 1998. cap.112-123.

RISTIC, M.; HOLLAND, C.J.; DAWSON, J.E.; SESSIONS, J.; PALMER, J. Diagnosis of equine monocytic ehrlichiosis (Potomac horse fever) by indirect immunofluorescence. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.189, p.39-46, 1986.

ROIER, E.C.R. 2011. **Neorickettsia risticii: aspectos clínicos, hematológicos, sorológicos e moleculares em eqüinos na Microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro**. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro- UFRRJ.

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

SHAPIRO, J.; THOMSON, G. Potomac horse fever in eastern Ontario. **Canadian Veterinary Journal**, v. 36, p. 448, 1995.

SUKSAWAT, J.; XUEJIE, Y.; HANCOCK, S. I.; HEGARTY, B. C.; NILKUMHANG, P.; BREITSCHWERDT, E. B. Serologic and molecular evidence of coinfection with multiple vector-borne pathogens in dogs from Thailand. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 15, p. 453-462, 2001.

TIMOTHY, W.].; OLCHOWY, DVM; TREVOR R.; AMES, DVM; THOMAS MS.; MOLITOR, W. Serodiagnosis of equine monocytic ehrlichiosis in selected groups of horses in Minnesota. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 12, p. 1967-1970, 1990.

VELHO, P. B. 2013. **Detecção molecular de organismos da família Anaplasmataceae em bovinos e ovinos e caracterização genotípica de genes codificantes para proteínas de membrana de *Anaplasma marginale* do estado do Rio de Janeiro**. Tese de Doutorado, Universidade Federal Fluminense-UFF.

VIDOR, E., BISSUEL, G., MOREAU, Y., MADEC, J.L., CADRE, J.L. Positive serological reaction for *Ehrlichia risticii* in a mare showing clinical signs of equine. **Pratique-Veterinaria-Equine**, v. 20, p.10-25, 1988.

## 8 CONCLUSÕES GERAIS

- Diante do exposto conclui-se que a ausência de moluscos límnicos e trematódeos positivos para *Neorickettsia risticii* não descarta a possível circulação deste agente na população destes invertebrados presentes na região do estudo, uma vez que evidências sorológicas apontam a presença do agente na região.
- A detecção de anticorpos anti- *Neorickettsia risticii* em equinos da microrregião Serrana evidenciam a circulação do agente nesta região, fato este que pode estar relacionado a obtenção de equinos de outras regiões com a presença do agente.
- Mais estudos são necessários para elucidar o ciclo da EME no Rio de Janeiro, além da importância em analisar equinos de outras regiões do estado e determinar quais os outros fatores que podem estar relacionadas ao parasitismo por *N. risticii*.



## ANEXOS

<b>Anexo I.</b>	Questionário epidemiológico.....	77
<b>Anexo II.</b>	Protocolo para realização da RIFI ( <i>Fuller Laboratories</i> ®).....	81
<b>Anexo III.</b>	Protocolo para extração de DNA de moluscos.....	82
<b>Anexo IV.</b>	Protocolo para extração de DNA de fases larvais de trematódeo .....	83

Anexo I – Questionário epidemiológico

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS  
QUESTIONÁRIO (AO RESPONSÁVEL PELOS ANIMAIS)  
INFORMAÇÕES GERAIS SOBRE A PROPRIEDADE

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**1. Dados gerais:**

Nome da propriedade:

\_\_\_\_\_

Município de localização:

\_\_\_\_\_

Coordenadas :

\_\_\_\_\_

**2. Área da propriedade**

Total: \_\_\_\_\_ ha ou \_\_\_\_\_ alqueires

**3. Localização dos animais**

( ) só em baias ( ) só em piquetes ( ) só pasto ( ) baias e piquetes

( ) baias e pasto ( ) baias, piquetes e pasto

**4. Possui eqüinos na mesma pastagem de outros animais que não sejam equinos?**

( ) Sim ( ) Não **Quais ?**

\_\_\_\_\_

**5. Alimentação dos animais**

( ) capim ( ) feno ( ) ração

**6. Origem do capim**

( ) capineira ( ) pasto Outro: \_\_\_\_\_

**7. Cama das baias:**

( ) serragem ( ) areia e carvão ( ) nenhuma ( ) outro \_\_\_\_\_

**8. Principal forrageira do pasto:**

( ) Capim gordura ( ) Capim elefante ( ) Pangola ( ) Tifton ( ) *Coast cross*

( ) Napier ( ) Alfafa ( ) Capim nativo ( ) Outros: \_\_\_\_\_

**9. Características das áreas de pasto**

( ) seca ( ) poucas áreas alagadas ( ) muitas áreas alagas ( ) rios ( ) lagos

**10. Caramujos**

( ) Presente ( ) Ausente

**11. Os animais apresentam infestações por carrapatos**

( ) sim ( ) não qual época do ano

Método de controle \_\_\_\_\_

**12. Usa produtos carrapaticidas?**

( ) sim ( ) não

**13. Se usa, com que frequência é ou são usado(s) o(s) produto(s)?**

( ) 2x/mês ( ) 1x/mês ( ) 3 a 4 x/ano ( ) a cada 6 meses ( ) 1x/ano

( ) outro: \_\_\_\_\_

**14. Tipo de equipamento utilizado para aplicação do carrapaticida?**

Banheiros ( ) Bomba costal ( ) Pour-on ( ) Bomba mecânica ( )

**15. Quantos animais você banha com 20 litros (volume de uma bomba costal) do carrapaticida diluído? \_\_\_\_\_**

**16. Como você escolhe a dose utilizada em cada animal ?**

( ) Consulta o rótulo ( ) Consulta o Veterinário ( ) Consulta de outros criadores

( ) Consulta os vendedores de lojas de produtos veterinários

( ) outros \_\_\_\_\_

**17. Qual a procedência da água que é fornecida aos animais?**

( ) Empresa de Água ( ) Açude ( ) Canalização de córregos e riachos

( ) outra \_\_\_\_\_

**18. Número de divisões do pasto (piquetes): \_\_\_\_\_**

**19. Utiliza limpeza de pasto**

( ) sim ( ) não periodicidade: \_\_\_\_\_ método: \_\_\_\_\_

**20. Quem cuida do(s) animais?**

Veterinário: ( ) Agrônomo ( ) Zootecnista ( ) Técnico agrícola ( ) Outro ( )

**21. Ha quanto tempo existe a criação? \_\_\_\_\_**

**22. Percentual de animais nascidos na propriedade \_\_\_\_\_**

**23. Abriga animais de outras propriedades?**

( ) sim ( ) não

Ficam em áreas separadas?

( ) sim ( ) não

**24. Qual a época mais propicia ao aparecimento de doenças?**

( ) verão ( ) outono ( ) inverno ( ) primavera

**25. Quais doenças já ocorreram na propriedade?**

( ) Babesiose ( ) Cólica ( ) Diarréia ( ) Aparelho Locomotor

( ) outra \_\_\_\_\_

**26. Quais doenças consideram mais importantes**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**27. Qual o tratamento utilizado para as doenças?** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**28. Quantos animais morreram nos últimos anos?** \_\_\_\_\_

**29. Caso tenha morrido, quais foram as causas?**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**INFORMAÇÕES SOBRE O ANIMAL**

**Propriedade:** \_\_\_\_\_ **Região:** \_\_\_\_\_ **Data:** \_\_\_\_ / \_\_\_\_ /

\_\_\_\_\_

**1. Nome:** \_\_\_\_\_

**2. Sexo:** ( ) Macho ( ) Fêmea

**3. Idade:** \_\_\_\_\_

**4. Raça:** \_\_\_\_\_

**5. Origem do animal**

( ) nascido na propriedade ( ) externa Procedência

\_\_\_\_\_

**6. Há quanto tempo o animal está na propriedade?**

( ) menos de 1 mês ( ) de 1 mês a seis meses ( ) acima de 6 meses

**7. Utilização do animal**

( ) Passeio ( ) Reprodução ( ) Esporte ( ) Exposição ( )

outra \_\_\_\_\_

**8. Alguma doença atual?**

( ) sim ( ) não Qual?

---

**9. Este animal está tomando algum medicamento ou tomou há pouco tempo?**

( ) Sim ( ) Não - Caso esteja, qual? ( ) Imizol ( ) Antibióticos Outros ( )  
Quais? \_\_\_\_\_

**25. Este animal apresenta carrapatos?**

( ) sim ( ) não Qual/Quais?

---

Grau de infestação: \_\_\_\_\_ Espécie:

---

**26. Este animal apresenta outros parasitos?**

( ) sim ( ) não Qual/Quais?

---

Grau de infestação: \_\_\_\_\_

## **Anexo II-** Protocolo para realização da RIFI (*Fuller Laboratories®*)

O kit fornece os controles positivos e negativos e foram dispostos em cada lâmina, desta forma utilizou-se apenas 10 poços para proceder as análises. Para essa técnica, foi considerada a titulação de 1:50 onde utilizou-se 2 µL de cada amostra de soro testado, diluídos em 48 µl de tampão salina fosfatado (PBS). Após esse procedimento retirou-se 10 µl de cada diluição e as amostras foram dispostas em cada um dos 12 orifícios presentes nas lâminas. Após a pipetagem das amostras, as lâminas foram armazenadas em câmara úmida em estufa bacteriológica a 37°C durante 30 minutos. Seguindo a metodologia, as lâminas foram lavadas com PBS, e armazenadas por 10 min neste tampão. Quando secas, em cada orifício foi adicionado uma gota de conjugado, e novamente as lâminas foram postas em câmara úmida por 30 minutos a 37°C, e então as lâminas foram novamente lavadas e secas no ambiente, posteriormente foi adicionado as lamínulas pequenas gotas de glicerina.

**Anexo III-** Protocolo para extração de DNA de moluscos (*Wizard® Genomic DNA Purification Kit from tissue*)

- 1- Macerar o tecido previamente com bastão de vidro.
  - 1.1- Neste momento acondicionar a solução de lise no gelo
- 2- Pesar o tecido (10 a 15 mg para glândula digestiva e complexo glândula digestiva-ovotestis e 20-30 mg para massa cefalopodal e cavidade respiratória).
- 3- Adicionar 600 µl de Solução de Lise Nuclear (previamente gelada) no macerado e vortexar por 10 segundos.
- 4- Incubar o lisado a 65 °C durante 30 minutos (com agitação de 9 em 9 min a 850 rpm por 20 segundos).
- 5- Adicionar 17.5µl de 20mg/ml Proteinase K.
- 6- Incubar durante 3 horas a 55 °C (com agitação de hora em hora a 850 rpm por 20 segundos).
- 7- Adicionar 3 µl de RNase e misturar por inversão 2-5 vezes, incubar a mistura por 30 min a 37 °C (sob agitação de 9 em 9 min a 850 rpm por 20 seg). Deixar esfriar a temperatura ambiente por 5 min.
- 8- Adicionar 200 µl de Solução de Precipitação Proteica e vortexar vigorosamente em alta velocidade por 20 segundos e deixar no gelo por 5 min.
- 9- Centrifugar por 4 minutos a 16.000g. A proteína precipitada formará um sedimento branco.
- 10- Cuidadosamente remover o sobrenadante contendo o DNA (deixando o pelete) e transferi-lo para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml limpo, contendo 600µl de isopropanol.
- 11- Centrifugar por 1 minuto a 16.000g.
- 12- Descartar cuidadosamente a sobrenadante.
- 13- Adicionar 600µl de etanol 70%, e inverter gentilmente o tubo várias vezes para lavar o DNA. Centrifugar por 1 minuto a 16.000g.
- 14- Adicionar 600µl de etanol 70%, e inverter gentilmente o tubo várias vezes para lavar o DNA. Centrifugar por 1 minuto a 16.000g.
- 15- Aspirar cuidadosamente o etanol usando uma pipeta. O DNA é muito solto neste ponto, e cuidados devem ser utilizados para evitar aspirar o sedimento.
- 16- Retirar o etanol e deixar secar por 10-15 minutos.
- 17- Adicionar 100 µl de Tampão de eluição

**Anexo IV-** Protocolo para extração de DNA de fases larvais de trematódeos  
(*Wizard® Genomic DNA Purification Kit from tissue*)

- 1- Centrifugar a 6.000 x g por 4 min.
- 2- Adicionar 600 µl de Solução de Lise Nuclear (previamente gelada) no sedimento.
- 3- Incubar o lisado a 65 °C durante 30 minutos (com agitação de 9 em 9 min a 850 rpm por 20 segundos).
- 4- Adicionar 17.5µl de 20mg/ml Proteinase K.
- 5- Incubar durante 3 horas a 55 °C (com agitação de hora em hora a 850 rpm por 20 segundos).
- 6- Adicionar 3 µl de RNase e misturar por inversão 2-5 vezes, incubar a mistura por 30 min a 37 °C (sob agitação de 9 em 9 min a 850 rpm por 20 seg). Deixar esfriar a temperatura ambiente por 5 min.
- 7- Adicionar 200 µl de Solução de Precipitação Proteica e homogeneizar por inversão.
- 8- Centrifugar por 4 minutos a 16.000g. A proteína precipitada formará um sedimento branco.
- 9- Cuidadosamente remover o sobrenadante contendo o DNA (deixando o pelete) e transferi-lo para um tubo de microcentrifuga de 1,5 ml limpo, contendo 600µl de isopropanol.
- 10- Centrifugar por 1 minuto a 16.000g.
- 11- Descartar cuidadosamente a sobrenadante.
- 12- Adicionar 600µl de etanol 70%, e inverter gentilmente o tubo várias vezes para lavar o DNA. Centrifugar por 1 minuto a 16.000g.
- 13- Aspirar cuidadosamente o etanol usando uma pipeta. O DNA é muito solto neste ponto, e cuidados devem ser utilizados para evitar aspirar o sedimento.
- 14- Retirar o etanol e deixar secar por 10-15 minutos.
- 15- Adicionar 80 µl de Tampão de eluição.