

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

**TESE**

***Neorickettsia risticii*: Aspectos Clínicos, Hematológicos,  
Sorológicos e Moleculares em Equinos na Microrregião de  
Itaguaí, Rio de Janeiro.**

**ERICA CRISTINA ROCHA ROIER**

**2011**



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

***Neorickettsia risticii*: ASPECTOS CLÍNICOS, HEMATOLÓGICOS,  
SOROLÓGICOS E MOLECULARES EM EQUINOS NA  
MICRORREGIÃO DE ITAGUAÍ, RIO DE JANEIRO.**

**ERICA CRISTINA ROCHA ROIER**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Carlos Luiz Massard**

*e Co-orientação da Professora*  
**Cristiane Divan Baldani**

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

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2011

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

**ERICA CRISTINA ROCHA ROIER**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências** no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Sanidade Animal.

TESE APROVADA EM 28/02/2011

---

Carlos Luiz Massard. *DSc.* UFRRJ  
(Orientador)

---

Romário Cerqueira Leite *Ph.D.* UFMG

---

Guido Fontgalland Coelho Linhares *Ph.D.* UFG

---

Jairo Dias Barreira *Ph.D.* UNIRIO

---

Laerte Grisi *Ph.D.* UFRRJ

## DEDICATÓRIA

A Deus, por ter sido meu guia, meu escudo e meu protetor ao longo de toda a jornada.

À minha mãe, **Claudete Rocha Roier**, que infelizmente partiu antes do fim deste trabalho, que me ensinou o verdadeiro sentido da palavra “valentia”. Obrigada pelo incentivo constante, pelo apoio, pelo amor, e por ter me guiado até aqui.

Ao meu pai, **Arno José Roier**, por me ensinar que as melhores coisas da vida são as mais simples e que nada se faz sem amor.

À minha pequena, **Maria Luiza Roier de Figueiredo**, que chegou de repente e iluminou toda a minha vida, trazendo sentido na hora que eu mais precisava.

Ao meu marido, **Marcus Vinícius de Figueiredo**, companheiro de tantas batalhas, obrigada pelo amor e pela compreensão em mais esta etapa.

Ao meu irmão, **Frederico Marcelo Rocha Roier**, amigo fiel e paciente, mais uma vez obrigado.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela oportunidade de realização do Curso de Doutorado em Ciências Veterinária.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos, que foi fundamental nesta jornada.

Ao Professor Dr. Carlos Luiz Massard, pela orientação na execução deste trabalho, pelos ensinamentos recebidos, pelo apoio, incentivos, conselhos e pela convivência.

À Dra. Cristiane Divan Baldani, pela co-orientação neste trabalho, pelo apoio e pela amizade.

Ao Dr. Gilberto Salles Gazêta da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) pelo fornecimento de lâminas de RIFI para *N. risticii*.

Ao amigo Marcus Sandes Pires (Marquinhos), “amigo que se tornou irmão, que me apoiou e incentivou incondicionalmente, em todas as etapas, cujo empenho e dedicação foram imprescindíveis para a realização deste trabalho. Obrigada pela amizade e pelo carinho”.

Ao amigo Huarrisson Azevedo Santos, pela grande ajuda na execução do projeto e pelo companheirismo diário. Obrigada por me ensinar o sentido das palavras paciência e tolerância.

Ao amigo Tiago Marques dos Santos, por mais esta etapa que concluímos juntos, pela companhia e pela grande ajuda.

Aos colegas de laboratório Joice Aparecida Rezende Vilela, Larissa Moraes e Diogo Camarinha pelo auxílio nas coletas e no processamento das amostras.

Aos demais colegas de laboratório que tornaram a convivência diária mais leve e a rotina mais amena.

Aos Professores do Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias que contribuíram para minha formação profissional.

Aos colegas do Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias pela convivência e pela companhia.

Aos funcionários do curso e do Departamento de Parasitologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela ajuda e colaboração.

A todos os meus amigos que compreenderam minha ausência e que mesmo distantes me apoiavam nas horas que eu mais precisava.

## RESUMO

ROIER, Erica Cristina Rocha. *Neorickettsia risticii*: aspectos clínicos, hematológicos, sorológicos e moleculares em equinos na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro. 2011. 43p. Tese. (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

O presente estudo teve por objetivo avaliar a prevalência de anticorpos contra *Neorickettsia risticii* em equinos na microrregião de Itaguaí-RJ, demonstrar os possíveis fatores associados e identificar o agente através de técnicas moleculares. O estudo foi conduzido nos municípios de Seropédica, Itaguaí e Mangaratiba, estado do Rio de Janeiro. As 350 amostras de sangue foram obtidas por conveniência, das propriedades de criação de equinos pertencentes à região. O teste sorológico foi realizado através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *N. risticii*, sendo consideradas positivas amostras com título  $\geq 1:50$ . Para avaliação dos fatores de risco associados à presença de anticorpos de *N. risticii*, aplicou-se um questionário epidemiológico com os proprietários e/ou responsáveis dos animais, destacando características da propriedade e manejo dos animais. Realizou-se hemograma e avaliação clínica de todos os animais. As análises moleculares através da técnica de Real Time PCR foram realizadas a partir de capa leucocitária. A prevalência de anticorpos anti-*N. risticii* em equinos da microrregião de Itaguaí foi de 26,3% (92/350) pela RIFI. As frequências de anticorpos IgG anti-*N. risticii* foram 52,2% (48/92) para titulações de 1:50, zero para titulações de 1:100, 13% (12/92) para títulos de 1:200, 28,3% (26/92) para títulos de 1:400 e 6,5% (6/92) para títulos de 1:800. A idade e o nível de qualidade das propriedades apresentaram associação ( $p < 0,05$ ) com a soropositividade dos equinos para *N. risticii*. Não foi detectado o DNA de *N. risticii* nas amostras do presente estudo. Também não foram evidenciadas alterações significativas na avaliação clínica dos animais, em relação à soropositividade para o agente. Apesar de haver associação ( $p < 0,05$ ) entre a soropositividade dos animais e alterações no leucograma dos animais negativos, estas alterações não estiveram fora dos limites de referência para a espécie animal avaliada. A existência de equinos soropositivos para *N. risticii* indica a circulação desse agente na microrregião de Itaguaí.

**Palavras chaves:** *Neorickettsia risticii*, Erliquiose Monocítica Equina, Equinos, Epidemiologia.

## ABSTRACT

ROIER, Erica Cristina Rocha. *Neorickettsia risticii*: **clinical, hematological, serological and molecular techniques in horses in the microregion of Itaguaí, Rio de Janeiro**. 2011. 43p. Tesis. (Doctor in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

This study aimed to evaluate the prevalence of antibodies against *Neorickettsia risticii* in horses in the microregion of Itaguaí RJ, show possible associated factors and identify the agent by molecular techniques. The study was conducted in the districts of Seropédica, Itaguaí and Mangaratiba, Rio de Janeiro. The 350 blood samples were obtained by convenience from horse properties belonging to the region. Serologic testing was performed by Immunofluorescence Assay (IFAI) for *N. risticii*, being considered positive samples titer  $\geq$  1:50. To evaluate risk factors associated with the presence of antibodies to *N. risticii* an epidemiological questionnaire was applied to the owners or guardians of animals, which aimed especially farm characteristics and management of animals. Hematological and clinical evaluation was performed for all animals. Molecular analysis by a Real Time PCR was performed from leukocyte cover. The prevalence of antibodies anti-*N.risticii* in horses of the region of Itaguaí was 26.3% (92/350). The frequencies of IgG anti-*N.risticii* were 52.2% (48/92) for titers of 1:50, zero for titers of 1:100, 13% (12/92) for titles of 1:200, 28.3% (26/92) for evidence of 1:400 and 6.5% (6 / 92) for titles of 1:800. The age and quality level of the properties were associated ( $p < 0.05$ ) with horses seropositivity for *N. risticii*. DNA from *N. risticii* was not detectable in samples of this study. Also no significant changes in the clinical evaluation of animals was found in relation to seropositivity for the agent. Despite showing association ( $p < 0.05$ ) between the seropositivity of the animals and changes in white blood cell of negative animals, these changes were not outside reference limits for the species evaluated. The existence of horses seropositive for *N. risticii* indicates the presence of this agent in the microregion of Itaguaí.

**Key words:** *Neorickettsia risticii*, Ehrlichiosis Monocytic Equine, Horses, Epidemiology.

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b>	Área dos municípios e população de equinos da microrregião de Itaguaí do estado do Rio de Janeiro	Pg. 9
------------------	---	----------



## LISTA DE FIGURAS

	Pg.
<b>Figura 1.</b> Detalhamento dos pontos de coleta na Microrregião de Itaguaí, RJ (em maior escala). Localização da microrregião de Itaguaí, na mesorregião metropolitana do Rio de Janeiro (em menor escala).....	10
<b>Figura 2.</b> Curva de dissociação do controle positivo de <i>N. risticii</i> utilizado na reação de qPCR.....	27

## LISTA DE TABELAS

		Pg.
<b>Tabela 1.</b>	Frequência de anticorpos anti- <i>Neorickettsia risticii</i> nas titulações de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 em equinos através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) na microrregião de Itaguaí.....	14
<b>Tabela 2.</b>	Frequência de anticorpos anti- <i>Neorickettsia risticii</i> nas titulações de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 em equinos através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função do município avaliado.....	16
<b>Tabela 3.</b>	Frequência de anticorpos anti- <i>Neorickettsia risticii</i> nas titulações de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 em equinos através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função do sexo.....	16
<b>Tabela 4.</b>	Frequência de anticorpos anti- <i>Neorickettsia risticii</i> nas titulações de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 em equinos através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função da idade.....	17
<b>Tabela 5.</b>	Frequência de anticorpos anti- <i>Neorickettsia risticii</i> nas titulações de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 em equinos através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função da raça.....	18
<b>Tabela 6.</b>	Frequência de anticorpos anti- <i>Neorickettsia risticii</i> nas titulações de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 em equinos através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função do tipo de área.....	19
<b>Tabela 7.</b>	Frequência de anticorpos anti- <i>Neorickettsia risticii</i> nas titulações de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 em equinos através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função da presença ou ausência de caramujos.....	19
<b>Tabela 8.</b>	Frequência de anticorpos anti- <i>Neorickettsia risticii</i> nas titulações de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 em equinos através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função da frequência de acesso dos animais a pastagem.....	20
<b>Tabela 9.</b>	Frequência de anticorpos anti- <i>Neorickettsia risticii</i> nas titulações de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 em equinos através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função do nível de qualidade da propriedade.....	20
<b>Tabela 10.</b>	Frequência de anticorpos anti- <i>Neorickettsia risticii</i> nas titulações de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 em equinos através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função da utilização dos animais.....	21
<b>Tabela 11.</b>	Frequência de anticorpos anti- <i>Neorickettsia risticii</i> nas titulações de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 em equinos através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função da origem dos animais.....	22
<b>Tabela 12.</b>	Frequência de anticorpos anti- <i>Neorickettsia risticii</i> nas titulações de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 em equinos através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função dos parâmetros clínicos dos animais.....	23

<b>Tabela 13.</b> Eritrograma, leucograma, sólidos totais e fibrinogênio de equinos soropositivos e soronegativos para <i>Neorickettsia risticii</i> através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	24
---	----

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	2
2.1 Histórico .....	2
2.2 Posição Taxonômica .....	2
2.3 Epidemiologia .....	3
2.3.1 Distribuição Geográfica e Soroprevalência .....	3
2.4 Agente .....	3
2.4.1 Bacteriologia .....	3
2.4.2 Metabolismo de <i>N. risticii</i> .....	4
2.5 Patogenia .....	4
2.5.2 Transmissão .....	5
2.5.2.1 Modo de transmissão .....	5
2.5.2.2 Possíveis vetores .....	5
2.5.2.2.1 Carrapatos .....	6
2.5.2.2.2 Morcegos .....	6
2.5.4 Sintomatologia clínica e achados hematológicos .....	7
2.6 Diagnóstico .....	7
2.6.1 Diagnóstico sorológico .....	7
2.6.2 Cultivo celular .....	8
2.6.3 Diagnóstico molecular .....	8
2.7 Tratamento e Prevenção .....	8
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	9
3.2 – Tamanho da Amostra .....	9
3.3 - Questionários .....	10
3.4 Avaliação Clínica .....	11
3.5 Coleta de Sangue .....	11
3.6 Análises Hematológicas .....	11
3.7 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) .....	12
3.8 Real Time PCR (q-PCR) .....	12
3.8.1 Extração de DNA a partir de amostras de sangue e Real Time PCR .....	12
3.8.2 Obtenção do controle positivo .....	13
3.8.3 Real Time PCR (qPCR) .....	13
3.9 Análise Estatística .....	13
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	14
5 CONCLUSÕES .....	28
6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	29
7 ANEXOS .....	37
ANEXO A: Questionário Epidemiológico .....	37
ANEXO B: Gráficos dos parâmetros hematológicos .....	40
ANEXO C: Protocolo de extração de DNA de <i>N. risticii</i> a partir de cultivo de células DH82 fixadas em lâminas preparadas para Imunofluorescência com auxílio do kit de extração de DNA (DNeasy Tissue Kit, Qiagen, Valencia, CA, USA) .....	43

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Neorickettsia* pertence à família Anaplasmataceae que está incluída na ordem Rickettsiales (DUMLER et al., 2001). *Neorickettsia risticii*, uma bactéria que possui afinidade por monócitos (RIKIHISA et al., 1985), é agente da Erliquiose Monocítica Equina EME, doença infecciosa não contagiosa, que em equinos causa doença severa, onde os animais podem apresentar depressão, febre, anorexia, diarreia aquosa, cólica e laminite.

A EME foi descrita pela primeira vez em 1979, no estado de Maryland, Estados Unidos, em pastagens ao longo do rio Potomac, sendo por este motivo conhecida como “Febre do Cavalo do Potomac” (Potomac Horse Fever) (RIKIHISA; PERRY, 1985). A EME já foi descrita em nos EUA, Uruguai, Brasil e em alguns países da Europa, onde apresenta tendência sazonal e endêmica, com pico de ocorrência nos meses mais quentes do ano e em regiões alagadiças.

A EME é uma doença economicamente importante devido a taxas de morbidade e mortalidade significativas em populações de equinos, principalmente animais provenientes de áreas livres introduzidos em áreas endêmicas.

No Brasil não existem dados de soroprevalência para EME, somente evidências sorológica e molecular no Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, respectivamente. Nos EUA a soroprevalência varia de 7,5% a 76% dependendo da região e da época do ano (ATVILL et al., 1996).

O primeiro relato de evidência sorológica da EME no estado do Rio de Janeiro foi comunicado por Ferrão et al. (2007), em amostras de animais provenientes das regiões metropolitana e serrana do estado.

O diagnóstico da EME é realizado através da sintomatologia clínica e de testes laboratoriais, entre eles testes sorológicos como reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático (ELISA), cELISA e western immunoblotting que são utilizados para a detecção de anticorpos anti-*N. risticii* (HOLLAND et al., 1985; DUTTA et al., 1985).

Vários estudos indicam a RIFI como um teste de escolha para o diagnóstico de *N. risticii*, tanto pela sua praticidade quanto pela sua especificidade (DUTTA et al., 1987; HOLLAND et al., 1985; RIKIHISA; PERRY, 1985).

O presente estudo teve por objetivos avaliar a prevalência de anticorpos IgG anti-*N. risticii* em equinos na microrregião de Itaguaí, além de identificar possíveis fatores associados à positividade para *N. risticii*, como sexo, idade, raça, presença ou ausência de áreas alagadas e caramujos nas propriedades, tipo de acesso à pastagem, nível de qualidade da propriedade, utilização dos animais, assim como parâmetros clínicos e hematológicos dos equinos avaliados; e identificar o agente através de técnicas moleculares.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Histórico

O primeiro relato da Erliquiose Monocítica Equina (EME) na América do Sul foi em 1948 no Uruguai, onde estudando outra doença de cavalos, a anemia infecciosa equina, pesquisadores verificaram o potencial infeccioso de uma “diarréia endêmica” e sua capacidade de transmissão entre equinos e asininos através de transfusão sanguínea. Desde então, no sul do Brasil e Uruguai, a EME vem sendo reconhecida como um importante problema para equinos em áreas próximas a lagos e rios. Entre 1939 e 1941, em uma fazenda no Uruguai, 55 cavalos vieram a óbito com sinais clínicos desta “diarréia endêmica”, sendo que 17 destes equinos eram nativos da região e 38 importados. Isto sugere um grave problema em relação à introdução de animais provenientes de áreas livres da doença em regiões endêmicas para EME (CASSAMAGNAGHI; CASSAMAGNAGHI, 1948 apud DUTRA et al., 2001).

A “Febre do Cavalo do Potomac” (Potomac Horse Fever) foi reconhecida inicialmente em 1979, ao longo do rio Potomac, no Condado de Montgomery, Maryland, EUA (KNOWLES et al., 1983). Entre 1979 e 1984 foram relatados 402 casos clínicos e destes 107 animais morreram com sinais clínicos característicos desta doença em Maryland. Outros focos foram observados na Virgínia e na Pensilvânia, além de casos esporádicos que foram detectados em outros 29 estados americanos (ROBL, 1985). A partir da identificação da doença (KNOWLES et al., 1983) e sua reprodução através da administração de sangue total de equinos com sinais clínicos em equinos sadios (WHITLOCK et al., 1984), a evidência sorológica de uma riquetsia envolvida (JENNY, 1984) foi seguida pela evidência microscópica de um organismo riquetsial localizado na parede do cólon maior de equinos (RIKIHISA; PERRY et al., 1985). Após a confirmação desses achados o novo organismo descoberto foi denominado *Ehrlichia risticii* por Holland et al. (1985) e renomeado *Neorickettsia risticii* (DUMLER et al., 2001).

O termo Erliquiose Monocítica Equina (EME) foi proposto por Holland et al. (1985) para substituir “Febre do Cavalo do Potomac” devido à ocorrência da doença em outras áreas dos EUA e para distinguir de outra erliquiose equina causada por *Anaplasma phagocytophilum* (= *Ehrlichia equi*), a Erliquiose Granulocítica Equina (EGE).

O gênero *Neorickettsia* pertence à família Anaplasmataceae que está incluída na ordem Rickettsiales (DUMLER et al., 2001). Atualmente existem três espécies reconhecidas: *N. risticii*, *N. sennetsu* e *N. helminthoeca*, que parasitam tanto trematódeos quanto mamíferos.

Nos mamíferos, essas bactérias são encontradas no interior de vacúolos no citoplasma, principalmente em monócitos no sangue e em macrófagos nos tecidos. *N. helminthoeca* é o agente da “intoxicação pelo salmão” em canídeos domésticos e silvestres, que pode também acometer humanos (RIKIHISA et al., 1991). *N. sennetsu* é o agente da Erliquiose Humana no Japão e em outras partes da Ásia e *N. risticii* é o agente da Erliquiose Monocítica Equina (EME). Ocorre imunidade cruzada entre esses três agentes, sendo que a inoculação de *N. sennetsu* confere proteção contra EME em equinos (RIKIHISA; JIANG, 1988; RIKIHISA, 2004).

### 2.2 Posição Taxonômica

Domínio Eubacteria (Haeckel, 1894) C.R. Woese et al., 1990

Filo Proteobacteria Garrity et al., 2005

Classe Alphaproteobacteria Garrity et al., 2006

Ordem Rickettsiales (Gieszczykiewicz, 1939) Dumler et al., 2001

Família Anaplasmataceae (Philip, 1957) Dumler et al., 2001

Gênero *Neorickettsia* Pretzman et al., 1995

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

## 2.3 Epidemiologia

### 2.3.1 Distribuição Geográfica e Soroprevalência

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. Foi então estabelecido que esta “diarreia” era de fato Erliquiose Monocítica Equina, possivelmente veiculada na região estudada por caramujos do gênero *Pomacea* spp.

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. Essas evidências sugerem que a EME presente no Sul do Brasil um caráter endêmico e sazonal como é descrita nos Estados Unidos (COIMBRA et al., 2006).

A prevalência da EME nos Estados Unidos é bastante variável sendo detectada em vários estados americanos, existindo uma relação com localização geográfica e sazonalidade. Os casos clínicos e a prevalência sorológica exibem uma tendência sazonal, com picos ocorrendo em julho, agosto e setembro (PALMER et al., 1986)

No estado de Illinois a soroprevalência para *N. risticii* demonstrou tendência sazonal, variando de 16% em junho a 62% no mês de agosto em cavalos aparentemente saudáveis (GOETZ et al., 1989).

Em Nova York, num estudo com 2579 equinos foi obtida prevalência de 86% de anticorpos anti-*N. risticii* em regiões próximas ao Rio Hudson em animais sem sintomatologia clínica característica de EME (ATWILL et al., 1992). Nos estados de Minnesota e Ohio, as taxas de prevalência anuais foram de 26,6% e 20% respectivamente, com maiores prevalências obtidas nos meses de julho e agosto (OLCHOWY et al., 1990; RIKIHISA et al., 1990).

Gordon et al. (1988) realizaram uma investigação epidemiológica em duas fazendas, localizadas numa área de Ohio com histórico de três mortes de equinos por EME, com ênfase no papel de artrópodes, aves e pequenos mamíferos como possíveis reservatórios para *N. risticii*. Dos 37 animais testados pela RIFI, 24 (64,9%) foram positivos para *N. risticii*. Dos demais animais avaliados como possíveis reservatórios, as aves foram todas negativas e dos mamíferos avaliados, somente o *Peromyscus* spp foi positivo para *N. risticii* pela técnica da RIFI, podendo atuar como reservatório na região estudada.

Atualmente, é conhecida a evidência sorológica de *N. risticii* em 43 estados dos Estados Unidos, duas províncias (Ontário e Saskatchewan) no Canadá, França, Itália, Venezuela, Índia, Austrália, Uruguai e Brasil (PALMER et al., 1986; BREIDER; HENTON, 1987; DUTRA et al., 2001; FERRÃO et al., 2007).

## 2.4 Agente

### 2.4.1 Bacteriologia

Os membros do gênero *Neorickettsia* são bactérias intracelulares obrigatórias com tropismo por células hematopoiéticas, que pertencem à subdivisão das  $\alpha$ -Proteobactérias. São células cocóides ou pleomórficas que residem em vacúolos citoplasmáticos no interior de macrófagos e células epiteliais glandulares intestinais de cães, equinos, morcegos e humanos. São bactérias gram negativas, sem motilidade, que se multiplicam por divisão binária e formam agregados dentro dos vacúolos, apresentando morfologicamente características de mórula (RIKIHISA, 2004).

*N. risticii* é um pequeno coco que tende a ocupar um dos lados do citoplasma, ao invés de ser simétrica ou uniformemente distribuída. É um organismo que geralmente exibe uma forma arredondada, mas em cultivo celular pode assumir um formato mais alongado, além de

assumir uma coloração que varia do azul escuro ao roxo com o corante de Romanowsky (RIKIHISA, 2004).

*N. risticii* ocorre em pelo menos duas formas distintas: pequenos organismos múltiplos (0,2 a 0,4  $\mu\text{m}$ ) formando um agregado (mórula) envolvido pela membrana do hospedeiro (mórulas) e formas grandes (0,8 a 1,5  $\mu\text{m}$ ) individualmente envolvidas pela membrana do hospedeiro (RIKIHISA et al., 1985).

#### 2.4.2 Metabolismo de *N. risticii*

A atividade metabólica de *N. risticii* é semelhante à de outros membros da família Rickettsiae. Realiza metabolismo aeróbico, não utiliza glicose, possui excelente atividade em pH de 7,2 a 8,0, que declina rapidamente em pH inferior a 7,0. Pode usar glutamina ou glutamato para gerar trifosfato de adenosina, preferencialmente glutamina devido a sua melhor penetração no fagossomo em relação ao glutamato, possibilitando assim a melhor expressão da sua atividade metabólica (WEISS et al., 1988).

#### 2.5 Patogenia

*N. risticii* infecta monócitos e possui afinidade por células da parede intestinal, especialmente ceco e cólon maior de equinos, mas pode ser encontrada ocasionalmente no jejuno e cólon menor, em macrófagos e na cripta das glândulas intestinais (OLIVER; STÄMPFLI, 2006).

O período de incubação é de aproximadamente 1 a 3 semanas (WHITLOCK et al., 1984). É possível isolar *N. risticii* em monócitos de sangue periférico de equinos 6 a 11 dias após a ingestão de insetos aquáticos adultos que contenham trematódeos infectados pelo parasito (MOTT et al., 2002), e a parasitemia persiste por 1 a 2 semanas após o desaparecimento dos sintomas clínicos (RIKIHISA et al., 1993).

*N. risticii* persiste por um longo período de tempo nas células da parede intestinal de equinos clinicamente recuperados da doença, já tendo sido reisolada de células intestinais dois meses após a infecção experimental (RIKIHISA, 2004).

A diarreia aquosa é causada por uma redução no transporte de sódio e cloreto, o que reduz a reabsorção de água, principalmente no cólon maior e menor. As células do epitélio intestinal infectadas por *N. risticii* perdem as microvilosidades, o que contribui para alterações no transporte de eletrólitos e na reabsorção de água (RIKIHISA et al., 1992).

Células hospedeiras infectadas com *N. risticii* sofrem lise celular somente quando seu citoplasma está completamente preenchido por organismos infecciosos. Além da lise celular a liberação de *N. risticii* parece ocorrer também por exocitose através da fusão da membrana de inclusão do fagossomo com a membrana plasmática. No epitélio intestinal estes organismos parecem ser transmitidos entre as células por uma exocitose acoplada em uma célula e uma endocitose na célula adjacente, o que ocorre devido à disposição das células do epitélio intestinal em uma monocamada conectadas por junções intercelulares (RIKIHISA, 2004).

Ao contrário de outras bactérias gram negativas, *N. risticii* não promove ativação de macrófagos *in vitro*, induz somente a produção de baixos níveis de fator de necrose tumoral e de prostaglandina E<sub>2</sub> pelos macrófagos. Por outro lado, os macrófagos infectados produzem grandes quantidades de Interleucina-1, o que pode estar diretamente relacionado com a patogenia da doença (VAN HEECKEREN et al., 1993). Esta diferença pode ser ocasionada devido à falta de lipopolissacarídeos de *N. risticii*, que em geral, não produz uma reação inflamatória significativa nos tecidos dos animais afetados (RIKIHISA et al., 1985)

Animais que se recuperam da doença clínica desenvolvem uma imunidade de no mínimo 20 meses (MESSICK; RIKIHISA, 1994). Esta proteção parece ser devido à resposta imune humoral e mediada por células que *N. risticii* desencadeia, induzindo a produção de



anticorpos específicos tanto em infecções naturais quanto experimentais, independente da presença de sinais clínicos.

Poucos dias após a infecção ocorre uma resposta mediada por IgM que dura no máximo 2 meses (PRETZMAN et al., 1987).

Existem três mecanismos de neutralização de anticorpos. No primeiro mecanismo os anticorpos bloqueiam a ligação de *N. risticii* ao receptor específico. No segundo mecanismo o anticorpo inibe diretamente o metabolismo erliquial, e o terceiro mecanismo é anticorpo-dependente mediado pela citotoxicidade celular.

## **2.5.2 Transmissão**

### **2.5.2.1 Modo de transmissão**

O modo de transmissão de *N. risticii*, seus vetores e sua manutenção na natureza ainda não estão completamente elucidados. Estudos experimentais demonstraram que a EME pode ser transmitida via transfusão sanguínea, sendo que os equinos também são sensíveis à infecção pelas vias subcutânea, intradérmica e oral (HOLLAND et al., 1985; DUTTA et al., 1988; PALMER; BENSON, 1998).

Devido à semelhança genética com riquetsias de transmissão oral (*Neorickettsia sennetsu* e *N. helminthoeca*), foi sugerido que a *N. risticii* acompanha o padrão de transmissão oral, intermediado por trematódeos aquáticos (RIKIHISA, 1998; BARLOUGH et al., 1998; PUSTERLA et al., 2000a; KANTER et al., 2000).

Diversos estudos relacionam a transmissão de *N. risticii* ao ciclo biológico de trematódeos de ambiente aquático veiculados por caramujos de diferentes espécies (BARLOUGH et al., 1998; PUSTERLA et al., 2000a; KANTER et al., 2000; MOTT et al., 2002) e por larvas aquáticas de insetos adultos que realizam a postura próximo ou na superfície da água (MOTT et al., 2002; CHAE et al., 2000).

A detecção de *N. risticii* nas fezes de equinos infectados através do método de separação imunomagnético e PCR (BISWAS et al., 1994) reforça a idéia do padrão de transmissão oral, possivelmente com um hospedeiro intermediário envolvido. Dessa forma, o agente pode estar relacionado às fases de vida do trematódeo, que para o fechamento de seu ciclo biológico necessita de hospedeiros intermediários, onde se desenvolvem as fases imaturas, e de um hospedeiro definitivo, que alberga o parasita adulto. O ciclo biológico de um trematódeo pode ser composto de um ou mais hospedeiros intermediários, compreendendo moluscos e/ou insetos, e um animal vertebrado como hospedeiro definitivo (OLSEN, 1974).

Foi demonstrado que *N. risticii* presente em trematódeos provenientes de caramujos pode infectar camundongos por inoculação intraperitoneal (KANTER et al., 2000) e equinos por via subcutânea (PUSTERLA et al., 2000b) e por via oral (MADIGAN et al., 2000; MOTT et al., 2002).

*N. risticii* pode ser transmitida por via transplacentária, além disso, este agente pode induzir abortos, reabsorção fetal ou malformações (DAWSON et al., 1987).

A infecção experimental de *N. risticii* obtida através de cultivo celular ou de sangue de equinos infectados revela que cães, gatos, camundongos e primatas não-humanos podem ser infectados, porém somente camundongos e gatos desenvolvem sinais clínicos significativos (DAWSON et al., 1988; RISTIC et al., 1988).

### **2.5.2.2 Possíveis vetores**

*N. risticii* já foi identificada nas fases de cercárias e metacercárias presentes nos hospedeiros intermediários, moluscos e insetos, bem como em trematódeos adultos de aves e morcegos (CHAE et al., 2000; GIBSON et al., 2005; COIMBRA et al., 2005).

Coimbra et al. (2005) em um estudo realizado no Rio Grande do Sul verificaram que a *N. risticii* é veiculada nesta região por caramujos do gênero *Heleobia* que vivem em canais de irrigação e rios da região que abrigam trematódeos infectados. Estes moluscos são abundantemente encontrados em plantas aquáticas e são amplamente distribuídos na região costeira do Rio Grande do Sul. Neste estudo *N. risticii* foi detectada, através de Nested PCR, em 13,33% das amostras de caramujos do gênero *Heleobia*, provenientes de propriedades com história de ocorrência da EME.

Nos Estados Unidos, Barlough et al. (1998) identificaram DNA de *N. risticii* em cercárias virguladas oriundas de caramujos operculados de água doce (Pleuroceridae: *Juga* spp.), coletados em pastagens de uma área endêmica para EME no norte da Califórnia. Nesta mesma região, Reubel et al. (1998) identificaram o DNA deste agente em cercárias obtidas de *Juga yrekaensis*. Outros estudos identificaram DNA em fases larvais de um trematódeo não identificado isolado de caramujos operculados da família Pleuroceridae *Elimia livescens* em Ohio utilizando um primer específico para o gene 16S (KANTER et al., 2000) e *Elimia virginica* na Pensilvânia (MOTT et al., 2002).

#### 2.5.2.2.1 Carrapatos

Estudos baseados na natureza não contagiosa e sazonal da EME sugerem o envolvimento de um artrópode vetor. Após a identificação do agente da EME como uma riquetsia do gênero *Ehrlichia*, o foco foi imediatamente voltado para os carrapatos como potenciais vetores. Muitas doenças riquetsiais e todos os membros do gênero *Ehrlichia* que possuem vetor conhecido, são transmitidos por carrapatos (WEISS; MULDER, 1984).

Espécies de carrapatos transmissores de doenças riquetsiais e bacterianas, presentes em áreas endêmicas de EME são *Dermacentor variabilis*, *Amblyomma americanum*, *Dermacentor albipictus*, *Ixodes scapularis* e *Rhipicephalus sanguineus* (HAHN et al., 1990).

Estudos da dinâmica populacional de *Dermacentor variabilis* em áreas de intensa ocorrência de EME e o fato deste carrapato ser o vetor da “Febre Maculosa das Montanhas Rochosas” no leste e sudeste dos EUA, tornaram esta espécie o principal candidato a vetor da EME nestas regiões (FLETCHER, 1987).

*Dermacentor variabilis* é um carrapato comumente encontrado em equinos em áreas com histórico de EME, entretanto não foi verificada soroconversão ou manifestação clínica de EME em equinos de áreas livres parasitados por *D. variabilis* coletados de uma área endêmica para EME. Após isso, ninfas de *D. variabilis* foram alimentadas em camundongos infectados com *N. risticii*, e após a muda foram alimentadas em equinos e camundongos de uma área sem relatos de EME. Nenhum dos animais apresentou soroconversão ou doença clínica (SCHMIDTMANN et al., 1988).

Hahn et al. (1990) não observaram soroconversão ou doença clínica em equinos quando avaliaram a habilidade de carrapatos *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma americanum* e *Ixodes scapularis* em transmitir EME.

Outros vetores já foram investigados como *Stomoxys calcitrans* (BURG et al., 1990), tabanídeos e mosquitos (GORDON et al., 1988), e Pulgas *Ctenocephalides felis* (LAPPIN et al., 2006), entretanto não foi obtida confirmação de seu envolvimento no ciclo de *N. risticii*.

#### 2.5.2.2.2 Morcegos

Num estudo realizado na Pensilvânia, espécies de trematódeos *Acanthatrium oregonense* isolados de morcegos *Eptesicus fuscus* continham DNA de *N. risticii*. Além disso, fígado e baço de *E. fuscus* e *Myotis lucifugus* também foram positivos para DNA de *N. risticii* (GIBSON et al., 2005).

#### 2.5.4 Sintomatologia clínica e achados hematológicos

Os sinais clínicos são bastante variáveis e incluem início súbito, febre, depressão, anorexia, redução dos borborismos intestinais, edema subcutâneo nos membros e no abdome, desidratação, laminite e diarreia. 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.

Os achados laboratoriais são leucopenia com desvio a esquerda inicial (< 5000 células/ $\mu$ l) seguida por uma leucocitose rebote (>14.000 células/ $\mu$ l), aumento na concentração de proteína plasmática, aumento do hematócrito e trombocitopenia (RIKIHISA, 2004).

Em infecções experimentais a primeira observação é o aumento da temperatura retal 9 a 14 dias após inoculação, que geralmente permanece até a morte do animal ou até a resolução dos sinais clínicos. Além disso, anorexia, depressão, perda de peso, taquipnéia, congestão de membranas mucosas e diarreia aquosa também são verificados em infecções experimentais (RIKIHISA; PERRY, 1985; BURG et al., 1990).

#### 2.6 Diagnóstico

Devido à patogenicidade de *N. risticii* o diagnóstico precoce da EME é de extrema importância para a instituição de medidas terapêuticas específicas, pois os sinais clínicos podem mimetizar outras doenças de equinos que cursam com distúrbios abdominais e diarreia (BISWAS et al., 1994). Além disso, devido ao curto período de incubação da doença, a maioria dos equinos demonstra os primeiros sinais clínicos da infecção ao mesmo tempo em que desenvolvem os primeiros títulos detectáveis (MADIGAN et al., 1989)

O diagnóstico definitivo *ante mortem* de infecção por *N. risticii* requer uma combinação de sinais clínicos, testes sorológicos e detecção do agente. O diagnóstico diferencial inclui salmonelose, diarreia clostridial, arterite viral equina e íleo paralítico secundário a deslocamento ou obstrução (LONG, 2003).

A detecção do agente pode ser realizada de três formas: identificação de mórulas em monócitos durante a fase aguda da doença, isolamento do organismo a partir de capa leucocitária e PCR da capa leucocitária ou de fezes (RISTIC et al., 1986; BISWAS et al., 1994; BARLOUGH et al., 1998).

O diagnóstico através da identificação de *N. risticii* em esfregaços sanguíneos é bastante limitado, podendo ser realizado somente na fase aguda da doença, além disso, somente alguns monócitos estão infectados e com poucos organismos durante a fase aguda da infecção (RIKIHISA, 2004).

Tanto a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) (RISTIC et al., 1986) quanto a Reação Imunoenzimática (ELISA) (DUTTA et al., 1987; PRETZMAN et al., 1987) são testes para detecção de anticorpos anti- *N. risticii*, entretanto alguns laboratórios consideram a RIFI como um teste mais confiável (LONG, 2003).

Apesar de um título de anticorpos estar presente no curso da doença clínica, é difícil diferenciar titulações derivadas de infecção recente, de pós vacinal ou exposição prévia (RISTIC et al., 1986).

##### 2.6.1 Diagnóstico sorológico

Todos os membros do gênero *Ehrlichia* induzem resposta imune específica humoral. *N. risticii* induz produção de anticorpos específicos, em infecções naturais e experimentais, com ou sem presença de sinais clínicos. Poucos dias após a infecção ocorre uma resposta de IgM, que dura menos de dois meses (RIKIHISA, 2004). Uma resposta do tipo IgG, detectável através da RIFI, ocorre 9 a 12 dias após a infecção (RISTIC et al., 1986), com pico máximo ao redor de 25 dias (DUTTA et al., 1998), e que dura no mínimo vinte meses (MESSICK et al., 1994).

A resposta sorológica ocorre em todos os animais expostos a *N. risticii*, independente da produção ou não de doença clínica, por isso os testes sorológicos isoladamente, sem histórico dos animais, fornecem informações limitadas para o diagnóstico da doença (RIKIHISA, 2004).

O diagnóstico sorológico de infecções por *Ehrlichia* spp. é realizada principalmente através da RIFI (RIKIHISA, 2004). Diversos estudos utilizam este teste para o diagnóstico sorológico de *N. risticii* (GORDON et al., 1988; GOETZ et al., 1989; OLCHOWY et al., 1990; RIKIHISA et al., 1990; KIPER et al., 1992). Madigan et al. (1995) comparando a RIFI com dois outros testes diagnósticos, ELISA e Western Immunoblot, verificaram uma alta taxa de falso-positivos na RIFI, entretanto sugeriram que este achado pudesse ser em decorrência da rotina vacinal para *N. risticii* nos animais avaliados. Segundo Ristic et al. (1986) a RIFI constitui um método eficiente para detecção de anticorpos contra *N. risticii* (RISTIC et al., 1986).

O título de corte para o resultado sorológico positivo varia de acordo com o laboratório, entretanto quanto maior o título, maior é a correlação com a doença clínica (RIKIHISA, 2004). A chance de equinos saudáveis exibirem títulos de 1:40 ou menores é semelhante à de equinos doentes nas fases iniciais, finais da doença ou com baixos níveis de infecção por *N. risticii*. Além disso, existe a possibilidade de reação cruzada com outros microrganismos. Devido a isso, quanto maior o título apresentado pelo animal, mais confiável é o diagnóstico sorológico (RIKIHISA et al., 1990).

### **2.6.2 Cultivo celular**

*N. risticii* é normalmente isolada em linhagens celulares de histiócitos de linfoma humano (células U-937 e LH-60) (RIKIHISA; PERRY, 1985), monócitos de cão DH-82 (HOLLAND et al., 1985) e células de camundongos P388D<sub>1</sub> (DUTTA et al., 1985).

### **2.6.3 Diagnóstico molecular**

A reação em cadeia da polimerase (PCR), Nested PCR e Real Time PCR são técnicas moleculares utilizadas para o diagnóstico, tanto de infecções naturais quanto de infecções experimentais, entretanto são dispendiosos e podem ser mais demorados que o diagnóstico sorológico. Resultados negativos através de técnicas moleculares não indicam necessariamente que não há infecção (RIKIHISA, 2004)

### **2.7 Tratamento e Prevenção**

Em estudos *in vitro* *N. risticii* é sensível a oxitetraciclina, doxiciclina e demeclociclina, porém é resistente a eritromicina e ácido nalidíxico. A oxitetraciclina e a doxiciclina corrigem a febre e outros sinais clínicos da EME em 24 a 48 horas, apesar da doxiciclina experimentalmente em camundongos ser mais eficaz que a oxitetraciclina, esta última é mais utilizada em equinos, pois a doxiciclina intravenosa possui efeitos tóxicos (RIKIHISA; JIANG, 1988).

Devido à semelhança da sintomatologia clínica da EME e da salmonelose, em alguns casos a oxitetraciclina não é utilizada, pois é contra-indicada nos casos de salmonelose, o que dificulta a correção dos sintomas (CRAWFORD; DILBECK, 1988).

Segundo Rikihisa et al. (2004) a ingestão de trematódeos infectados é a principal fonte de transmissão em circunstâncias naturais. Moluscos aquáticos (DUTRA et al., 2001; CHAE et al., 2002; PARK et al., 2003; COIMBRA et al., 2005), insetos aquáticos (MADIGAN et al., 2000; WILSON et al., 2006), morcegos (GIBSON et al., 2005) e pássaros (PUSTERLA et al., 2003) podem albergar esses trematódeos infectados com *N. risticii*, o que dificulta o controle dos vetores em condições naturais. Segundo Long (2003) limitar o acesso a pastos com fontes

de água é um ponto importante do controle da EME, mesmo que este acesso seja limitado somente nos meses de maior incidência de casos da doença.

A vacinação, realizada em áreas endêmicas para EME nos EUA, é feita duas vezes ao ano, uma no início do período crítico para ocorrência da doença e outro no final deste período. Comercialmente existem três tipos de vacinas preparadas a partir de cultivo celular de *N. risticii* inativado, entretanto os títulos obtidos após a vacinação são menores e com duração menor que àqueles obtidos em infecções naturais (RIKIHISA, 2004). Todas as vacinas comerciais são produzidas a partir de uma cepa de *N. risticii* isolada de um equino com doença clínica proveniente de Maryland em 1984 (Isolado Illinois) (DUTTA et al., 1998).

Diversos estudos relatam falhas na proteção obtida a partir da vacinação (MOTT et al., 1997; DUTTA et al., 1998). Avaliando 20 equinos clinicamente positivos para EME, Vemulapalli et al. (1995) verificaram que destes animais 16 eram vacinados para EME com vacinas comerciais. Essa falha vacinal pode ser devido às variações antigênicas de *N. risticii*. Apesar desta falha na proteção vacinal, nas áreas endêmicas dos EUA para EME a vacinação é recomendada.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Características do Local de Estudo

O estudo foi realizado em propriedades equestres da microrregião de Itaguaí da mesorregião metropolitana do Rio de Janeiro, composta por três municípios:

- Itaguaí: 22°51'08'' latitude Sul; 43°46'31'' longitude Oeste; altitude: 13 metros.
- Mangaratiba: 22°57' 36" latitude Sul; 44°02'27'' longitude Oeste; altitude 18 metros.
- Seropédica: 22°44'38'' latitude Sul; 43°42'27'' longitude Oeste; altitude 26 metros.

O clima da microrregião de Itaguaí é caracterizado como tropical com estação seca e chuvas no verão (Aw) segundo classificação de Köppen-Geiger (PEEL et al., 2007).

Os três municípios possuem áreas em hectare bastante semelhante, conforme demonstrado no Quadro 1.

**Quadro 1.** Área dos municípios e população de equinos da microrregião de Itaguaí do estado do Rio de Janeiro.

Município	Área (ha)*	População Equinos*
Seropédica	28.379	794 (2006)
Itaguaí	27.156	490 (2009)
Mangaratiba	35.165	140 (2009)
Total	90.700	1.424

\*Fonte: IBGE, 2010.

#### 3.2 – Tamanho da Amostra

Devido à inexistência de dados referentes à prevalência desta doença no Brasil, foi realizado um estudo piloto com 100 animais da microrregião de Itaguaí, com o objetivo de nortear a definição do tamanho da amostra a ser estudada. Neste estudo piloto a prevalência de anticorpos anti-*N. risticii* obtida foi de 26%.

Para a determinação do tamanho da amostra foi estabelecido o grau de confiança de 95%, prevalência obtida no estudo piloto de 26% e margem de erro admitida de 5%. O número mínimo de amostras individuais de soro estabelecidas para coleta na microrregião foi de 296 amostras, segundo a equação descrita por Sampaio (2002) a seguir:

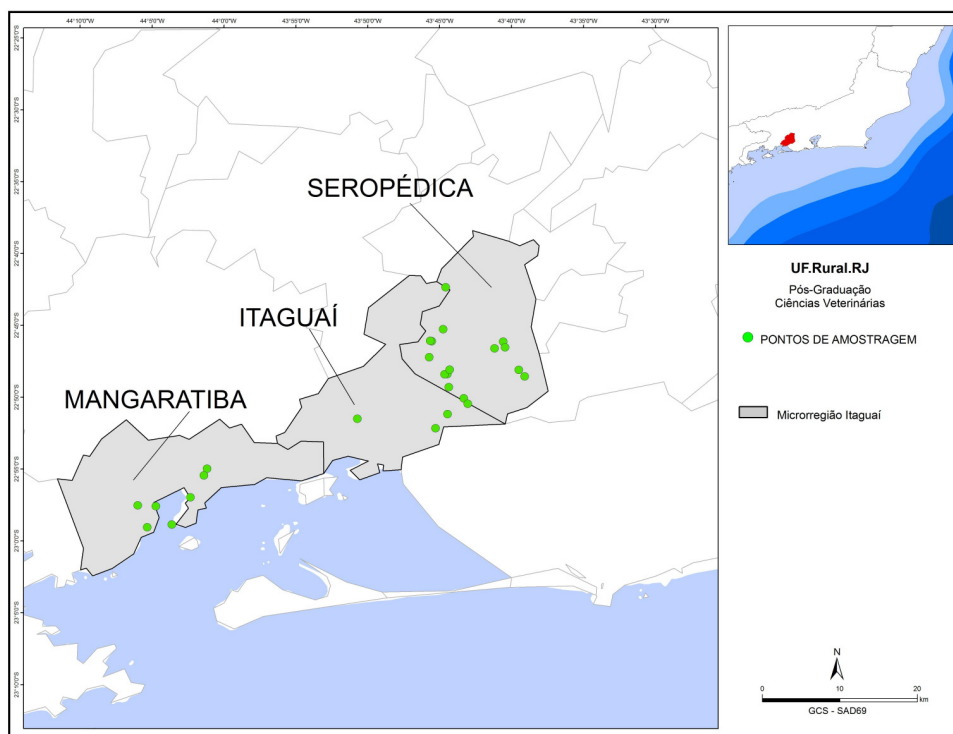
$$n = \frac{1,96^2 \times P_{\text{esp}} (1 - P_{\text{esp}})}{d^2}$$

onde: n = tamanho da amostra;  $P_{\text{esp}}$  = prevalência esperada;  $d^2$  = precisão absoluta desejada.

A coleta de amostra dos 350 animais foi realizada por conveniência. As propriedades foram visitadas e, após consentimento do proprietário ou responsável, as amostras foram coletadas. Em situações em que o número de equinos da propriedade foi inferior a 10 a coleta foi realizada de todos os animais. Por outro lado, quando o número de animais foi superior a 10 foram coletadas amostras de 10% da população total de equinos da propriedade.

As coletas foram realizadas na microrregião de Itaguaí no período de janeiro a maio de 2009, nas quais 350 equinos foram examinados e posteriormente submetidos à coleta de sangue. Dos 350 animais examinados da microrregião de Itaguaí, 116 eram do município de Itaguaí, 90 de Mangaratiba e 144 de Seropédica.

Em cada local de coleta a altitude foi registrada e os pontos georreferenciados com a utilização de receptores Global Positioning System (GPS). O sistema de referência utilizado foi *South American Datum 1969 (SAD69)*. Para a geração do mapa de localização da área do estudo utilizou-se o *software ARC GIS® 9 da ESRI* (Figura 1).



**Figura 1.** Detalhamento dos pontos de coleta na Microrregião de Itaguaí, RJ (em maior escala). Localização da microrregião de Itaguaí, na mesorregião metropolitana do Rio de Janeiro (em menor escala).

### 3.3 - Questionários

Antes da colheita de sangue dos animais, os proprietários ou funcionários responsáveis foram informados sobre o estudo, sua importância e que suas propriedades foram escolhidas para a realização do estudo. Após autorização, foi aplicado um questionário (Anexo A) com o objetivo de avaliar os possíveis fatores associados (sexo, idade, raça, município de coleta, atividade dos equinos, origem, presença de caramujo, qualidade da propriedade, acesso à pastagem e tipo de área) com o resultado positivo na RIFI para *N. risticii*.

As propriedades foram classificadas em quatro categorias com base em diferentes características relacionadas à estrutura da propriedade e ao manejo dos animais:

- Nível ótimo: animais criados em baias e piquetes que recebiam alimentação composta de volumoso desidratado (feno) e ração. Há vacinação, controle de ecto e endoparasitas de forma sistemática e assistência veterinária constante.
- Nível bom: idem anterior, exceto pela alimentação que já incluía forrageiras provenientes de capineira, e a vacinação, controle de ecto e endoparasitas não eram feitos de forma sistemática.
- Nível razoável: animais criados em baias e a pasto, havia controle esporádico de ecto e endoparasitas e a assistência veterinária era esporádica.
- Nível ruim: animais criados principalmente a pasto, não havia controle sistemático de ecto e endoparasitas e não havia assistência veterinária.

### **3.4 Avaliação Clínica**

Antes da colheita de sangue, os animais foram submetidos a um exame clínico completo (SPEIRS, 1999) com o objetivo de identificar possíveis alterações. Esse exame foi composto das seguintes variáveis:

- Frequência cardíaca: mensurada através de estetoscópio na área pré-cordial durante 60 segundos (Valores normais: 30-40 bpm);
- Frequência respiratória: mensurada observando-se os movimentos do gradil costal durante 60 segundo (Valores normais: 18-20 rpm).
- Coloração de mucosas: inspeção visual
- TPC (Tempo de Preenchimento Capilar): mensurado após pressão digital na mucosa oral (1 a 2 segundos).
- Temperatura corporal: aferida através de termômetro clínico inserido no reto do animal durante 1 minuto (Valor normal:  $38,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ ).
- Motilidade Intestinal: com auxílio de estetoscópio na fossa paralombar esquerda e direita, progredindo ventralmente.
- Tugor cutâneo: através de prega de pele realizada na região da escápula.

### **3.5 Coleta de Sangue**

De cada animal foram coletados 10 ml de sangue sem anticoagulante e 5 ml em tubos contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), através da punção da veia jugular, com auxílio de vacutainer. Nos tubos sem anticoagulante, após a retração do coágulo, o soro foi centrifugado a 6000 rpm por 5 minutos, sendo retirados 2 mL com auxílio de uma pipeta automática e armazenados em microtubos devidamente identificados e mantidos a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do teste sorológico.

Dos tubos com anticoagulante uma alíquota de sangue foi utilizada para a realização dos hemogramas e o restante foi centrifugado durante 10 minutos a 3000 rpm para promover a separação dos elementos do sangue. Após a centrifugação, o plasma foi descartado e a capa leucocitária coletada e acondicionada em recipientes estéreis, contendo 2 mL de PBS (pH 7,2), mantidos a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento dos ensaios moleculares.

### **3.6 Análises Hematológicas**

As análises hematológicas foram realizadas na Estação Experimental de Pesquisa Parasitológica W.O. NEITZ do Departamento de Parasitologia Animal – Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Os exames foram feitos em contador automático de células<sup>1</sup>. Os parâmetros hematológicos avaliados foram: volume globular (VG), hemoglobina (Hb), hematimetria (He), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), número de plaquetas, volume plaquetário médio, leucometria global, número de linfócitos, monócitos e granulócitos.

A concentração de sólidos totais e fibrinogênio sérico foi realizada por refratometria (COLES, 1986).

### **3.7 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)**

A RIFI foi realizada empregando-se o kit comercial<sup>2</sup>, seguindo as recomendações do fabricante. Foram preparadas diluições de 1:50 em salina tamponada (PBS) para todos os soros a serem testados com o objetivo de realizar uma triagem. Em cada cavidade das lâminas foram pipetados 10µl de cada soro diluído, incluídos em todas as lâminas um controle negativo e um controle positivo. Em seguida, as lâminas foram incubadas em câmara úmida por 30 minutos a  $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , e submetidas a três lavagens por imersão de cinco minutos cada em PBS. Após secagem a temperatura ambiente, as cavidades das lâminas foram recobertas com 10 µl de conjugado (anti-IgG de equino conjugado ao isotiocianato de fluoresceína) e repetiu-se a incubação em câmara úmida por 30 minutos na mesma temperatura. Seguiu-se a lavagem das lâminas como descrito anteriormente, e após secagem, as lâminas foram montadas com lamínula, utilizando-se 2-3 gotas de glicerina tamponada e, posteriormente observadas em microscópio equipado com fluorescência.

Os soros positivos na diluição de 1:50 foram titulados até não apresentarem mais fluorescência (última diluição).

### **3.8 Real Time PCR (q-PCR)**

#### **3.8.1 Extração de DNA a partir de amostras de sangue e Real Time PCR .**

A extração de DNA total a partir de 70 µl de capa leucocitária foi realizada empregando-se o kit comercial<sup>3</sup> seguindo as recomendações do fabricante. A amostra foi colocada em um tubo de microcentrifuga de 1,5 ml onde foi adicionado 50µl de solução A (solução de lise). Em seguida a mistura foi homogeneizada em *vortex* durante intervalos de 1 segundo, até a obtenção de uma amostra bem dispersa. Após esta etapa, seguiu-se incubação a  $65^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, adição de 20 µl de solução B, e homogeneização em *vortex* até o precipitado mover-se livremente no tubo e a amostra estar uniformemente viscosa (10 seg-1min). Após a obtenção desta amostra viscosa, foram adicionados 70 µl de clorofórmio e a mistura agitada em *vortex* até a viscosidade decrescer e a mistura apresentar-se homogênea (10 seg-1 min). Seguiu-se centrifugação a 14.500 rpm por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  para separar as fases e formar a interface. A fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para um novo tubo de microcentrifuga, onde foram adicionados 445 µl de tampão TE, 5 µl de glicogênio e 1 ml de etanol 100% ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Essa mistura foi homogeneizada por inversão e incubada em gelo por 30 minutos. Após a incubação, o material foi centrifugado a 14.500 rpm durante 3-5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  e, o etanol removido com auxílio de uma pipeta Pasteur. Este processo foi repetido por mais duas vezes e então o material foi seco a temperatura ambiente por 5 minutos. Para finalizar o processo de extração de DNA a partir de capa leucocitária, o pellet foi ressuspensionado em 10 µl de tampão TE e armazenado em microtubos a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a realização do qPCR.

---

<sup>1</sup> (ABC Vet®, Horiba ABX)

<sup>2</sup> Smartvet™ *Neorickettsia risticii* Equine IFA (VMRD®)

<sup>3</sup> Easy-DNA™ Kit for Genomic DNA Isolation (Invitrogen®)



### 3.8.2 Obtenção do controle positivo

O 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 extração de DNA foi realizada utilizando o DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), conforme recomendações do fabricante.

### 3.8.3 Real Time PCR (qPCR)

As amostras de DNA dos equinos foram submetidas à amplificação específica de um fragmento de 85bp do gene 16S rRNA para espécie *N. risticii*. Para esta análise utilizou-se os primers 133f (5'-GTTATTCCTACTACCAGGCAAGTTC-3') e 54r (5'-AACGGAAT CAGGGCTGCTT-3') (PUSTERLA et al., 2000c). O mix de cada reação foi de 12µL contendo: 6µL Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (1X), 0,9µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 3µL (90ng) de DNA total. O programa de amplificação apresentou um passo de desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos e 40 ciclos com a seguinte programação: desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento-extensão a 60°C por 1 minuto. Após a amplificação, uma curva de dissociação dos fragmentos amplificados foi obtida para visualização da especificidade da amplificação. As amostras foram consideradas positivas com cycle threshold (C<sub>T</sub>) inferior a 35 ciclos e com o produto amplificado com a mesma temperatura de dissociação do controle positivo.

### 3.9 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 (AYRES et al., 2007).

Os dados hematológicos que apresentaram distribuição normal foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando significativas as médias foram analisadas pelo Teste F em nível de 5% de significância. Os dados hematológicos não paramétricos foram submetidos ao teste Mann-Whitney em nível de 5% de significância.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A frequência de anticorpos IgG anti-*N. risticii* em equinos na microrregião de Itaguaí foi de 26,3% (92/350), com títulos variando de 1:50 a 1:800. As prevalências obtidas na titulação de anticorpos foram: 13,7% (48/350) para os animais com título de 1:50, 3,4% (12/350) para equinos com título de 1:200, 7,4% (26/350) no título de 1:400 e 1,7% (6/350) em equinos com título de 1:800, conforme demonstrado na Tabela 1.

Os resultados sorológicos observados no presente estudo indicam a possível circulação de *N. risticii* na microrregião de Itaguaí, uma vez os animais nos avaliados houve a presença de títulos de 1:400 e 1:800, apesar dos animais não apresentavam alterações clínicas compatíveis nem histórico para EME, isso reforça a possibilidade de *N. risticii* circular na população avaliada. Segundo Rikihisa et al. (1990) quanto maior for à titulação de anticorpos anti- *N. risticii* em equinos, mais confiável e específico é o diagnóstico sorológico. Neste estudo.

**Tabela 1.** Frequência de anticorpos anti-*Neorickettsia risticii* nas titulações de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 em equinos através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) na microrregião de Itaguaí.

Título	<i>Neorickettsia risticii</i>		
	Frequência absoluta (n=350)	Frequência relativa (%)	Prevalência (%)
1:50	48	52,2	13,7
1:100	0	0,0	0,0
1:200	12	13,0	3,4
1:400	26	28,3	7,4
1:800	6	6,5	1,7
Total	92	100,0	26,3

Possivelmente, essa enfermidade ocorre em outras regiões do território nacional com características semelhantes à região estudada. No Brasil, até o presente momento, não foram realizados inquéritos soropidemiológicos para este agente. Entretanto, alguns estudos foram realizados para avaliar a ocorrência da enfermidade no país, tanto na região Sul, no estado do Rio Grande do Sul, quanto na região Sudeste, no estado do Rio de Janeiro (COIMBRA, et. al. 1999, 2003; FERRÃO et al. 2007.) Evidências sorológicas para *N. risticii* também foram observadas em equinos, nos Estados Unidos, Canadá, França, Itália, Venezuela, Índia e Austrália (PALMER et al., 1986; BREIDER; HENTON, 1987).

Pesquisas demonstraram que nos EUA a prevalência de anticorpos anti-*N. risticii* varia de 7,5% a 76% dependendo da região, da época do ano e da população de equinos estudada (ATVILL et al., 1996; KIPPER et al., 1992; GORDON et al., 1988; GOETZ et al., 1989). A taxa de prevalência de 26,3% observada no presente estudo foi semelhante à obtida por Olchoway et al. (1990), os quais avaliaram 2.549 equinos no estado de Minnesota e obtiveram uma prevalência de 26,6% de anticorpos anti-*N. risticii*, considerando os animais positivos, aqueles que apresentaram títulos iguais ou maiores que 1:80 através da RIFI. Semelhante resultado foi também observado por Crawford e Dilbeck (1988), em estudo realizado em Washington, com 27,4% de soropositividade ao agente em questão e por Goetz et al., (1989) que observaram soroprevalência em 16,75% dos equinos em Illinois, com títulos na RIFI que variaram de 1:10 até 1:640, com 14% de animais positivos na menor diluição e 2,2% na maior diluição.

Outras pesquisas desenvolvidas nos EUA demonstraram prevalência de anticorpos anti- *N. risticii* semelhantes em diferentes estados americanos. Kiper et al. (1992) observaram 16% de soropositividade nos equinos do estado do Colorado e Madigan et al. (1995), 15,9% na Califórnia. A prevalência da EME varia em função da área estudada e também com a presença de sinais clínicos compatíveis com a doença. Gordon et al.(1988) realizaram um estudo no estado de Ohio, em duas propriedades com histórico de animais positivos ao agente, e observaram 64,9% de soropositividade. Esses dados nos permitem sugerir que estudos em áreas já consideradas como endêmicas e utilizando amostragens de animais com sinais clínicos compatíveis com EME, exibem prevalências superiores a grupos de animais aparentemente saudáveis.

Muitos estudos consideram a RIFI como um teste eficiente, sensível e específico para o diagnóstico sorológico de *N. risticii*, sendo desta forma utilizada em estudos soroepidemiológicos (RISTIC et al., 1986; RIKIHISA; PERRY, 1985). Contudo, a relação da diluição estabelecida como ponto de corte para a RIFI é bastante discutida (GORDON et al., 1988; RIKIHISA et al., 1990; OLCOWY et al., 1990). Muitos trabalhos consideram animais com títulos de 1:40 como sendo positivos para *N. risticii* (KIPER et al., 1992), enquanto outros estudos consideram que títulos entre 1:10 e 1:40 possuem relevância epidemiológica quando adicionados ao histórico do animal e avaliação clínica (GOETZ et al., 1989).

No presente estudo, a coleta das amostras foi realizada por conveniência, em uma população de equinos aparentemente saudáveis. Rikihisa et al. (1990) em um estudo avaliando animais Puro Sangue de dois hipódromos em Ohio obtiveram uma prevalência de 19% em animais sem sinais clínicos de EME, no entanto Gordon et al. (1988) observaram uma taxa de prevalência de 64,9% em equinos com sinais clínicos sugestivos de EME. No Brasil, Ferrão et al. (2007) observaram 79% de animais positivos através da RIFI, numa amostra de 19 equinos provenientes das regiões metropolitana e serrana do estado do Rio de Janeiro com sintomas clínicos compatíveis com EME. Esses achados sugerem que prevalências maiores para *N. risticii* são obtidas em populações de animais com sintomas clínicos de EME quando comparadas com populações de animais aparentemente saudáveis.

Numa pesquisa avaliando um surto de EME numa propriedade no Rio Grande do Sul, Coimbra et al. (2006) verificaram que numa população de 50 animais, 13 (26%) apresentavam evidências clínicas da doença. Dos animais acometidos sete foram avaliados através da técnica de PCR, resultando em três amostras positivas para *N. risticii*. Apesar desses 50 equinos serem provenientes de uma propriedade com histórico clínico de EME, a prevalência obtida por esses pesquisadores é bastante semelhante à verificada neste estudo. Esse fato pode ser atribuído ao baixo número de animais utilizado por Coimbra et al. (2006) em comparação a amostragem do presente estudo.

Da mesma forma, em um estudo conduzido numa propriedade no Uruguai, 11/12 equinos com sinais clínicos compatíveis com EME foram positivos na RIFI, com títulos que variaram de 1:40 a 1:320 ao longo de quatro anos. De 140 cavalos nativos desta mesma propriedade 21 (15%) exibiram sinais clínicos compatíveis com a EME e destes 57% (12/21) vieram a óbito em um período de 10 anos. Ainda nesta mesma propriedade 35,3% (12/34) dos animais introduzidos de outra região apresentaram sinais clínicos e destes 66,7% (8/12) vieram a óbito em três anos (DUTRA et al., 2001) . Esses dados reforçam a existência na EME no sul do Brasil, Uruguai e no Rio de Janeiro, através de evidências clínicas, sorológicas e moleculares da doença.

No presente estudo foram coletadas amostras em 31 propriedades nos três municípios que compõe a microrregião de Itaguaí. Em Mangaratiba 100% (5/5) das propriedades tiveram pelo menos um animal positivo na RIFI para *N. risticii*, enquanto em Itaguaí este percentual foi de 80% (8/10) e em Seropédica 68,8% (11/16).

Entre os municípios que compõe a microrregião de Itaguaí, não houve associação em relação à positividade para *N. risticii*. No município de Seropédica a prevalência obtida foi de 23,6%, em Itaguaí 27,6% e Mangaratiba 28,9%. Desta forma, as diferentes características geográficas e climáticas observadas entre esses municípios não promoveram associação entre o município e a soropositividade dos animais estudados (Tabela 2).

**Tabela 2.** Frequência de anticorpos anti-*Neorickettsia risticii* nas titulações de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 em equinos através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função do município avaliado.

Município	N	Positivos	Título				
			1:50	1:100	1:200	1:400	1:800
Seropédica	144	34 <sup>a</sup> (23,6%)	18 (52,9%)	0 (0,0%)	4 (11,8%)	11 (32,4%)	1 (2,9%)
Itaguaí	116	32 <sup>a</sup> (27,6%)	15 (46,9%)	0 (0,0%)	5 (15,6%)	8 (25,0%)	4 (12,5%)
Mangaratiba	90	26 <sup>a</sup> (28,9%)	15 (57,7%)	0 (0,0%)	3 (11,5%)	7 (26,9%)	1 (3,8%)
Total	350	92 (26,3%)	48 (52,2%)	0 (0,0%)	12 (13,0%)	26 (28,3%)	6 (6,5%)

<sup>a</sup> Valores nas colunas, seguidos de letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste Qui-quadrado e/ou pelo teste Exato Fisher a 5% de significância (p>0,05).

Em relação ao sexo, a amostra avaliada foi composta por 43,4% (152/350) de fêmeas e 56,6% (198/350) de machos. Entre as fêmeas foi verificada uma frequência de anticorpos anti-*N. risticii* de 30,3% (46/152) e entre os machos de 23,2% (46/198), sem haver associação entre sexo e soropositividade (p>0,05). As frequências de animais soropositivos nas titulações de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 em relação ao sexo estão apresentadas na Tabela 3.

**Tabela 3.** Frequência de anticorpos anti-*Neorickettsia risticii* nas titulações de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 em equinos através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função do sexo.

Sexo	N	Positivos	Título				
			1:50	1:100	1:200	1:400	1:800
Fêmea	152	46 <sup>a</sup> (30,3%)	22 (47,8%)	0 (0,0%)	8 (17,4%)	12 (26,1%)	4 (8,7%)
Macho	198	46 <sup>a</sup> (23,2%)	26 (56,5%)	0 (0,0%)	4 (8,7%)	14 (30,4%)	2 (4,3%)
Total	350	92 (26,3%)	48 (52,2%)	0 (0,0%)	12 (13,0%)	26 (28,3%)	6 (6,5%)

<sup>a</sup> Valores nas colunas, seguidos de letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste Qui-quadrado e/ou pelo teste Exato Fisher a 5% de significância (p>0,05).

Segundo Rikihisa et al. (1990), Goetz et al. (1989) e Olchoway et al. (1990) a variável sexo não interferiu na positividade dos animais de forma significativa. Entretanto, Atwill et al. (1992) observaram diferença estatística nesta variável, onde as fêmeas exibiram uma chance 2,7 vezes maior de possuírem títulos positivos que os machos.

Em relação à idade dos animais, no presente trabalho houve associação entre esta variável e soropositividade (p<0,05) para *N. risticii*. Além disso, observou-se que a frequência de anticorpos anti-*N. risticii* tende a aumentar nas faixas etárias superiores, em que os animais com idade superior a 10 anos apresentaram maior prevalência (33,7%, 33/98) em relação às demais faixas etárias, onde foram observadas prevalências de 26,7% (23/86) e de 26,9% (36/134) para animais ente 1 e 5 anos e entre 5 e 10 anos, respectivamente (Tabela 4).

**Tabela 4.** Frequência de anticorpos anti-*Neorickettsia risticii* nas titulações de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 em equinos através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função da idade.

Faixas Etárias	N	Positivos	Título				
			1:50	1:100	1:200	1:400	1:800
≤ 1 ano	32	0 <sup>b</sup> (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
>1-5 anos	86	23 <sup>a</sup> (26,7%)	17 (73,9%)	0 (0,0%)	1 (4,3%)	4 (17,4%)	1 (4,3%)
>5-10 anos	134	36 <sup>a</sup> (26,9%)	15 (41,7%)	0 (0,0%)	6 (16,7%)	12 (33,3%)	3 (8,3%)
>10 anos	98	33 <sup>a</sup> (33,7%)	16 (48,5%)	0 (0,0%)	5 (15,2%)	10 (30,3%)	2 (6,1%)
Total	350	92 (26,3%)	48 (52,2%)	0 (0,0%)	12 (13,0%)	26 (28,3%)	6 (6,5%)

<sup>a</sup> Valores nas colunas, seguidos de letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste Qui-quadrado e/ou pelo teste Exato Fisher a 5% de significância (p>0,05).

Estes resultados são compatíveis àqueles reportados por Madigan et al. (1989), num levantamento epidemiológico realizado na Califórnia, onde a maior prevalência de anticorpos foi verificada em animais mais velhos, e por Atwill et al. (1992) que verificaram maior soropositividade em animais com idade superior a 10 anos, sendo o pico de anticorpos aos 12 anos de idade. Em doenças transmitidas por vetores, essa tendência é facilmente explicada pelo aumento da probabilidade do hospedeiro encontrar o vetor infectado pela *N. risticii* ao longo do tempo. É importante ressaltar que todos os animais com idade inferior a um ano apresentaram resultado negativo na sorologia para *N. risticii*, fato que pode ser atribuído ao fato destes animais passarem a maior parte do tempo até os seis meses de vida mamando e pouco pastarem ou até beberem água no pasto. Este achado é compatível com o estudo realizado por Dutra et al. (2001) no Uruguai, onde durante 10 anos, numa população de 140 animais nativos (nascidos e criados na propriedade) ocorreram 21 casos clínicos da doença e todos os animais acometidos tinham idade superior a um ano. Em outros estudos que envolvem avaliação epidemiológica, a idade mínima dos animais incluídos no estudo foi superior a seis meses e em alguns casos, com a condição de já terem sido desmamados (OLCHOWY et al., 1990; KIPER et al., 1992; GOETZ et al., 1989) devido à possível transferência de anticorpos anti-*N. risticii* via colostro (DAWSON et al., 1987).

Com relação à raça dos equinos avaliados no estudo, não houve associação entre esta variável e a frequência de anticorpos anti-*N. risticii*. Nos equinos sem raça definida (SRD) 28,4% (33/116) foram positivos, nos animais das raças Mangalarga Machador, Puro Sangue Inglês e Quarto de Milha 21,1% (27/128), 30,9% (17/55) e 31,6% (6/19) foram positivos, respectivamente. Nos animais agrupados em outras raças houve 28,1% (9/32) de animais positivos (Tabela 5).

**Tabela 5.** Frequência de anticorpos anti-*Neorickettsia risticii* nas titulações de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 em equinos através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função da raça.

Raças	N	Positivos	Título				
			1:50	1:100	1:200	1:400	1:800
SRD <sup>1</sup>	116	33 <sup>a</sup> (28,4%)	14 (42,4%)	0 (0,0%)	5 (15,2%)	11 (33,3%)	3 (9,1%)
MM <sup>2</sup>	128	27 <sup>a</sup> (21,1%)	15 (55,6%)	0 (0,0%)	2 (7,4%)	8 (29,6%)	2 (7,4%)
PSI <sup>3</sup>	55	17 <sup>a</sup> (30,9%)	8 (47,1%)	0 (0,0%)	3 (17,6%)	5 (29,4%)	1 (5,9%)
QM <sup>4</sup>	19	6 <sup>a</sup> (31,6%)	4 (66,7%)	0 (0,0%)	1 (16,7%)	1 (16,7%)	0 (0,0%)
OR <sup>5</sup>	32	9 <sup>a</sup> (28,1%)	7 (77,8%)	0 (0,0%)	1 (11,1%)	1 (11,1%)	0 (0,0%)
Total	350	92 (26,3%)	48 (52,2%)	0 (0,0%)	12 (13,0%)	26 (28,3%)	6 (6,5%)

<sup>a</sup> Valores nas colunas, seguidos de letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste Qui-quadrado e/ou pelo teste Exato Fisher a 5% de significância ( $p>0,05$ ). <sup>1</sup>Sem Raça Definida; <sup>2</sup>Mangalarga Marchador; <sup>3</sup>Puro Sangue Inglês; <sup>4</sup>Quarto de Milha; <sup>5</sup>Outras Raças sem expressão numérica na amostragem.

Esses resultados são semelhantes aos obtidos na literatura, onde a raça dos animais avaliados não mostrou associação com a prevalência de anticorpos anti-*N. risticii* (KIPER et al., 1992; GOETZ et al., 1989). Apesar de não haver diferença estatística entre as raças e a soropositividade, uma maior prevalência foi observada nos animais da raça Quarto de Milha (31,6%) e Puro Sangue Inglês (30,9%). Em relação aos animais da raça PSI, esse resultado pode estar associado à origem dos animais, que na maioria ou até mesmo na sua totalidade são provenientes do sul do Brasil, onde estão localizados os principais haras de criação de PSI, região aonde a EME vem sendo reconhecida como um problema há mais de 100 anos. O primeiro diagnóstico no Brasil ocorreu no Rio Grande do Sul em 1998 (COIMBRA et al., 2003), entretanto os poucos estudos no sul do Brasil são realizados em cavalos da raça Crioula no Rio Grande do Sul, indicando que a doença também pode ser um sério problema para os animais da raça PSI. Dentre os animais da raça Quarto de Milha soropositivos para *N. risticii*, a maioria é utilizada para esporte, principalmente provas de tambor e baliza. Na região do estudo é frequente que esses animais nadem em lagoas e açudes próximos a propriedade como parte do seu treinamento. Esse acesso a locais onde existem fontes de água é considerado por Long (2003) como um ponto importante na infecção por *N. risticii*.

Não houve associação ( $p>0,05$ ) entre o tipo de área predominante na propriedade e a prevalência para anticorpos anti-*N. risticii* nos animais avaliados no estudo (Tabela 6). A frequência de anticorpos nos animais provenientes de propriedades que possuem rios, riachos ou açudes na sua extensão foi de 24,2% (15/62), nos animais oriundos de propriedades com áreas alagadas foi de 28,5% (73/256) e de equinos oriundos de propriedades com área predominantemente seca 12,5% (4/32). Segundo alguns autores o acesso a rios, lagoas e açudes, é um fator de risco para a contaminação com o agente da EME, que pode ser veiculado no ambiente por moluscos e insetos aquáticos (PUSTERLA et al., 2000; COIMBRA et al., 2005). A chance de entrar em contato com o vetor é um possível fator de risco (KIPER et al., 1992), sendo assim equinos que têm acesso a pastagens que contenham rios, lagos ou lagoas apresentam maior probabilidade de exibirem títulos sorológicos elevados para *N. risticii*. (PERRY et al., 1986; OLCHOWY et al., 1990). Devido à semelhança genética com outras riquetsias de transmissão oral, foi sugerido que a *N. risticii* acompanha este padrão de transmissão, possivelmente intermediada por trematódeos albergados por moluscos e insetos de ambiente aquático (BARLOUGH et al., 1998; RIKIHISA et al., 1998; COIMBRA et al., 2005).

**Tabela 6.** Frequência de anticorpos anti-*Neorickettsia risticii* nas titulações de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 em equinos através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função do tipo de área.

Área	N	Positivos	Título				
			1:50	1:100	1:200	1:400	1:800
Rios/Riachos/Açude	62	15 <sup>a</sup> (24,2%)	4 (26,7%)	0 (0,0%)	4 (26,7%)	5 (33,3%)	2 (13,3%)
Áreas alagadas	256	73 <sup>a</sup> (28,5%)	44 (60,3%)	0 (0,0%)	7 (9,6%)	18 (24,7%)	4 (5,5%)
Seca	32	4 <sup>a</sup> (12,5%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (25,0%)	3 (75,0%)	0 <sup>b</sup> (0,0%)
Total	350	92 (26,3%)	48 (52,2%)	0 (0,0%)	12 (13,0%)	26 (28,3%)	6 (6,5%)

<sup>a</sup> Valores nas colunas, seguidos de letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste Qui-quadrado e/ou pelo teste Exato Fisher a 5% de significância (p>0,05).

Não houve associação entre soropositividade para *N. risticii* e a presença de caramujo no pasto (p>0,05). A prevalência obtida em animais que viviam em propriedades com a presença de caramujos foi de 32,4% (24/74) e para aqueles de propriedades sem caramujos foi de 24,6% (68/276), conforme demonstrado na Tabela 7.

**Tabela 7.** Frequência de anticorpos anti-*Neorickettsia risticii* nas titulações de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 em equinos através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função da presença ou ausência de caramujos.

Caramujos	N	Positivos	Título				
			1:50	1:100	1:200	1:400	1:800
Presente	74	24 <sup>a</sup> (32,4%)	9 (37,5%)	0 (0,0%)	6 (25,0%)	9 (37,5%)	0 (0,0%)
Ausente	276	68 <sup>a</sup> (24,6%)	39 (57,4%)	0 (0,0%)	6 (8,8%)	17 (25,0%)	6 (8,8%)
Total	350	92 (26,3%)	48 (52,2%)	0 (0,0%)	12 (13,0%)	26 (28,3%)	6 (6,5%)

<sup>a</sup> Valores nas colunas, seguidos de letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste Qui-quadrado e/ou pelo teste Exato Fisher em nível de 5% de significância (p>0,05).

A identificação do DNA de *N. risticii* em caramujos ou trematódeos por eles albergados em áreas com incidência clínica, sorológica e/ou molecular de EME, sugere importante papel desses moluscos na transmissão natural da doença (COIMBRA et al., 2005; PUSTERLA et al., 2000; DUTRA et al., 2001; PARK et al., 2003). O fato de não haver associação entre esta variável e a positividade dos animais no presente trabalho pode ser devido à baixa taxa de infecção natural por *N. risticii* nos trematódeos que infectam caramujos. Em estudo realizado na Coréia do Sul, Park et al. (2003) verificaram que dos 3219 caramujos avaliados apenas 77 albergavam trematódeos infectados por *N. risticii*, uma taxa de infecção natural de 2,39%. Outro fator importante é o tamanho dos caramujos incriminados como vetores de *N. risticii*. Os principais moluscos que atuam como possíveis vetores são do gênero *Heleobia* no Brasil (COIMBRA et al., 2005), *Juga yrekaensis* nos EUA (MOTT et al., 1997; BARLOUGH et al., 1998) e *Semisulcospira libertina* e *Radix auricularia coreana* na Coréia (PARK et al., 2003). Todos esses caramujos são pequenos, tendo em média 0,5 cm de comprimento, o que dificulta a sua visualização. No presente estudo a variável (presença ou ausência de caramujos) foi verificada através do questionário inferido aos responsáveis pelos animais. A dificuldade de visualização desses caramujos pode ter interferido na real situação em relação à presença ou ausência desses moluscos nas propriedades avaliadas.

Não houve associação (p>0,05) em função da acessibilidade à pastagem e soropositividade dos animais, conforme demonstrado na Tabela 8. Porém observa-se uma tendência de aumento na frequência de anticorpos para os equinos que possuem acesso ao

pasto, seja integral com prevalência de 27,7% (18/65) ou parcial com prevalência de 27,1% (62/228), em relação aos animais que não tem acesso a pasto onde a prevalência foi de 21,1% (12/57). Essa tendência sugere uma relação entre acesso a pastagem, principalmente aquelas que contenham fontes de água e frequência de anticorpos anti-*N. risticii*.

**Tabela 8.** Frequência de anticorpos anti-*Neorickettsia risticii* nas titulações de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 em equinos através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função da frequência de acesso dos animais a pastagem.

Acesso à pastagem	N	Positivos	Título				
			1:50	1:100	1:200	1:400	1:800
Acesso integral ao pasto	65	18 <sup>a</sup> (27,7%)	10 (55,6%)	0 (0,0)	2 (11,1%)	6 (33,3%)	0 (0,0%)
Sem acesso ao pasto	57	12 <sup>a</sup> (21,1%)	0 (0,0%)	0 (0,0)	5 (41,7%)	5 (41,7%)	2 (16,7%)
Acesso parcial ao pasto	228	62 <sup>a</sup> (27,1%)	38 (61,3%)	0 (0,0)	5 (8,1%)	15 (24,2%)	4 (6,5%)
Total	350	92 (26,3%)	48 (52,2%)	0 (0,0)	12 (13,0%)	26 (28,3%)	6 (6,5%)

<sup>a</sup> Valores nas colunas, seguidos de letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste Qui-quadrado e/ou pelo teste Exato Fisher a 5% de significância (p>0,05).

Na região estudada é comum o fornecimento aos animais com e sem acesso a pastagem, de capim-angola (*Brachiaria purpurascens*), uma forrageira que se desenvolve em áreas alagadas (BODDAN, 1977), que justifica a não associação entre esta variável e a soropositividade para *N. risticii*, sugerindo que para estes animais o acesso ao vetor possa ser através do volumoso proveniente do pasto e fornecido na baía.

No presente estudo somente 2% (7/350) dos animais era criado somente com feno e ração, sem acesso a capim procedente de capineira ou de pasto. Destes animais alimentados somente com volumoso desidratado, nenhum foi positivo para *N. risticii*, fato que reforça a hipótese de uma possível infecção com o agente da EME em equinos que possuíam acesso ao pasto ou que recebiam forrageiras oriundas do pasto.

O nível de qualidade das criações de equinos na região estudada variou bastante. Foi verificada associação (p<0,05) entre a situação da propriedade e a soropositividade para *N. risticii*. Observou-se que nas propriedades classificadas como Boa a prevalência de anticorpos anti-*N. risticii* foi de 22,9% (33/144), enquanto nas propriedades classificadas como Razoável e Ruim a frequência de anticorpos foi de 22,4% (26/116) e 36,7% (33/90), respectivamente. Os resultados da frequência de anticorpos anti-*N. risticii* em função da situação da propriedade e demais titulações estão listadas na Tabela 9.

**Tabela 9.** Frequência de anticorpos anti-*Neorickettsia risticii* nas titulações de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 em equinos através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função do nível de qualidade da propriedade.

Propriedades	N	Positivos	Título				
			1:50	1:100	1:200	1:400	1:800
Boa	144	33 <sup>b</sup> (22,9%)	18 (54,5%)	0 (0,0%)	5 (10,4%)	7 (6,9%)	3 (2,1%)
Razoável	116	26 <sup>b</sup> (22,4%)	11 (42,3%)	0 (0,0%)	3 (12,9%)	9 (10,3%)	3 (2,6%)
Ruim	90	33 <sup>a</sup> (36,7%)	19 (57,6%)	0 (0,0%)	4 (15,6%)	10 (11,1%)	0 (0,0%)
Total	350	92 (26,3%)	48 (52,2%)	0 (0,0)	12 (13,0%)	26 (28,3%)	6 (6,5%)

<sup>a</sup> Valores nas colunas, seguidos de letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste Qui-quadrado e/ou pelo teste Exato Fisher a 5% de significância (p>0,05).



A prevalência de anticorpos verificada nas propriedades de situação ruim (36,7%) diferiu estatisticamente das propriedades que apresentavam situação boa (22,9%) ou razoável (21,6%). De acordo com a estratificação das propriedades em função da situação, foram consideradas de nível ruim aquelas onde os animais eram criados com acesso integral ao pasto, o que reforça os resultados obtidos na tabela 8, onde este grupo de animais apresentou a maior prevalência de anticorpos (27,7%). Além disso, na maioria das propriedades de nível ruim o capim não é proveniente de capineira e sim de outros locais, como regiões próximas a lagoas e estradas. Isso reforça a hipótese de que animais que pastam próximos a regiões que contenham lagos, lagoas ou açudes, ou mesmo que recebam capim proveniente de regiões alagadas possuem uma maior probabilidade de exibirem títulos para EME.

Não houve associação ( $p>0,05$ ) entre a finalidade de criação dos animais e a frequência de anticorpos para *N. risticii*, conforme demonstrado na Tabela 10. A maior frequência de anticorpos contra *N. risticii* foi verificado nos equinos de trabalho com 32,3% (21/65) de soropositivos. Nas demais categorias representadas por animais utilizados para Reprodução, Esporte, Passeio e Exposição a frequência de anticorpos foi de 28,6% (22/77), 28% (30/107), 22,2% (16/72) e 18,2% (2/11), respectivamente.

**Tabela 10.** Frequência de anticorpos anti-*Neorickettsia risticii* nas titulações de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 em equinos através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função da utilização dos animais.

Utilização	N	Positivos	Título				
			1:50	1:100	1:200	1:400	1:800
Trabalho	65	21 <sup>a</sup> (32,3%)	11 (52,4%)	0 (0,0%)	4 (19,0%)	6 (28,6%)	0 (0,0%)
Reprodução	77	22 <sup>a</sup> (28,6%)	12 (54,5%)	0 (0,0%)	2 (9,1%)	6 (27,3%)	2 (9,1%)
Esporte	107	30 <sup>a</sup> (28,0%)	12 (40,0%)	0 (0,0%)	5 (16,7%)	9 (30,0%)	4 (13,3%)
Passeio	72	16 <sup>a</sup> (22,2%)	11 (68,8%)	0 (0,0%)	1 (6,3%)	4 (25,0%)	0 (0,0%)
Exposição	11	2 <sup>a</sup> (18,2%)	1 (50,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (50,0%)	0 (0,0%)
Indefinidos*	18	1 <sup>a</sup> (5,6%)	1 (5,6%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Total	350	92 (26,3%)	48 (52,2%)	0 (0,0%)	12 (13,0%)	26 (28,3%)	6 (6,5%)

<sup>a</sup> Valores nas colunas, seguidos de letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste Qui-quadrado e/ou pelo teste Exato Fisher em nível de 5% de significância ( $p>0,05$ ). \*Animais jovens, sem definição para utilização no momento da coleta; não sendo, portanto inclusos na análise estatística.

Os estudos relacionados com o agente da EME se concentram nos Estados Unidos, e na sua maioria são realizados com animais de raças Puro Sangue, principalmente de corrida. No nosso estudo, apesar de não haver associação entre a utilização dos animais e a soropositividade, as maiores prevalências observadas foram para os animais utilizados para trabalho (32,3%), para reprodução (28,6%) e para o esporte (28,0%). Os animais de trabalho em geral recebem um tratamento básico, e quando não estão sendo utilizados ficam na sua maioria soltos a pasto. A categoria de animais utilizados para reprodução é representada principalmente por éguas utilizadas como receptoras de embriões. Essas éguas receptoras são manejadas diariamente somente no período da transferência dos embriões, no restante do ano são mantidas predominante em piquetes ou à pasto. Esse fato pode ser responsável por uma prevalência maior nesses dois grupos de animais, sugerindo mais uma vez que o contato com o vetor possa acontecer principalmente em pastos onde há presença de fontes de água, sejam correntes ou paradas. Na categoria dos animais de esporte a maior parte era composta por equinos de pólo, sendo estes na maioria da raça PSI provenientes do sul do Brasil, área onde a EME é reconhecidamente um problema (DUTRA et al., 2001). Uma das menores prevalências observadas foi nos animais utilizados para exposição (18,2%) fato que pode ser

devido ao manejo desses animais, que passam a maior parte do tempo em baias ou soltos em piquetes próximos a área central da propriedade, sendo manejados de forma criteriosa e diária. Segundo Kipper et al. (1992) a estabulação promove um “efeito protetor” reduzindo o risco de exposição ao agente da doença, pela limitação de contato com o vetor. A menor prevalência observada foi nos animais onde a utilização ainda era indefinida até o momento das coletas (5,6%, 1/18), categoria composta principalmente por potros com idade inferior a um ano, sendo que o único animal positivo nesta categoria tinha idade de 1,3 anos. Este dado é semelhante aos obtidos por Dutra et al. (2001) onde não foi observada evidência clínica em nenhum animal com idade inferior a um ano de idade numa avaliação retrospectiva de 10 anos em uma propriedade com histórico de EME. Não houve associação entre a origem dos animais e a soropositividade ( $p>0,05$ ), sendo a prevalência de anticorpos anti-*N. risticii* para animais nascidos na propriedade de 25,6% (34/133) e para animais nascidos fora da propriedade de 26,7% (58/217), conforme Tabela 11.

**Tabela 11.** Frequência de anticorpos anti-*Neorickettsia risticii* nas titulações de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 em equinos através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função da origem dos animais.

Origem	N	Positivos	Título				
			1:50	1:100	1:200	1:400	1:800
Nascidos na propriedade	133	34 <sup>a</sup> (25,6%)	17 (50,0%)	0 (0,0%)	5 (14,7%)	12 (35,3%)	0 (0,0%)
Nascido Fora da propriedade	217	58 <sup>a</sup> (26,7%)	31 (53,4%)	0 (0,0%)	7 (12,1%)	14 (24,1%)	6 (10,3%)
Total	350	92 (26,3%)	48 (52,2%)	0 (0,0%)	12 (13,0%)	26 (28,3%)	6 (6,5%)

<sup>a</sup> Valores nas colunas, seguidos de letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste Qui-quadrado e/ou pelo teste Exato Fisher a 5% de significância ( $p>0,05$ ).

A introdução de animais em áreas endêmicas foi caracterizada como um sério problema por Dutra et al. (2001) no Uruguai e no extremo sul do Brasil, onde verificou-se que de 34 animais provenientes de uma área não endêmica para EME introduzidos numa fazenda considerada endêmica para a doença, 11 desenvolveram sinais clínicos característicos da doença, e destes 11 animais acometidos 8 vieram a óbito num período de 3 anos. Isso sugere o desenvolvimento de uma imunidade protetora em animais nativos de regiões endêmicas na área avaliada por estes pesquisadores. Neste estudo não houve associação entre a variável nascido ou não na propriedade, o que pode ser devido ao fato da maior parte dos animais serem oriundos do próprio Rio de Janeiro, o que nos sugere que o agente circule em outras regiões do estado além da avaliada neste estudo.

Dos 350 animais utilizados no presente estudo, 40 tinham sua origem desconhecida pelo responsável, 301 eram de origem nacional e nove importados, sendo dois da Argentina e sete do Uruguai. Dos 301 animais nacionais, 249 eram do próprio estado do Rio de Janeiro, 29 de São Paulo, 18 do Rio Grande do Sul e os outros seis de Minas Gerais, Mato Grosso e Paraná. Nos animais nacionais, a maior prevalência de anticorpos foi verificada naqueles animais oriundos de São Paulo, estado tradicional em esportes equestres como pólo e corrida, com frequência de 46,4% (13/29). Seguido pelo Rio de Janeiro com 24,9% (62/249) e pelo Rio Grande do Sul com 16,7% (3/18). Nos dois animais importados da Argentina, um era positivo, e dos sete do Uruguai, dois foram positivos.

A avaliação dos parâmetros clínicos é uma importante ferramenta para verificar a higidez dos animais incluídos no estudo, além de possibilitar a identificação de sinais clínicos característicos da EME, como depressão, anorexia, diminuição dos borborigmos intestinais, aumento da temperatura corporal, edema ventral e de membros, desidratação e diarreia

(DUTTA et al., 1985; MULVILLE, 1991; DUTRA et al., 2001). As frequências de anticorpos em função dos parâmetros clínicos encontradas no presente estudo estão demonstradas na Tabela 12.

**Tabela 12.** Frequência de anticorpos anti-*Neorickettsia risticii* nas titulações de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 em equinos através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em função dos parâmetros clínicos dos animais.

Parâmetro Clínico	N	Positivos	Titulação				
			1:50	1:100	1:200	1:400	1:800
<b>Frequência Cardíaca</b>							
Normal	306	83 <sup>a</sup> (27,1%)	44 (53,0%)	0 (0,0%)	11 (13,3%)	23 (27,7%)	5 (6,0%)
Aumentada	44	9 <sup>a</sup> (20,5%)	4 (44,4%)	0 (0,0%)	1 (11,1%)	3 (33,3%)	1 (11,1%)
Total	350	92 (26,3%)	48 (52,2%)	0 (0,0%)	12 (13,0%)	26 (28,3%)	6 (6,5%)
<b>Frequência Respiratória</b>							
Normal	335	88 <sup>a</sup> (26,3%)	45 (51,1%)	0 (0,0%)	12 (13,6%)	25 (28,4%)	6 (6,8%)
Aumentada	15	4 <sup>a</sup> (26,7%)	3 (20,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (6,7%)	0 (0,0%)
Total	350	92 (26,3%)	48 (52,2%)	0 (0,0%)	12 (13,0%)	26 (28,3%)	6 (6,5%)
<b>Temperatura</b>							
Normal	325	88 <sup>a</sup> (27,1%)	44 (50,0%)	0 (0,0%)	12 (13,6)	26 (29,5%)	6 (6,8%)
Aumentada	25	4 <sup>a</sup> (16,0%)	4 (100,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Total	350	92 (26,3%)	48 (52,2%)	0 (0,0%)	12 (13,0%)	26 (28,3%)	6 (6,5%)
<b>Mucosa Oral</b>							
Normocorada	338	90 <sup>a</sup> (26,6%)	48 (53,3%)	0 (0,0%)	12 (13,3%)	24 (26,7%)	6 (6,7%)
Hipocorada	12	2 <sup>a</sup> (16,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (16,7%)	0 (0,0%)
Total	350	92 (26,3%)	48 (52,2%)	0 (0,0%)	12 (13,0%)	26 (28,3%)	6 (6,5%)
<b>Mucosa Ocular</b>							
Normocorada	338	90 <sup>a</sup> (26,6%)	48 (53,3%)	0 (0,0%)	12 (13,3%)	24 (26,7%)	6 (6,7%)
Hipocorada	12	2 <sup>a</sup> (16,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (16,7%)	0 (0,0%)
Total	350	92 (26,3%)	48 (52,2%)	0 (0,0%)	12 (13,0%)	26 (28,3%)	6 (6,5%)
<b>Motilidade</b>							
Normal	341	88 (25,8%)	45 (51,1%)	0 (0,0%)	12 (13,6%)	25 (28,4%)	6 (6,8%)
Aumentada*	4	1 (25,0%)	1 (100,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Diminuída *	5	3 (60,0%)	2 (60,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (33,3%)	0 (0,0%)
Total	350	92 (26,3%)	48 (52,2%)	0 (0,0%)	12 (13,0%)	26 (28,3%)	6 (6,5%)
<b>Tugor cutâneo</b>							
Normal	312	87 <sup>a</sup> (27,9%)	45 (51,7%)	0 (0,0%)	12 (13,8%)	25 (28,7%)	5 (5,7%)
Diminuído	38	5 <sup>a</sup> (13,2%)	3 (60,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (20,0%)	1 (20,0%)
Total	350	92 (26,3%)	48 (52,2%)	0 (0,0%)	12 (13,0%)	26 (28,3%)	6 (6,5%)

<sup>a</sup>Valores nas colunas, seguidos de letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste Qui-quadrado e/ou pelo teste Exato Fisher em nível de 5% de confiança (p>0,05). \*Não foram realizadas análises estatísticas nestas variáveis devido ao número amostral e/ou limitações referentes ao teste estatístico.

Do total de 350 animais, 306 apresentaram frequência cardíaca (FC) dentro da faixa de normalidade para a espécie, e 44 apresentaram FC acima desta faixa (28-44 bpm/minuto). O aumento da FC pode ser um indicativo de estresse, exercício, dor, febre, hipovolemia, anemia grave, infecção ou choque (REED; BAYLY, 2000). Nos animais avaliados neste estudo a frequência cardíaca aumentada em 44/350 animais não deve ser considerada como um indicativo de alteração sistêmica grave, podendo ser atribuída a estresse devido a manipulação no momento da coleta ou ao exame ter sido realizado pouco tempo após exercício. Destes animais com FC acima da normalidade, 20,5% (9/44) foram positivos na RIFI, e destes apenas um animal com título de 1:800, o que nos sugere que na maioria dos casos esta alteração seja fisiológica. Da mesma forma, a frequência respiratória aumentada em 15/350 animais pode ser somente uma alteração fisiológica, atribuída ao estresse, exercício ou temperatura ambiente elevada.

Em relação à temperatura corporal (TC), dos 350 animais avaliados no estudo, 325 apresentaram TC dentro dos parâmetros normais (37,0 – 39,0°C) para a espécie e 25 apresentaram valores acima da normalidade, com maior valor de 40,3°C. Dos animais com temperatura elevada 16% (4/25) foram positivos na sorologia para *N. risticii*. O aumento da temperatura corporal está entre os sinais clínicos característicos da fase aguda da EME (DUTTA et al., 1985; MULVILLE, 1991; DUTRA et al., 2001). Entretanto, segundo Speirs (1999) a temperatura pode sofrer um aumento de até 2,5°C em consequência de atividade física e de até 1,5°C em condições de temperatura e umidade elevadas. Sendo assim, este aumento da temperatura nos animais negativos na RIFI pode ser explicado pelo fato de alguns animais terem sido examinados logo ao chegarem, muitas vezes após algum exercício, ou devido à temperatura e umidade elevadas, uma vez que as coletas foram feitas nos meses mais quentes do ano.

Dos 350 animais avaliados, 12 apresentaram mucosas oral e ocular hipocoradas, e 16,7% (2/12) foram positivos na RIFI. Mucosas com coloração pálida pode ser reflexo de uma alimentação deficiente ou devido a infestações por ecto e endoparasitas. No nosso estudo, 206/350 animais eram provenientes de propriedades com nível ruim ou razoável, onde o controle de ecto e endoparasitos era realizado esporadicamente ou em infestações maciças. Parasitoses associadas a alimentação com forrageiras de má qualidade podem estar relacionados a hipocoloração de mucosas nesses animais.

O aumento ou redução da motilidade intestinal pode estar associado a alimentação. No período pós prandial há um aumento fisiológico dos movimentos intestinais, ao passo que em períodos de jejum esta motilidade sofre uma redução (SPEIRS, 1999). Dos 350 animais utilizados no estudo, quatro equinos apresentavam motilidade aumentada e cinco motilidade diminuída, podendo esta alteração ser em decorrência da presença ou não de alimentação próxima ao momento do exame clínico.

Trinta e oito animais dos 350 avaliados exibiram turgor cutâneo diminuído, de modo que esta alteração pode ser um indicativo de desidratação ou ser fisiológica em animais mais velhos, onde a elasticidade da pele diminui. No presente estudo, onde as coletas foram realizadas nos meses mais quentes do ano, a idade dos animais associada a ingestão de quantidades inadequadas de água para repor de forma eficiente as perdas da transpiração, o que podem explicar essa alteração.

Os valores da avaliação hematológica dos animais positivos e negativos na RIFI para *N. risticii* estão demonstrados na Tabela 13.

**Tabela 13.** Eritrograma, leucograma, sólidos totais e fibrinogênio de equinos soropositivos e soronegativos para *Neorickettsia risticii* através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).

Parâmetros	Resultado	N	Média	DP	EP	Intervalo de Variação		Limites de Variação****	Sig.
						Inferior	Superior		
<b>Serie Vermelha</b>									
HEM (x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )**	Negativo	258	7,1 <sup>a</sup>	1,3	0,1	2,4	11,0	6,0 – 11,3	0,50
	Positivo	92	7,0 <sup>a</sup>	1,3	0,1	4,1	11,2		
HB (g/dL)*	Negativo	258	11,1 <sup>a</sup>	1,8	0,1	3,3	15,4	10,6 – 18,9	0,54
	Positivo	92	11,2 <sup>a</sup>	1,7	0,2	7,2	14,7		
VG (%)*	Negativo	258	31,5 <sup>a</sup>	5,4	0,3	15,0	45,8	34 - 49	0,59
	Positivo	92	31,9 <sup>a</sup>	5,0	0,5	20,5	42,5		
VCM (fm <sup>3</sup> )	Negativo	258	44,7 <sup>a</sup>	4,7	0,3	33,0	62,0	38 - 49	0,32
	Positivo	92	45,7 <sup>a</sup>	3,4	0,4	35,0	55,0		

HCM (pg)	Negativo	258	15,8 <sup>a</sup>	1,6	0,1	11,8	20,9	15 - 19	0,26
	Positivo	92	16,1 <sup>a</sup>	1,2	0,1	12,1	20,3		
CHCM (g/dL)	Negativo	258	35,4 <sup>a</sup>	2,5	0,2	17,0	65,4	37 - 40	0,28
	Positivo	92	35,1 <sup>a</sup>	1,3	0,1	25,8	37,2		
<b>Série Branca</b>									
LEUC (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )**	Negativo	258	10,7 <sup>a</sup>	3,1	0,2	4,1	25	5,3 - 13,8	0,02
	Positivo	92	9,9 <sup>b</sup>	2,8	0,3	4,3	20,1		
LINF (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	Negativo	258	3,0 <sup>a</sup>	1,5	0,1	0,9	10,8	1,1 - 5,7	0,01
	Positivo	92	2,5 <sup>b</sup>	1,0	0,1	1,0	6,1		
MON (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	Negativo	258	0,7 <sup>a</sup>	0,3	0,0	0,2	2,6	0,1 - 0,6	0,03
	Positivo	92	0,6 <sup>b</sup>	0,2	0,0	0,2	1,7		
GRAN (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )**	Negativo	258	7,0 <sup>a</sup>	2,0	0,1	2,8	16,8	2,7 - 9,7	0,22
	Positivo	92	6,8 <sup>a</sup>	2,2	0,2	2,9	16,4		
<b>Outros Valores</b>									
PLAQ (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	Negativo	258	146,2 <sup>a</sup>	51,3	3,2	54,0	361,0	46 - 194	0,57
	Positivo	92	140,1 <sup>a</sup>	42,7	4,5	52,0	246,0		
MPV (fm <sup>3</sup> )	Negativo	258	6,4 <sup>a</sup>	0,4	0,0	5,2	8,1	5,6 - 8,3	0,95
	Positivo	92	6,5 <sup>a</sup>	0,4	0,0	5,5	7,6		
PPT (g/dL)	Negativo	258	7,4 <sup>a</sup>	0,6	0,0	5,6	9,2	5,2 - 7,9	0,12
	Positivo	92	7,5 <sup>a</sup>	0,7	0,1	6,0	8,8		
FIB (mg/dL)	Negativo	258	327,5 <sup>a</sup>	159,0	9,9	100,0	800	100 - 400	0,79
	Positivo	92	326,1 <sup>a</sup>	141,3	14,7	100,0	600		

<sup>a</sup>Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si através do teste F, quando os dados foram paramétricos, Mann-Whitney quando não paramétrico (p>0,05). HEM: hemácias; HB: hemoglobina; VG: volume globular; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular médio; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular médio; LEUC: leucócitos; LINF: linfócitos; MON: monócitos; GRAN: granulócitos. PLAQ: plaquetas; MPV: volume plaquetário médio; PPT: sólidos totais; FIB: fibrinogênio; N: número de equinos; DP: desvio padrão; EP: erro padrão; Sig.: Valor de significância; \*Dados paramétricos; \*\*Dados transformados; \*\*\*(SHALM, 2010).

Das variáveis hematológicas analisadas, somente foi verificada associação entre a positividade dos animais na RIFI e os valores de leucócitos (p=0,02), linfócitos (p=0,01) e monócitos (p=0,03). Em relação aos valores de leucócitos foi observado nos animais soropositivos valores médios um pouco abaixo dos animais negativos. Apesar de existir associação entre positividade e leucometria, os valores médios mantiveram-se dentro da normalidade para a espécie, segundo Shalm et al. (2010).

Leucopenia com desvio a esquerda e leucocitose rebote são alterações hematológicas marcantes na EME. Alterações na concentração de proteínas plasmáticas, aumento do hematócrito e trombocitopenia também podem ser observadas durante o curso clínico da doença (DUTTA et al., 1985; ZIMMER et al., 1987; HELLER et al., 2004; OLIVER et al., 2006).

No presente estudo observou-se uma ligeira redução no número de leucócitos dos animais positivos, conforme referenciado na literatura (DUTTA et al., 1985; ZIMMER et al., 1987; HELLER et al., 2004). Dutta et al. (1985) realizaram infecção experimental em dois animais e as observações ao longo de quase dois meses revelaram alterações na contagem total de leucócitos em apenas dois dias, obtendo o menor valor de leucócito (5.000/mm<sup>3</sup>) na fase aguda da doença 14 dias pós infecção e o maior valor (13.800/mm<sup>3</sup>) 20 dias após a inoculação. Entretanto, no presente estudo avaliando os animais soropositivos na RIFI não foram observadas as demais alterações hematológicas citadas na literatura.

Os menores valores médios de linfócitos observados no grupo de animais soropositivos (2,4 x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>) em relação aos soronegativos (3,0 x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>) provavelmente

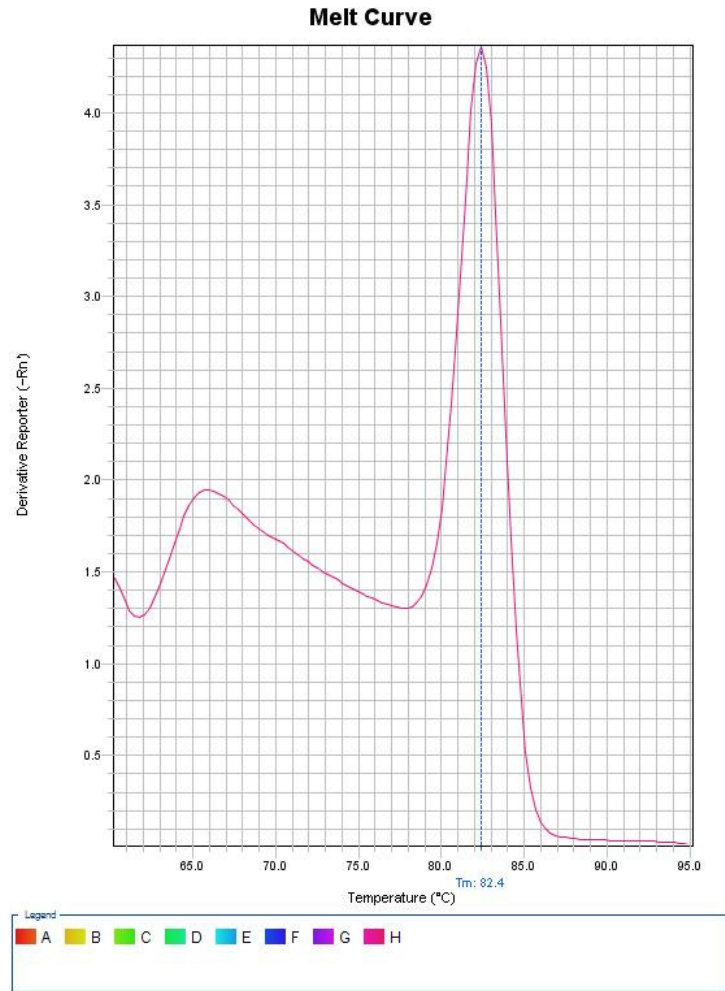
têm origem fisiológica, uma vez que estão dentro dos valores de referência para espécie. Entretanto, Smith (1993) cita como causas de linfopenia em equinos o estresse, administração de corticosteróides exógenos, infecções virais, enfermidades riquetsiais e desnutrição, entre outros fatores.

Em relação aos sólidos totais, apesar de não haver associação entre esta variável e a soropositividade, os animais soropositivos (7,6 g/dl) apresentaram média superior aos soronegativos (7,4 g/dl). Contudo os valores foram mantidos dentro da faixa de normalidade. Segundo Smith (1993), causas comuns de hiperproteinemia em equinos incluem desidratação e “Febre Equina do Potomac”. Zimmer et al. (1997) em estudo envolvendo infecção experimental, verificaram hiperproteinemia no período após o aparecimento da febre nos animais estudados. Embora, no presente estudo os animais soropositivos tenham exibido valor médio de sólidos totais superior aos soronegativos, esses se mantiveram na normalidade e o grupo de animais avaliados era aparentemente saudável, enquanto Zimmer et al. (1997) avaliaram animais na fase aguda da doença decorrente de infecção experimental.

O índice hematológico VCM (Volume Corpuscular Médio) é reflexo do diâmetro médio do eritrócito. No presente estudo, o VCM dos animais soropositivos foi superior (46,8  $\text{fm}^3$ ) ao VCM dos soronegativos (44,7  $\text{fm}^3$ ). Segundo Smith (1993), um VCM aumentado é indicativo de anemia regenerativa, visto que os eritrócitos imaturos são maiores que os maduros. Contudo, os valores de hematócrito de ambos os grupos avaliados apresentaram valores médios abaixo da faixa de normalidade, sendo de 31,5% nos animais negativos e 32,2% nos positivos, sem associação ( $p>0,05$ ) com a soropositividade. A anemia é um achado comum nas apresentações clínicas da EME (ZIMMER et al., 1987), entretanto os achados no presente estudo não podem ser atribuídos somente a positividade, pois o grupo de animais soronegativos também apresentou valores abaixo dos limites de referência. Acredita-se que este achado pode estar relacionado à ausência de valores de referência de eritrograma e leucograma específicos para equinos na região estudada. Sabe-se que fatores climáticos, nutricionais e genéticos podem interferir nos padrões normais dos animais, sem significar alterações fisiológicas.

Todas as amostras avaliadas no presente estudo através do Real Time PCR (qPCR) foram negativas. Esse fato pode ser atribuído ao curto período de circulação do agente de 10 a 15 dias (RIKIHISA et al., 1993; MOTT et al. 1997). Além disso, a maioria dos estudos onde as análises moleculares foram positivas são decorrentes de infecção experimental, utilizando cultivo celular, sangue total de animais durante o curso clínico da EME ou pela administração via oral de trematódeos infectados com *N. risticii* (BISWAS et al., 1991; DUTTA et al., 1985; MOTT et al., 2002), enquanto no nosso estudo as amostras foram provenientes de animais aparentemente saudáveis.

Ressalta-se o funcionamento adequado da reação do qPCR por meio da utilização do controle positivo de *N. risticii* em todas as reações, o que pode ser demonstrado através da curva de dissociação deste controle positivo (Figura 2).



**Figura 2.** Curva de dissociação do controle positivo de *N. risticii* utilizado na reação de qPCR.

## 5 CONCLUSÕES

A prevalência de 26,6% para anticorpos IgG anti-*Neorickettsia risticii* em equinos na microrregião de Itaguaí evidencia a circulação deste agente na região estudada.

A idade é um fator associado com a soropositividade para *N. risticii*, pois nos animais com menos de 1 ano nenhum foi positivo para *N. risticii* na RIFI.

O nível de qualidade da propriedade é um fator associado com a soropositividade para *N. risticii*, onde as propriedades com nível ruim apresentam maior soropositividade diferindo estatisticamente das propriedades com nível razoável e bom.

A soropositividade para *N. risticii* independe do sexo, da raça, do tipo de área da propriedade, da presença de caramujos, da frequência de acesso á pastagem e da origem dos animais.

Os parâmetros hematológicos leucócitos, linfócitos, e monócitos são fatores associados com a soropositividade para *N. risticii*, entretanto os valores médios mantiveram-se dentro dos limites de referência para a espécie.

As variáveis clínicas frequências cardíaca e respiratória, motilidade intestinal, coloração de mucosas, tempo de preenchimento capilar, temperatura corporal e turgor cutâneo não são fatores associados com a soropositividade dos animais para *N. risticii*.



## 6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATWILL, E.R.; MOHAMMED, H.O.; LOPEZ, J.W.; McCULLOCH, C.E.; DUBOVI, E.J. Cross-sectional evaluation of environmental, host and management factors associated with risk of seropositivity to *Ehrlichia risticii* in horses of New York state. **American Journal Veterinary Research**, v.57, p. 278-285, 1996.

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, R. Geographical variation of seropositivity to *Ehrlichia risticii* (Equine monocytic ehrlichiosis) of horses in New York State. **Equine Veterinary Journal**, v.26, n.2, p.143-147, 1994.

AYRES, M.; AYRES JR., M.; AYRES, D.; SANTOS, A.A.S. **BioEstat 5.0 – Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas**. Sociedade Civil Mamirauá, Tefé, 2007. 380 p.

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.

BOGDAN, A.V. **Tropical pasture and fodder plants**. New York, Longman, 1977. 475p.

BREIDER, M.A.; HENTON, J.E. Equine monocytic ehrlichiosis (Potomac Horse Fever). **Equine Practice**, v.9, p.20-24, 1987.

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.5, n. 27, 1990.

CASSAMAGNAGHI, A.; CASSAMAGNAGHI, A. Anemia infecciosa. Su reconocimiento em los equinos Del Uruguay, **Veterinary Uruguay**, v.4, p. 772-807, 1948.

CHAE, J-S.; KIM, M-S.; MADIGAN, J. Detection of Neorickettsia (*Ehrlichia*) *risticii* in tissues of mice experimentally infected with cercariae of trematodes by in situ hybridization. **Veterinary Microbiology**, v.88 p.233–243, 2002.

CHAE, J.S.; PUSTERLA, N.; JOHNSON, E.; DEROCK, E.; LAWER, S.P; MADIGAN, J.E. Infection of aquatic insects with trematodes metacercariae carrying *Ehrlichia risticii*, the causative Potomac horse fever. **Journal of Medical Entomology**, v. 37, p. 619-625, 2000.

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.

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 *Parapleurolophocephalus cercariae* (Trematoda: Digenea) como possíveis vetores. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.3, p.325-329, 2005.

COIMBRA, H.S. **Erliquiose Monocítica Equina no Rio Grande do Sul: aspectos clínicos, anatomo-patológicos e epidemiológicos**. 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2003.

COIMBRA, H.S.; SCHUCH, L.F.; RIET-CORREA, F.; CURCIO, B.R.; RAFFI, M.B.; DELLAGOSTIN, O.; MELLO, D.F.M.; HAAG, R. Diarréia em equinos causada por *Ehrlichia risticii* no Sul do Brasil. **Anais XIV CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, II CONGRESSO DE MEDICINA VETERINÁRIA DO CONE SUL**, Gramado, RS, v.1, p.200. 1999.

COLES, E.H. **Patologia Clínica Veterinária**. 3ª ed., Manole, São Paulo, 1986, 566p.

CRAWFORD, T.B.; DILBECK, P. A brief survey of potomac horse fever. **Veterinary Review**, v.8, n.1, p.75, 1988.

DAWSON, J.E.; HOLLAND, C.J.; RISTIC, M. Susceptibility of cats to infection with *Ehrlichia risticii*, causative agent of equine monocytic ehrlichiosis (Potomac Horse Fever). **American Journal of Veterinary Research**, v.49, p. 1497, 1988.

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 Record**, v.121, 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.

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 horses in Uruguay and southern Brazil. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v.13, p.433-437, 2001.

DUTTA, S.K. Present status of Research on Monocytic and granulocytic Ehrlichiosis of Animals and Humans. 1. International Vet. Mic. Cong., Univ. Istanbul, **Veterinary Faculty Turkey**, p.25-27, 1996.

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

DUTTA, S.K.; RICE, R.M.; HUGHES, T.D.; SAVAGE, P.K.: MYRUP, A.C. Detection of serum antibodies against *Ehrlichia risticii* in Potomac Horse Fever by enzyme-linked Immunosorbent assay. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.14, p. 85-92, 1987.

DUTTA, S.K.; MYRUP, A.C.; RICE, R.C.; ROBL, M.G.; HAMMOND, R.C.: Experimental reproduction of Potomac horse fever in horses with a newly isolated Ehrlichia organism. **Journal of Clinical Microbiology**, v.22, p.265-269, 1985.

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.

FLETCHER, M.G. **Determination of the possible role of arthropods as vector for Potomac Horse Fever**. 95p. (Tese de Doutorado), Universidade Politécnic da Virgínia, VA, 1987.

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, 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**, s. 84, p.319-322, 1988.

HAHN, N.E.; FLETCHER, M.; RICE, R.M.; KOCAN, K.M.; HANSEN, J.W.; HAIR, J.A.; BARKER, R.W.; PERRY, B.D. Attempted transmission of *Ehrlichia risticii*, causative agent of Potomac Horse Fever, by the ticks, *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum*. **Experimental & Applied Acarology**, v.8, p.41-50, 1990.

HELLER, M.C.; MCCLURE, J.; PUSTERLA, N.; PUSTERLA, J.B.; STAHEL, S. Two cases of *Neorickettsia (Ehrlichia) risticii* infection in horses from Nova Scotia. **Canadian Veterinary Journal**, v.45, p.421-423, 2004.

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.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores de produção pecuária. 2010. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/territorio/ufmenu.asp?z=t&o=4>>. Acessado em: 15 de Jan. 2011.

JENNY, A.L. National veterinary sciences laboratories (USDA) report. **American Association of Equine Practitioners**, v.2, p.64-66, 1984.

KANTER, M.; MOTT, J.; OHASHI, N.; FRIED, B.; REED, S.; LIN, Y.C.; RIKIHISA, Y. Analysis of 16S rRNA and 51-Kilodalton Antigen gene and Transmission in Mice of *Ehrlichia risticii* in Virgulate Trematodes from *Elimia livescens* snails in Ohio. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.3349-3358, 2000.

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, n. 4, p. 251-259, 1992.

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.

LAPPIN, 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.; 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, 2000.

MADIGAN, J.E.; RIKIHISA, Y.; PALMER, J.E.; DeROCK, E.; MOTT, J. Evidence for a right rate of false-positive results with the indirect fluorescent antibody test for Ehrlichia risticii antibody in horses. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.207, n.11, p.1448-1453, 1995.

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.

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 and Immunity** v.62, p.3156, 1994.

- 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.
- MOTT J.; RIKIHISA Y.; ZHANG Y.; REED S.M.; YU C.Y. Comparison of PCR and Culture to the Indirect Fluorescent-Antibody Test for Diagnosis of Potomac Horse Fever. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 2215-2219. 1997.
- MULVILLE, P. Equine monocytic ehrlichiosis (Potomac horse fever): a review. **Equine Veterinary Journal**, v.23, 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**, 15; 196 (12), p.1967-1970, 1990.
- OLIVER, O.E.; STÄMPFLI, H. Acute diarrhea in the adult horse: Case example and review. **Veterinary Clinics Equine Practice**, v.22, p. 73-84, 2006.
- OLSEN, W. Phylum Platyhelminthes. In: **Animal parasites. Their life cycles and ecology**. 3<sup>o</sup> ed. Baltimore, MD, US: University Park Press, 1974, p. 199-333.
- PALMER, J.E.; BENSON, C.E. Oral transmission of *Ehrlichia risticii* resulting in Potomac Horse Fever. **Veterinary Record**, v.122, p.635-639, 1988.
- 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 American Veterinary Medical Association**, v. 189, p. 197-199, 1986.
- PARK, J.; CHOI, K.S.; DUMLER, J.S. Major surface protein 2 of *Anaplasma phagocytophilum* facilitates adherence to granulocytes. **Infection and Immunity**, v.71, p.4018–4025, 2003.
- PEEL, M.C.; FINLAYSON, B.L.; MCMAHON, T.A. "Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification". **Hydrology and Earth System Sciences**, v.11, p.1633–1644, 2007.
- PERRY, B.D.; PALMER, J.E.; TROUTT, H.F.; BIRCH, J.B.; MORRIS, D.; EHRICH, M.; RIKIHISA, Y. A case-control study of Potomac horse fever. **Preventive Veterinary Medicine**, v.4, p.69-82, 1986.
- PERRY, B.D.; RIKIHISA, Y.; SAUNDERS, G. Transmission of Potomac horse fever by intradermal route. **Veterinary Record**, v.116, p.246–247, 1985.
- PRETZMAN, C.T.; RIKIHISA, Y; RALPH, D. et al: Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting Potomac horse fever disease, **Journal of Clinical Microbiology**, v.25, p.31-36, 1987.

- PRETZMAN, C.; RALPH, D.; STOTHARD, D. R.; FUERST, P. A.; RIKIHISA, Y. 16S rRNA gene sequence of *Neorickettsia helminthoeca* and its phylogenetic alignment with members of the genus *Ehrlichia*. **Int J Syst Bacteriol**, v. 45, p.207-211, 1995.
- 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.
- PUSTERLA, N.; MADIGAN, J.E.; CHAE, J.-S.; DEROCK, E.; JOHNSON, E.; PUSTERLA, J.B. Helminthic Transmission and Isolation of *Ehrlichia risticii*, the Causative Agent of Potomac Horse Fever, by Using Trematode Stages from Freshwater Stream Snails. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.1293-1297, 2000a.
- 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, 2000b.
- 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**, 90, p. 129-135, 2000c.
- REED, S.M; BAYLY, W.M. **Medicina Interna Equina**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 938p.
- 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, p.1501–1511, 1998.
- RIKIHISA, Y. Rickettsial Disease. In: REED, S.M.; BAYLEY, W.M.; SELTON, D.C. **Equine Internal Medicine**, ed. Saunders, 2 ed., p.96-109, 2004.
- RIKIHISA, Y. Rickettsial diseases. In: REED, S.M. & BAYLY, W.M.A. (Eds). **Equine Internal Medicine**. Philadelphia: W.B. Saunders, p.112-123, 1998.
- RIKIHISA, Y.; WADA, R., REED, S.M. Development of neutralizing antibodies in horses infected with *Ehrlichia risticii*, **Veterinary Microbiology**, v.36, p.139, 1993.
- RIKIHISA, Y.; JOHNSON, G.J.; WANG, Y.-Z.; REED, S.M.; FERTEL, R.; COOKE, H.J. Loss of adsorptive capacity for sodium chloride as a cause of diarrhea in Potomac horse fever. **Research in Veterinary Science**, v.52, p. 353-362, 1992.
- RIKIHISA Y.; STILLS H.; ZIMMERMAN, G. Isolation and continuous culture of *Neorickettsia helminthoeca* in macrophage cell line. **Journal of Clinical Microbiology**. v.29, n.9, p.1928-1933, 1991.
- RIKIHISA, Y. Growth of *Ehrlichia risticii* in human colonic epithelial cells. In: Rickettsiology: Current issues and perspectives. **New York Academy Science** v.590, p.104-110, 1990.

- RIKIHISA, Y.; REED, S.M.; SAMS, R.A.; GORDON, J.C.; PRETZMAN, C.I. Serosurvey of horses with evidence of equine monocytic ehrlichiosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.10, p. 1327-1332, 1990.
- 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.; PERRY, B.D. Causative Ehrlichial organism in Potomac horse fever. **Infection and Immunity**, v. 49, n. 3, p. 513-517, 1985.
- RIKIHISA, Y.; PERRY, B.D.; CORDES, D.O. Ultrastructural study of ehrlichial organism in the large colons of ponies infected with Potomac horse fever. **Infection and Immunity**, v.49, p. 505-515, 1985.
- RIKIHISA, Y.; PERRY, B.D.; CORDES, D.O. Rickettsial link with acute equine diarrhea. **Veterinary Record** v.115, p.554, 1984.
- RISTIC, M. DAWSON, J.; HOLLAND, C.J. Susceptibility of dogs to infection with *Ehrlichia risticii*, causative agent of equine monocytic ehrlichiosis (Potomac Horse Fever). **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, p. 1497, 1988.
- 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.
- ROBL, M.G. Potomac Horse Fever: Closing in on an unknown killer. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.80, p. 49-58, 1985.
- SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2ª ed. Belo Horizonte: Editora, FEPMVZ, 2002. 265 p.
- SHALM, O.W.; WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. (eds.) **Veterinary Hematology**, 6th ed. Blackwell Publishing. Iowa, 2010. 1206p.
- SCHMIDTMANN, E.T.; RICE, R.M.; ROBL, M.G.; AZAD, A.F. Search for an arthropod vector of *Ehrlichia risticii*. In: PROCEEDINGS OF A SYMPOSIUM ON POTOMAC HORSE FEVER. Veterinary Learning Systems Co., Louisville, Kentucky, p.9-16 (1988)
- SMITH, B. P. **Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais**: 1.ed. São Paulo: Manole, 1993. 900p.
- SPEIRS, V. C. **Exame Clínico de equinos**. Porto Alegre: ed. Artmed, 1ªed.1999. 366p.
- VAN HEECKEREN A, RIKIHISA Y, PARK J et al: Tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 and prostaglandin E2 production in murine peritoneal macrophages infected with *Ehrlichia risticii*, **Infection and Immunity**, v.61, p.4333, 1993.
- WEISS, E.; MULDER, J.W. The Rickettsias and Chlamydias. In: N.R. Krieg and J.G. Holt (Editors), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Vol.I. Williams and Wilkins, Baltimore, p.687-739, 1984.

WEISS, E.; DASCH, KANG, Y-H.; WESTFALL, H.N. Substrate utilization by *Ehrlichia sennetsu* and *Ehrlichia risticii* separated from host constituents by renografin gradient centrifugation. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n.11, p.5012-5017, 1988.

WHITLOCK, R.H.; PALMER, J.E.; BERSON, C.E.; ACLAND, H.M.; JENNY, L.A.; RISTIC, M. Potomac horse fever: clinical characteristics and diagnostic features. **In: PROCEEDINGS 27<sup>TH</sup> ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION VETERINARY LABORATORY DIAGNOSTICIANS**, p.103-124, 1984.

WILSON, J.H.; PUSTERLA, N.; BENGFORT, J.M.; ARNEY, L. Incrimination of Mayflies as a Vector of Potomac Horse Fever in an Outbreak in Minnesota. **In: PROCEEDINGS 52<sup>th</sup> ANNUAL CONFERENCE EQUINE PRACTITIONERS**, San Diego, CA. **American Association of Equine Practitioners**, v.52, p. 324-326, 1989

WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eukarya*. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.87, p. 4576-4579, 1990.

ZIEMER, L.E.; WHITLOCK, R.H.; PALMER, J.E.; SPENCER, P.A. Clinical and hematological variables in ponies with experimental induced equine ehrlichial colitis (Potomac horse fever). **American Journal Veterinary Research**, v.48, p.63-67, 1987.



## 7 ANEXOS

### ANEXO A: 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 equinos 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. Presença de caramujos nos pastos

sim  não qual época do ano \_\_\_\_\_

aquático  terrestre

#### 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 qual? \_\_\_\_\_

Outros ( ) quais? \_\_\_\_\_

### EXAME CLÍNICO:

FC: \_\_\_\_\_

FR: \_\_\_\_\_

Motilidade Intestinal: \_\_\_\_\_

Temperatura: \_\_\_\_\_

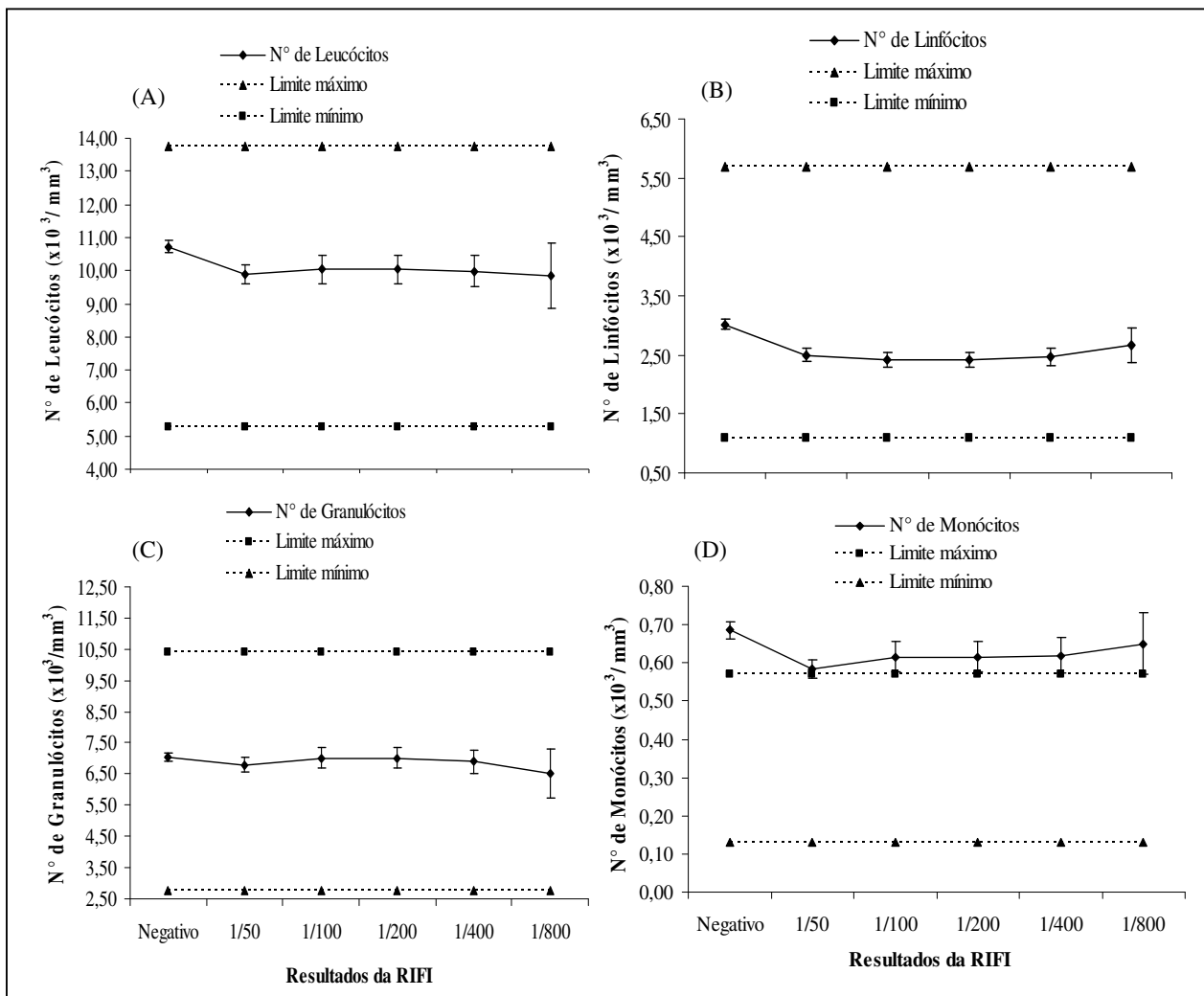
Mucosa oral: \_\_\_\_\_

Mucosa Ocular: \_\_\_\_\_

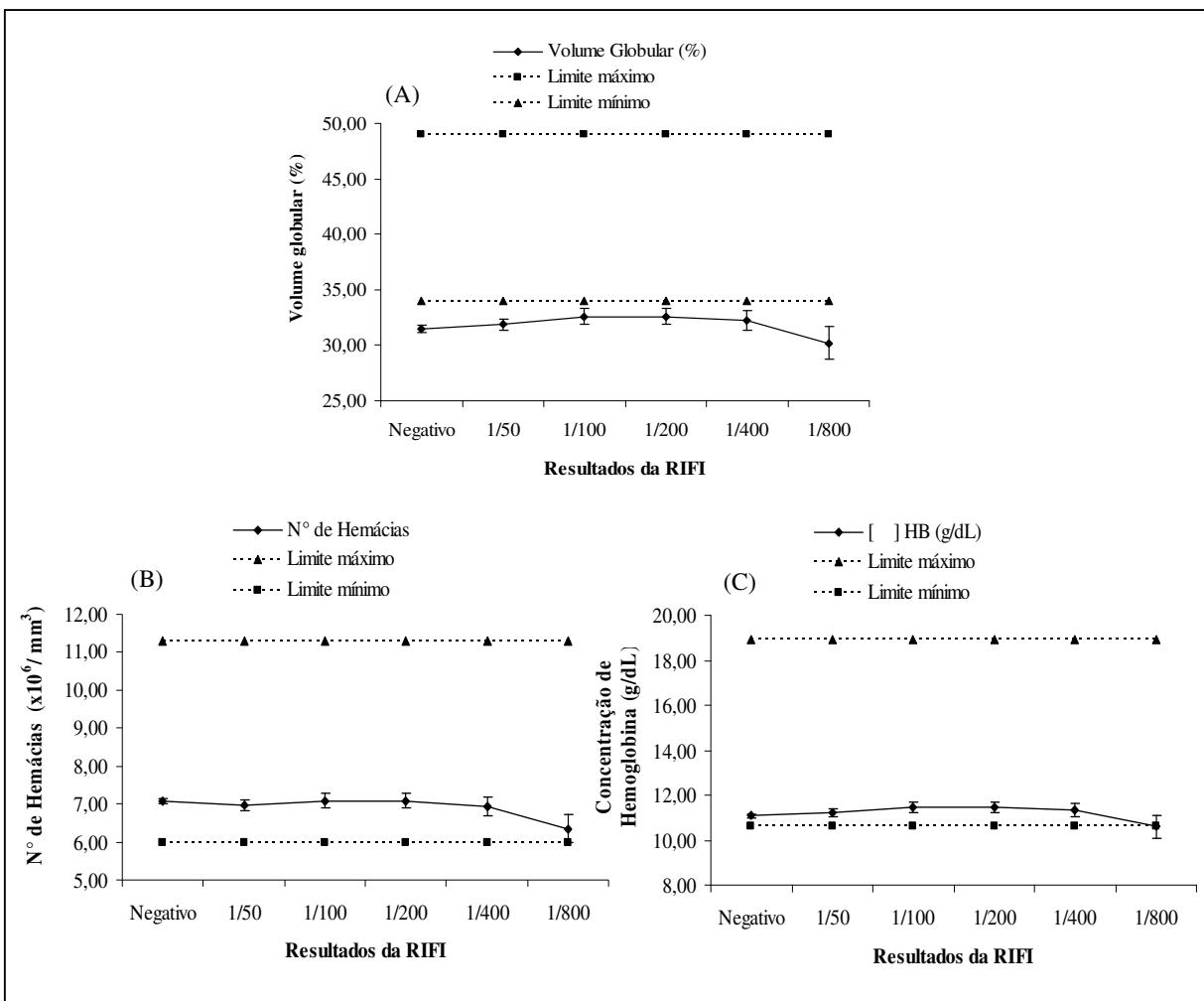
TPC: \_\_\_\_\_

Tugor Cutâneo: \_\_\_\_\_

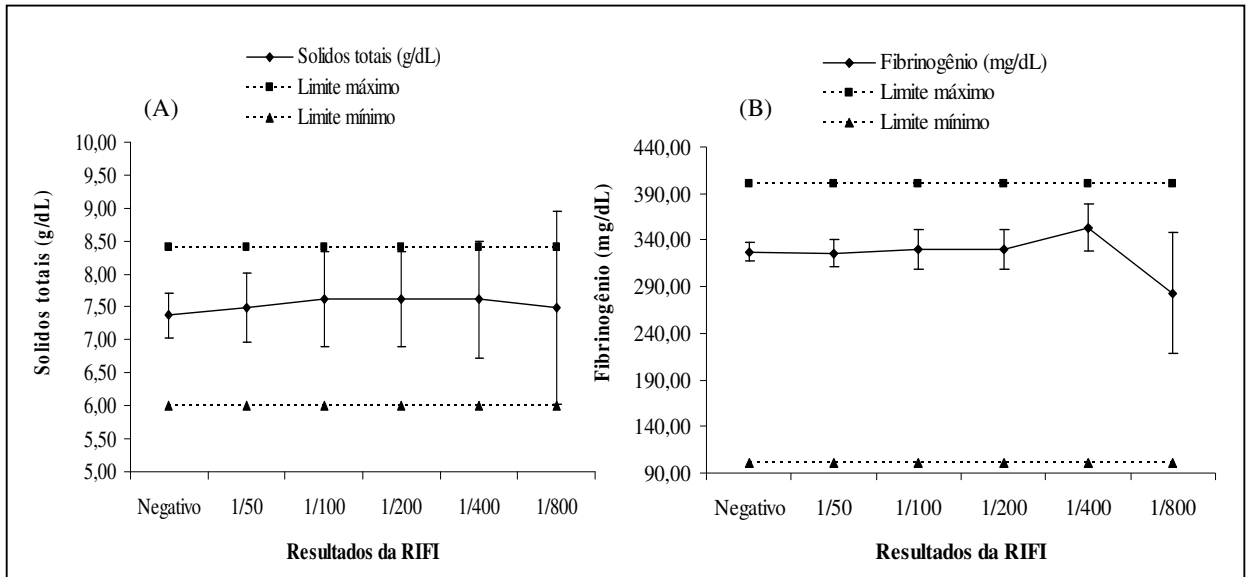
## ANEXO B: Gráficos dos parâmetros hematológicos



**Figura 1:** Número médio de leucócitos (A), linfócitos (B), granulócitos (C) e monócitos (D), seguido dos valores limites de normalidade (máximo e mínimo), em equinos soronegativos e soropositivos para *Neorickettsia risticii* em titulações de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800.



**Figura 2:** Percentual do volume globular, número médio de hemácias (A) e concentração de hemoglobina (C), seguido dos valores limites de normalidade (máximo e mínimo), em equinos soronegativos e soropositivos para *Neorickettsia risticii* em titulações de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800.



**Figura 3:** Valores de sólidos totais plasmáticos (A) e de fibrinogênio (B), seguido dos valores limites de normalidade (máximo e mínimo), em equinos soronegativos e soropositivos para *Neorickettsia risticii* em titulações de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800.

**ANEXO C:** Protocolo de extração de DNA de *N. risticii* a partir de cultivo de células DH82 fixadas em lâminas preparadas para Imunofluorescência com auxílio do kit de extração de DNA (DNeasy Tissue Kit, Qiagen, Valencia, CA, USA).

- 1- Remova as células fixadas na lâmina com o auxílio de uma agulha 21 x 0,8mm estéril.
- 2- Em ambiente fechado, lave cada poço da lâmina com 8 $\mu$ L de tampão PBS (KCl 2,7mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47mM, NaCl 136,89mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1mM, pH 7,4) e coloque a suspensão em um microtubo de 1,5 mL. Todos os poços das lâminas deverão ser lavados até um volume máximo de 200 $\mu$ L.
- 3- Ao tubo de 1,5mL contendo a suspensão de celular, adicione 20 $\mu$ L de proteinase K. Misture no vortex por 10s e incube a 56 °C por 25 minutos. (Obs: Esse tempo pode ser prorrogado até as células estarem completamente lisadas)
- 4- Vortex por 15 s. Adicione 200 $\mu$ L de tampão AL na amostra. Misture vigorosamente no vortex. Em seguida adicione 200 $\mu$ L de etanol 100%. Misture novamente no vortex vigorosamente.
- 5- Pipete a mistura em uma coluna (DNeasy mini spin) acoplada em um microtubo coletor de 2,0mL. Centrifugue a 6000xg por 1 minuto. Descarte o tubo coletor juntamente com o líquido.
- 6- Coloque a coluna em um novo microtubo coletor de 2,0mL. Adicione na coluna 500  $\mu$ L do tampão AW1. Centrifugue por 1 minuto a 6000xg. Descarte o tubo coletor juntamente com o líquido.
- 7- Coloque a coluna em um novo microtubo coletor de 2,0mL. Adicione na coluna 500  $\mu$ L do tampão AW2. Centrifugue por 3 minutos a 20.000xg. Descarte o tubo coletor juntamente com o líquido.
- 8- Transfira a coluna para um novo microtubo do tipo eppendorf de 1,5mL e adicione 50  $\mu$ L do tampão AE para a eluição. Incube por 3 minutos a temperatura ambiente. Centrifugue por 1 minuto a 6000xg.
- 9- Repita o passo 8 duas vezes.
- 10- Faça alíquotas das amostras de DNA e congele a -20oC até o momento das análises moleculares.