

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

**OCORRÊNCIA CLÍNICA DA ERLICHIOSE MONOCÍTICA
EQUINA E PESQUISA DE FORMAS JOVENS DE
TREMATÓDEOS EM *HELEOBIA* SPP (MOLLUSCA:
HYDROBIIDAE), EM TERRAS BAIXAS DA ENCOSTA DO
SUDESTE, RS.**

Helen Silveira Coimbra

Pelotas, 2010

HELEN SILVEIRA COIMBRA

OCORRÊNCIA CLÍNICA DA ERLICHIOSE MONOCÍTICA EQUINA E PESQUISA DE FORMAS JOVENS DE TREMATÓDEOS EM *HELEOBIA* SPP (MOLLUSCA: HYDROBIIDAE), EM TERRAS BAIXAS DA ENCOSTA DO SUDESTE, RS.

TESE apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal De Pelotas, como requisito parcial à obtenção do Título de Doutor em Ciências. (área do conhecimento: Sanidade Animal)

Orientador: Dr. Mário Carlos Araújo Meireles

Co-Orientador: Dr. Luiz Filipe Damé Schuch

Pelotas, 2010.

Dados de catalogação na fonte:

(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

C679o Coimbra, Helen Silveira

Ocorrência clínica da erlichiose monocítica equina e pesquisa de formas jovens de trematódeos em *Heleobia* spp(Mollusca : Hydrobiidae), em terras baixas da encosta do Sudeste,RS / Helen Silveira Coimbra ; orientador Mário Carlos Araújo Meireles; co-orientador Luiz Filipe Damé Schuch. Pelotas,2010.- 48f. ; il.- Tese (Doutorado em Veterinária Preventiva) –Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Faculdade de Veterinária . Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2010.

1. Equinos 2.*Heleobia* spp 3.*Neorickettsia Risticii* 4.Diarréia I Meireles, Mário Carlos Araújo (orientador) II .Título.

CDD 636.1089

BANCA EXAMINADORA

Dr. Mário Carlos Araújo Meireles (Orientador) - UFPEL

Dra. Patrícia da Silva Nascente - UFPEL

Dra. Gertrud Müller - UFPEL

Dr. Paulo Bretanha Ribeiro - UFPEL

Dr. João Luiz Zani - UFPEL

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram para realização deste trabalho, em todas as formas seja no trabalho efetivo, quanto na motivação, incentivo e apoio. Dessa forma agradeço a Bolsista e amiga Carolina L. Gonçalves pela dedicação e apoio dados durante o período da Tese. Agradeço a participação nas saídas de campo da Carolina Sarmiento, Luciana de Souza, Carol, Ryan, Luana, Fernanda, Marta, Luciana Prestes e Schuch sendo fundamental para a realização deste trabalho.

Ao professor Mário C. A. Meireles pela oportunidade desta titulação e sua orientação.

Ao professor e amigo Luiz Filipe Schuch por mais uma vez acreditar em meu trabalho, e pela confiança sempre em mim depositada, obrigada.

À professora Gertrud Müller pela disponibilidade, apoio e carinho.

Às médicas veterinárias e amigas Renata Schramm e Silvia Ladeira pelo apoio e carinho a mim sempre dado.

À médica veterinária e amiga Marta Oyarzabal pela ajuda e principalmente pelas conversas de incentivo, apoio e amizade.

À médica veterinária Cristina Zambrano pelo apoio dado nas coletas a campo.

À fundação coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos meus pais, Cileda e Alcimar pelo amor, carinho e incentivo sempre demonstrado.

À Naila, aos meus irmãos e cunhados pelo carinho, compreensão e apoio.

Ao meu marido Rodrigo, pelo seu amor incondicional em todos os momentos, obrigada. Te amo.

Enfim, agradeço a Deus pela vida e pela maior realização de vida, o nascimento de minha filha.

RESUMO

COIMBRA, Helen Silveira. **Ocorrência clínica da ehrlichiose monocítica equina e pesquisa de formas jovens de trematódeos em *Heleobia* spp. (Mollusca: Hydrobiidae) em terras baixas da encosta do Sudeste, RS.** 2010. 48f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Orientador: Dr.: Mário Carlos Araújo Meireles

Co-Orientador: Dr.: Luiz Filipe Damé Schuch

A Ehrlichiose Monocítica Equina (EME) é uma doença infecciosa causada pela *Neorickettsia risticii*. Possui picos sazonais, ocorrendo nas épocas quentes do ano e em regiões alagadiças. A transmissão é via oral veiculada por vetores trematódeos. A enfermidade tem sido relatada e diagnosticada como causa de diarreia em equinos não estabulados na região Sul do Estado. Este trabalho teve como objetivo relatar casos de EME no Rio Grande do Sul e identificar os possíveis vetores da enfermidade. Durante o período de 2006 a 2009 foram realizadas coletas de vetores, dados clínicos e sangue de animais com quadro clínico de EME, em Rio Grande, Santa Vitória do Palmar, Arroio Grande e Palmares do Sul. As amostras de sangue foram submetidas a extração e pesquisa do DNA de *N. risticii* através da PCR e os vetores foram submetidos a identificação. No período de novembro de 2006 a novembro de 2009 coletou-se 16 amostras de sangue de animais. Um dos cavalos foi positivo na PCR para *N. risticii* com frequência de 6,6%. Foram coletados um total de 16864 caracóis do gênero *Heleobia* e um total de 357 insetos da Ordem Odonata classificados nas subordens *Zigoptera* e *Anisoptera*. Duas espécies de *Heleobia* foram identificadas, *H. piscium* e *H. robusta*. Três morfotipos distintos de cercárias foram encontrados nos caracóis, bem como dois morfotipos de metacercárias. A frequência de parasitismo de trematódeos nos caracóis chegou a 12,83% de 1671 caracóis dissecados. Apenas na subordem *Anisoptera* a fase de metacercária foi encontrada, com frequência de 5,3%. Através deste estudo reafirma-se que a região sul do Brasil possui características ecológicas que devem contribuir com o caráter endêmico e sazonal da enfermidade. Estudos são necessários para identificação das fases larvais de trematódeos encontradas, bem como para conhecer o hospedeiro definitivo, identificar o parasito adulto e a relação de seu ciclo de vida com a ocorrência da ehrlichiose monocítica equina.

Palavras-chave: diarreia em equinos, *Heleobia* spp., *Neorickettsia risticii*.

ABSTRACT

COIMBRA, Helen Silveira. **Clinical occurrence of the equine monocytic ehrlichiosis and research of trematodes stages in *Heleobia* spp. (Mollusca: Hydrobiidae) in low lands of the southeastern hillside, RS.** 2010. 48f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Orientador: Dr.: Mário Carlos Araújo Meireles

Co-Orientador: Dr.: Luiz Filipe Damé Schuch

The equine monocytic ehrlichiosis (EME) is an infectious diseases caused by the *Neorickettsia risticii*. It present seasonal peaks, occurring hot of the year at the time and in subject to flooding regions. The transmission is oral way propagated for trematodes vectors. The disease has been told and diagnosed as cause of diarrhea in equinos not surrounded in the South region of the State. This study have as objective to tell cases of EME in the Rio Grande do Sul as well as the possible vectors of the disease. During the period of 2006 the 2009 had been carried through collections of vectors, clinical data and blood of animals with clinical case, in Rio Grande, Santa Vitória do Palmar, Arroio Grande and Palmares do Sul. The blood samples had been submitted the extraction and search of the DNA of the *N. risticii* through the PCR, and the joined vectors had been submitted the identification. In the period of November of 2006 the November of 2009 collected 16 samples of blood of animals. One of the horses was positive in the PCR for *N. risticii* with frequency of 6.6%. A total of 16864 snails of the *Heleobia* sort and a total of 357 insects of the classified Odonata Order had been collected in suborder *Zigoptera* and *Anisoptera*. Two species of *Heleobia* were identified, *H. piscium* and *H. robusta*. Three distinct morphologic types of cercariae had been found in the snails, as well as two morphologic types of metacercariae. The frequency of parasitism of trematodes in the snails to reach 12.83% of 1671 dissected snails. Only by suborder *Anisoptera* metacercariae phase was found in a 5.3% frequency. Through this study it is reaffirmed that the south region of Brazil presents ecological characteristics that must contribute with the endemic and seasonal character of the disease.

Keywords: diarrhea of horses, *Heleobia* spp, *Neorickettsia risticii*.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

- Figura 1 Eletroforese em agarose indicando o produto do PCR de 529pb do DNA da *Neorickettsia risticii*. Na coluna 2 o cavalo positivo. Nas colunas 3, 4 e 5, o controle negativo, controle positivo e marcador de peso molecular de 100pb, respectivamente..... 25

ARTIGO 2

- Figura 1 . *Heleobia robusta* (esquerda) *Heleobia piscium* (direita) encontrados nas raízes de aguapés, canais de irrigação das propriedades de estudo..... 35
- Figura 2 Metacercárias encontradas no tegumento da subordem *Anisoptera*. (200x)..... 36
- Figura 3 Taxa de parasitismo em caracóis *Heleobia* spp. coletados em Arroio Grande no período de um ano..... 37
- Figura 4 Cercária morfotipo 1 encontrada em *Heleobia* spp. (40x)..... 38
- Figura 5 Metacercária morfotipo 1, encistada em meio externo. (40x)..... 38
- Figura 6 Cercária morfotipo 2 encontrada em *Heleobia* spp. (100x)..... 39
- Figura 7 Metacercária morfotipo 2, encontrada nos tecidos e interior da concha dos *Heleobia* spp. (200x)..... 40
- Figura 8 Cercária morfotipo 3 encontrada em *Heleobia* spp. (40x)..... 40

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1	Índices de morbidade e letalidade de EME acompanhados no período de 2006 a 2009 em quatro municípios localizados à encosta Sudeste do Rio Grande do Sul.....	25
----------	--	----

ARTIGO 2

Tabela 1	Taxa de parasitismo das fases de cercárias encontradas nos caracóis <i>Heleobia</i> spp. coletados no Rio Grande, Arroio Grande, Palmares do Sul, Santa Vitória do Palmar de 2006 a 2009.....	37
Tabela 2	Taxa de parasitismo das fases de metacercárias encontradas nos caracóis <i>Heleobia</i> spp. coletados em Arroio Grande, Rio Grande, Palmares do Sul, Santa Vitória do Palmar de 2006 a 2009.....	39

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	8
SUMÁRIO	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3 OBJETIVOS	17
4 ARTIGO 1 (segundo as normas da revista “Pesquisa Agropecuária Brasileira”).....	18
5 ARTIGO 2 (segundo as normas da revista “Arquivos do Instituto Biológico”).....	29
6 CONCLUSÕES	44
7 REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

A ehrlichiose monocítica equina (EME) é uma doença infecciosa que atinge equinos de todas as idades causando diarreia grave (Rikihisa, 1998). No Brasil foi identificada ao Sul do Estado no Rio Grande do Sul, em propriedades localizadas próximas a Lagoa Mirim e Mangueira, com primeiro diagnóstico no ano de 1998, realizado pelo grupo de pesquisa do Departamento de Veterinária Preventiva e Departamento de Patologia, Faculdade Veterinária, UFPEL (CURCIO et al., 1998; DUTRA et al., 2001).

Os casos de ehrlichiose monocítica equina evidenciados no Rio Grande do Sul ocorreram nos períodos mais quentes 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.

A enfermidade para o Rio Grande do Sul tem demonstrado ser importante nas criações de cavalos Crioulos. A mais de um século os gaúchos fizeram do crioulo o seu meio de transporte, companheiro de caça ou trabalho e de lazer. O Rio Grande do Sul tornou-se o berço da criação do cavalo crioulo e destaca-se pelo maior plantel crioulo do país, com 48.544 fêmeas e 24.359 machos registrados (ABCCC). A EME tem sido relatada e diagnosticada em cavalos Crioulos causando perdas com tratamentos e com a morte dos animais, sendo apontada como um fator limitante na criação em algumas regiões (COIMBRA et al., 2006).

O cavalo crioulo ganhou expansão a partir do Rio Grande do Sul conquistando um alto conceito entre criadores de todas as partes do país, principalmente devido a características raciais como rusticidade, habilidade nas lides de campo e mais recentemente nos esportes eqüestres como o Freio de Ouro. Com o crescimento da popularidade das competições específicas da raça o interesse por animais de provas aumentou entre os proprietários. Com esse interesse em competições, o transporte de animais de uma região para outra também aumenta e o deslocamento de cavalos para áreas endêmicas de EME deve ser considerado uma vez que os animais introduzidos nestas áreas são suscetíveis a infecções mais graves do que aqueles criados na região (ATWILL et al., 1992; DUTRA et al., 2001). No verão do ano de 2001 foi diagnosticado um surto de EME com morbidade de 26% e letalidade de 46,1% em uma propriedade criadora de crioulos localizada no município de Arroio Grande (COIMBRA, 2003).

Todos os eqüinos são suscetíveis à doença, que pode se apresentar de forma subclínica ou pelo desenvolvimento de diarréia aquosa profusa seguida de desidratação. A via oral é a principal forma de transmissão da *Neorickettsia risticii* envolvendo trematódeos aquáticos (WEN et al., 1996; RIKIHISA, 1998; BARLOUGH et al., 1998; PUSTERLA et al., 2000; KANTER et al., 2000; DUMLER et al., 2001). Os trematódeos apresentam um ciclo de vida que envolve um hospedeiro definitivo e um ou mais hospedeiros intermediários, o que estabelece um ciclo complexo para manutenção e transmissão da *N. risticii*.

No Rio Grande do Sul, município de Arroio Grande, em propriedade com casos confirmados de ehrlichiose monocítica equina, caracóis do gênero *Heleobia* foram encontrados abundantemente nas raízes de aguapés presentes nos cursos d'água, e identificadas às espécies *H. piscium*, *H. parchappei* e *H. davisii*. Cercárias do tipo *Parapleurolophocercous cercariae* como portadores da *N. risticii* foram identificadas nos caracóis da *H. piscium* (COIMBRA et al., 2005). Estas cercárias ocorrem no ciclo de vida de Digenea da superfamília Opisthorchioidea que se desenvolvem em rédias em moluscos aquáticos e se encistam em peixes ou anfíbios, sendo necessários três hospedeiros, dois intermediários e um definitivo para completar seu ciclo de vida. A fase adulta parasita o intestino, ductos biliares, vesícula biliar ou fígado de aves e mamíferos (SHELL, 1970; FRANSEN; CHRISTENSEN, 1984).

Estudos devem ser realizados para elucidar qual espécie de trematódeo e o hospedeiro definitivo que estão envolvidos no o ciclo evolutivo da *N. risticii*. Gibson et al. (2005), encontraram DNA da *N. risticii* em trematódeos identificados como *Acanthatrium oregonense* que parasitavam o intestino de morcegos (*Eptesicus fuscus*). Pusterla et al. (2003), relataram, que o baço e o intestino de morcegos foram positivos para o DNA da *N. risticii* por PCR sugerindo que os morcegos estavam infectados por *N. risticii*.

A compreensão da forma de transmissão da ehrlichiose monocítica equina, assim como o entendimento da biologia e ecologia de *N. risticii* e de seus reservatórios naturais podem permitir a introdução de métodos de controle eficazes nas áreas de risco.

Este estudo teve como objetivo relatar a ocorrência clínica de casos compatíveis com ehrlichiose monocítica equina no verão de 2006 a 2009, em propriedades localizadas nos municípios do Rio Grande, Arroio Grande, Palmares do Sul e Santa Vitória do Palmar, RS, Brasil, assim como identificar trematódeos, possíveis vetores de *N. risticii*, através da pesquisa em hospedeiros intermediários, caracóis do gênero *Heleobia* e insetos da ordem Odonata.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A ehrlichiose monocítica eqüina (EME) é uma doença infecciosa não contagiosa causada por um agente monocitotrópico, *Neorickettsia (Ehrlichia) risticii*, que apresenta como célula alvo os monócitos circulantes. O agente apresenta tropismo pelo trato intestinal, especialmente cólon maior e ceco, onde infectam macrófagos e células epiteliais na lâmina própria e submucosa do intestino produzindo diarreia (HOLLAND et al., 1985; CORDES et al., 1986; STEELE et al., 1986).

A enfermidade foi evidenciada em 1979, no Estado de Maryland, nos Estados Unidos, em região próxima ao Rio Potomac sendo conhecida também como a Febre do Cavalo de Potomac (Potomac Horse Fever) (RIKIHISA; PERRY, 1985).

A prevalência da EME nos Estados Unidos é bastante variável sendo detectada em vários estados americanos, existindo uma relação com localização geográfica e sazonalidade. Segundo Goetz et al. (1989), a soro-prevalência para *N. risticii* demonstrou tendência sazonal, com variação de 16% em junho a 62% em agosto em cavalos aparentemente saudáveis no Estado de Illinois. Em New York, prevalência acima de 75% foi encontrada nas cidades do leste daquele Estado americano, com fronteiras ou muito próximas ao Rio Hudson (ATWILL et al., 1992). Nos estados de Illinois, Minnesota e Ohio, as taxas de prevalência anuais foram de 27%, 17% e 16% respectivamente, com o maior pico em julho e agosto (GOETZ et al., 1989; OLCHOWY et al., 1990; ATWILL et al., 1992; ATWILL et al., 1994).

No Rio Grande do Sul, casos confirmados para EME foram encontrados nos municípios de Arroio Grande, Santa Vitória do Palmar e Rio Grande (COIMBRA et

al., 1999; COIMBRA, 2003). Em dezembro de 2001 e fevereiro de 2002 em Arroio Grande casos confirmados de EME foram identificados com morbidade de 26% e letalidade de 46,15% (COIMBRA, 2003).

A infecção por *N. risticii* pode produzir desde uma doença subclínica até uma infecção severa e fatal, o período de incubação é de aproximadamente uma a três semanas. Os sinais de febre (temperatura corpórea acima de 42°C), anorexia, leucopenia, diarreia aquosa profusa e desidratação podem manifestar-se nas primeiras 24 a 48 horas do curso clínico. A diarreia ocorre em 30% dos casos e pode apresentar-se de forma leve, transitória, inaparente ou persistente. Laminite, caracterizada por dificuldade de locomoção e dor digital é uma complicação que pode ser desenvolvida em 20 a 30% dos casos de infecções naturais (RIKIHISA et al., 1984; ZIEMER et al., 1987; DUTTA et al., 1988; LONG et al., 1995). Há indução de uma resposta de anticorpos específica em eqüinos hospedeiros naturais e experimentais, no entanto, a presença de anticorpos nem sempre determina uma imunidade protetora, uma vez que existem variações antigênicas entre cepas de *N. risticii*, o que acarreta também falhas no controle da EME através de vacinação (VEMUPALLI et al., 1995). Ainda assim animais que se recuperam da infecção podem tornar-se imunes a re-infecção por pelo menos 20 meses (PALMER et al., 1990).

Para o entendimento do modo de transmissão da EME estudos com vários vetores foram realizados, e atualmente as pesquisas sustentam que o modo de transmissão ocorre através da via oral, intermediada por trematódeos que se desenvolvem ou utilizam caracóis aquáticos como hospedeiros intermediários (BARLOUGH et al., 1998; RIKIHISA, 1998; KANTER et al., 2000; PUSTERLA et al., 2000). Pesquisas moleculares auxiliaram em parte ao direcionamento e entendimento quanto ao modo de transmissão da enfermidade, por revelarem uma relação filogenética entre *N. risticii* e *Neorickettsia helminthoeca*, *Neorickettsia (Ehrlichia) sennetsu* e o agente erliquial do trematódeo *Stellantchasmus falcatus* - agente SF - a partir da seqüência do gene 16S RNAr com homologia do DNA de 94,8%, 98,9% e 99,1%, respectivamente. Essas riquetsias citadas são todas de transmissão oral (RIKIHISA et al., 1991; WEN et al., 1996). Com base em estudos de reatividade antigênica cruzada entre o agente, aliado ao mecanismo de transmissão e características moleculares, foi sugerida a mudança da nomenclatura da *E. risticii* para *Neorickettsia risticii* (DUMLER et al., 2001).

Com o enfoque dos estudos de vetores da *N. risticii* em ambiente aquático Barlough et al. (1998), na região norte da Califórnia, USA, onde ocorreram casos de EME, estudaram caracóis da família Pleuroceridae do gênero *Juga* como possíveis vetores de trematódeos portadores de *N. risticii*. Os caracóis foram coletados das regiões de ocorrência de EME. Estágios de esporocistos e cercárias de um trematódeo foram encontrados. Os estágios do trematódeo foram coletados e testados por PCR para presença de DNA da *N. risticii*, com resultados compatíveis para o agente, tornando assim os trematódeos liberados pelo caracol *Juga* spp possíveis vetores da *N. risticii*.

Pusterla et al. (2000), reproduziram experimentalmente a EME em eqüinos inoculando fases de esporocistos e cercárias coletadas de caracóis da espécie *Juga yrekaensins*. Os caracóis foram coletados na cidade de Siskiyou, California, USA, em região de ocorrência de casos de EME. Dois cavalos foram inoculados via intravenosa com os trematódeos, no 15^o dia pós-inoculação desenvolveram sintomatologia compatível para a enfermidade. A partir do sangue desses animais, outros dois eqüinos foram inoculados e desenvolveram sinais compatíveis com EME. Achados de necropsia, assim como testes moleculares e sorológicos foram compatíveis com o esperado para *N. risticii*. Através destes estudos foi constatado que a infecção por *N. risticii* está associada ao ciclo biológico de um trematódeo que utiliza caracóis de água doce como hospedeiros intermediários, sendo essa a forma que o agente existe na natureza.

Neorickettsia risticii foi identificada em cercárias virguladas, *Xiphidiocercariae*, albergadas em caramujos do gênero *Elimia*, incluindo as espécies *E. livescens* (KANTER et al., 2000) e *E. virginica* (MOTT et al., 2002). Através do PCR, pode-se identificar o DNA de *N. risticii*, com uma taxa de positividade de 4 a 54%. Três grupos de trematódeos positivos foram inoculados em fêmeas de camundongos CF-1, que foram necropsiados e testados por PCR, com resultado positivo para *N. risticii* (KANTER et al., 2000). As cercárias deste tipo são características de trematódeos digenéticos que utilizam como segundo hospedeiro intermediário um inseto. O DNA de *N. risticii* foi encontrado nas fases de metacercárias presentes em insetos aquáticos, tanto em adultos como na fase larval, sugerindo que a riquetsia tenha sido transmitida durante os estágios de desenvolvimento do trematódeo (CHAE et al., 2000; MOTT et al., 2002).

No município de Arroio Grande, Rio Grande do Sul, em propriedade localizada próxima a Lagoa Mirim onde casos de EME foram confirmados, caracóis do gênero *Heleobia* foram identificados como positivos para *N. risticii*, dentro do gênero foram identificadas às espécies *H. piscium*, *H. parchappei* e *H. davisii*. As espécies de *H. piscium* albergavam cercárias do tipo *Parapleurolophocercous cercariae* como portadores de *N.risticii* (COIMBRA et al., 2005).

Para o diagnóstico da EME a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido uma ferramenta para a detecção de *N. risticii*. A PCR tem demonstrado muitas vantagens sobre o isolamento e sorologia para o diagnóstico. Segundo Mott et al. (1997), a PCR foi mais sensível que a cultura detectando a *N. risticii* a partir do primeiro dia pós-inoculação (d.p.i) até o dia 32 d.p.i., e em cavalos infectados naturalmente a técnica foi bastante específica, tendo detectado *N. risticii* em 81% das amostras de sangue com cultura positiva, sem nenhum resultado falso positivo.

A PCR demonstra ser conveniente para diagnóstico rápido e seguro, aliada a achados clínicos e patológicos da enfermidade. Pode identificar o agente a partir de amostras de sangue e de fezes dos animais doentes, bem como ser utilizada para o estudo de vetores envolvidos na transmissão da doença (BISWAS et al., 1991; MOTT et al., 1997).

Os achados *pos-mortem* mais claros são distendimento do cólon maior e ceco que se encontram repletos de conteúdo líquido. As alterações patológicas encontradas variam de ulcerações, hiperemia focal e congestão que estão localizadas no intestino grosso e em menor extensão no intestino delgado (CORDES et al., 1986). A ausência de lesão severa e infiltrado neutrocitário é importante para o diagnóstico diferencial de EME com outros agentes como, por exemplo, *Salmonella* spp. (RIKIHISA et al., 1984; RIKIHISA; PERRY, 1985).

No Brasil os diagnósticos da EME foram realizados na região Sul do Rio Grande do Sul, baseados em achados clínicos, dados epidemiológicos, achados de necropsia e confirmação com PCR. Em outros estados do país não há registro de EME.

3 OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo relatar a ocorrência clínica de casos compatíveis com ehrlichiose monocítica equina no período de 2006 a 2009, em propriedades localizadas nos municípios do Rio Grande, Arroio Grande, Palmares do Sul e Santa Vitória do Palmar, RS, Brasil, assim como identificar trematódeos, possíveis vetores de *N. risticii*, através pesquisa em hospedeiros intermediários, caracóis do gênero *Heleobia* spp. e insetos da Ordem Odonata.

4 ARTIGO 1

(segundo as normas da Revistas Pesquisa Agropecuária Brasileira).

Ehrlichiose monocítica equina em terras baixas da encosta do sudeste, RS, Brasil e relato de hospedeiros intermediários, parasitados com trematódeos, possíveis vetores.

Helen Silveira Coimbra⁽¹⁾, Luiz Filipe Damé Schuch⁽²⁾, Cristina Zambrano⁽³⁾, Marta Elaine Bastos Oyarzabal⁽⁴⁾, Luciana Souza Prestes⁽¹⁾, Carolina Lambrecht Gonçalves⁽²⁾, Clairton

Marcolongo-Pereira⁽¹⁾ e Mário Carlos Araújo Meireles⁽²⁾.

⁽¹⁾Programa Pós-Graduação em Veterinária – Faculdade de Veterinária – Universidade Federal de Pelotas (UFPel), campus universitário s/nº, CEP: 96010-900, Capão do Leão, RS.

Email: coimbrahs@gmail.com, lprestes.mv@gmail.com, clairton.marcolongo@terra.com.br

⁽²⁾Departamento de Veterinária Preventiva – Faculdade Veterinária – UFPel, campus universitário s/nº, CEP: 00000-000, Capão do Leão, RS. Email: bitoxu@ig.com.br, carolina_lamg@yahoo.com.br e meireles@ufpel.tche.br.

⁽³⁾Médica Veterinária autônoma, Rua: Antônio do Anjos 146, apt 402, centro, CEP 96020-700, Pelotas, RS. Email: czambrano@bol.com.br

⁽⁴⁾Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, campus do vale, av.: Bento Gonçalves, n. 9090, CEP: 91540-000. Porto Alegre, RS.
Email: marta_oyarzabal@yahoo.com.br

Resumo - A ehrlichiose monocítica equina (EME) é relatada como causa de diarreia em equinos, em propriedades próximas a lagoas, na encosta do sudeste gaúcho. A forma de transmissão é a via oral, onde a *Neorickettsia risticii* é veiculada por trematódeos. A enfermidade na região é descrita como sazonal e conhecida como “Curso”. O objetivo deste trabalho foi acompanhar casos clínicos de EME e relatar a presença de hospedeiros intermediários, caracóis *Heleobia* spp. e insetos da ordem Odonata, parasitados com trematódeos. Foram acompanhadas quatro localidades, Rio Grande, Arroio Grande, Santa Vitória do Palmar e Palmares do Sul. A morbidade encontrada variou de 5% a 18,18% e letalidade de 18,2 e 42,85%. Caracóis *Heleobia* spp foram encontrados parasitados com trematódeos numa frequência de 2,3 a 19,35%, conforme época da coleta, e insetos da subordem *Anisoptera* foi positivo para a fase de metacercária em até 11,11%. Este é o primeiro relato de casos compatíveis com EME em Palmares do Sul. Os casos que pode ocorrer de forma esporádica e ou de surto, quando da introdução de cavalos em área endêmica para presença do vetor.

Termos de indexação: *Neorickettsia risticii*, diarreia, equinos, ehrlichiose equina

Equine monocytic ehrlichiosis in law lands of the southeastern hillside, RS, Brazil and to tell the intermediate hosts harboring trematodes, possible vectors.

Abstract - Equine monocytic ehrlichiosis is causative diarrhea in horse on South of Rio Grande do Sul State, around the lagoons the southeastern hillside gaúcho. The transmission is the oral way. *N. risticii* is propagated by trematodes. The disease in the region is known as

“Course”, that it’s described as seasonal. The objective of this study was to follow of EME and to tell the presence of intermediate hosts, *Heleobia* spp. and insects of the Odonata order, parasite with trematodes. Four city, Rio Grande, Arroio Grande, Santa Vitoria do Palmar and Palmares do Sul had been folloied. The reached morbidity varied 5% and 18,18%, and lethality, 10 to 42.85%. The *Heleobia* spp. snails was positive by trematodes in a 2,3% frequency 19.35% as time of the collection, and insets *Anisoptera* suborder was positive by metacercariae stages about 11,11%. This is the first story of compatible cases with EME in Palmares do Sul, the cases can occur of sporadical form and or of outbreak, when of the introduction of horses in endemic area for presence vectors.

Index terms: *Neorickettsia risticii*, horse, diarrhea, equine ehrlichiosis

Introdução

A ehrlichiose monocítica equina (EME), tem como agente etiológico *Neorickettsia risticii* e foi diagnosticada primeiramente nos Estados Unidos, onde está amplamente distribuída com prevalência que varia conforme a localização geográfica, relevo e sazonalidade, com a ocorrência dos casos em regiões alagadiças, próximas a rios e lagos, nos meses mais quentes do ano (Atwill et al., 1994, Rikihisa, 1998).

A enfermidade no Rio Grande do Sul, Brasil, é relatada como a principal causa de diarreia em equinos não estabulados, em propriedades localizadas a orla da Lagoa Mirim, e já foi relatada e diagnosticada em cavalos Crioulos causando prejuízos com tratamentos e com a morte dos animais, sendo apontada como um fator limitante na criação em algumas regiões. (Dutra et al., 2001, Coimbra et al., 2003; Coimbra et al., 2006a). Os casos de EME evidenciados no Rio Grande do Sul ocorreram nos períodos mais quentes do ano, com a concentração dos casos nos meses de novembro a janeiro (Dutra et al., 2001; Coimbra, et al., 2006). As propriedades apresentavam características geográficas semelhantes sendo

compostas de campos e áreas alagadiças. Essas evidências sugerem que a EME apresente no Sul do Brasil um caráter endêmico e sazonal como é descrita nos Estados Unidos.

A principal forma de transmissão do agente ocorre por via oral veiculada por trematódeos que parasitam caracóis e insetos presentes em ambientes aquáticos (Barlough et al., 1998; Chae et al., 2000; Pusterla et al., 2000; Coimbra et al., 2005). Caracóis do gênero *Heleobia* foram identificados como portadores de trematódeos infectados com o agente, em propriedades endêmicas da EME no Rio Grande do Sul (Coimbra, 2003). A enfermidade na região é conhecida como “Curso” e é sazonal, ocorrendo do final da primavera até o outono em animais acima de um ano de idade (Dutra et al., 2001). Clinicamente, os animais podem demonstrar desde uma doença subclínica até uma infecção hiperaguda, severa e fatal. O período de incubação é de uma a três semanas. Entre os sinais clínicos mais comuns estão febre, anorexia, leucopenia, diarreia e desidratação (Rikihisu, 1998).

Este estudo teve como objetivo relatar a ocorrência clínica de casos compatíveis com EME no período de 2006 a 2009, em propriedades localizadas próximas à Lagoa mirim e a Lagoa dos Patos, RS, assim como relatar a presença de vetores da enfermidade

Material e Métodos

Os casos clínicos de EME acompanhados foram de propriedades localizadas em terras baixas da encosta sudeste do Estado do RS, próximas a Lagoa Mirim, compreendendo os municípios Arroio Grande, Rio Grande e Santa Vitória do Palmar, e próxima a Lagoa dos Patos, município de Palmares do Sul.

As propriedades de estudo se caracterizam por estarem localizadas em região de baixa altitude e com predominância de campos alagadiços. Nestas propriedades são criados cavalos da raça Crioula que tem por finalidade o uso nas lides de campo, participação em feiras, exposições e em provas hípicas, sendo utilizado também, para a manutenção de garanhões, o que propicia entrada de animais de outras regiões nas estações de monta.

A propriedade de Arroio Grande apresentava 132 equinos da raça crioula, nascidos na propriedade e cavalos que foram introduzidos temporariamente, para manejo reprodutivo ou doma. A propriedade em Rio Grande possuía uma manada de 90 cavalos crioulos, sendo parte dos animais oriundos da região da campanha. No município de Palmares do Sul, duas propriedades totalizavam de 60 cavalos crioulos. Em Santa Vitória do Palmar uma propriedade apresentava 11 cavalos.

Para a pesquisa do agente foi coletado sangue com EDTA a 10% dos cavalos que apresentavam quadro de diarreia e realizado um Nested PCR, segundo Barlough et al. (1997).

Para pesquisa dos vetores foram coletados caracóis do gênero *Heleobia* das raízes de aguapés dos canais de irrigação que cortam as propriedades e insetos da ordem Odonata para a observação da presença de fases de desenvolvimento de trematódeos.

Resultados e discussão

Durante o período de 2006 a 2009 foi observado que os casos de diarreia ocorreram nos meses mais quentes do ano. Essa característica estacional esta associada à enfermidade e já foi observada na região (Dutra et al., 2001; Coimbra et al., 2003).

Na propriedade de Arroio Grande durante o período de verão de 2006 a 2009, foram observados onze cavalos com quadro compatível com a ehrlichiose monocítica equina indicando uma morbidade de 8,33%. Uma fêmea que foi introduzida na propriedade para cobertura cerca de 60 dias antes, desenvolveu diarreia de forma aguda, profusa que evoluiu para laminite, apresentando marcha rígida, dor e edema digital. De acordo com o descrito por Long et al. (1995) e por Rikihisa (1998), a diarreia é a apresentação clínica mais evidente e comum da enfermidade e ocorre em 30% das infecções, e a laminite é uma das complicações da enfermidade. Dois casos agudos e mais graves de diarreia culminaram em dois óbitos marcando uma letalidade de 18,18%. Nesta propriedade, os cavalos que apresentavam alteração de comportamento como afastamento do grupo, andar de cabeça caída e paravam de

pastar eram tratados com antibiótico (oxitetraciclina) mesmo sem demonstrarem sinais de diarreia. Esta atitude pode ter feito com que nem todos os animais infectados desenvolvessem diarreia. O tratamento recomendado é oxitetraciclina 6,6 mg/kg/pv injetável administrada duas vezes ao dia, os animais se recuperam em cinco a sete dias. Nos casos em que a diarreia já está presente, o tratamento deve ser mais prolongado e pode ser menos eficiente (Rikihisa, 1998).

No município do Rio Grande, a enfermidade foi observada com uma morbidade de 7,77% nos cavalos. Nesta propriedade ocorreu a introdução de 90 cavalos no período de dezembro de 2007, onde sete cavalos desenvolveram quadro de diarreia aguda com evolução de 3 a 5 dias, após 60 dias da estada. Os animais eram oriundos da região da campanha, sudoeste do estado, RS, com características de campos altos e dobrados, sem relato da ocorrência de EME. Ocorreram três óbitos, marcando uma letalidade de 42,85%. Todos os animais foram tratados com oxitetraciclina com recuperação de 57,14%. Aborto foi observado em uma égua cerca de 20 dias após ter apresentado quadro de diarreia. Long et al. (1995) e Coffman et al. (2008), descreveram casos de aborto em fêmeas que desenvolveram sinais clínicos da enfermidade. Em um dos animais dessa propriedade foi realizada necropsia, onde macroscopicamente foram observadas, presença de conteúdo líquido no ceco e cólon, leve aumento do fígado e baço com petéquias. Microscopicamente, na lâmina própria e submucosa do ceco e cólon maior havia infiltrado difuso de células mononucleares e polimorfonucleares, dilatação de vasos linfáticos e edema. Nos demais órgãos não foram observadas alterações. As características anatomopatológicas encontradas foram compatíveis com o descrito para enfermidade (Cordes et al., 1986; Coimbra et al., 2006).

No município de Palmares do Sul, em duas propriedades com total de 60 cavalos, foi relatada a ocorrência de três casos de diarreia em cavalos, verificados no período de verão de 2008. Os animais desenvolveram diarreia de forma aguda e evolução de até cinco dias,

resultando em uma morte, atingindo uma morbidade de 5% e letalidade de 33,33%. Os casos foram caracterizados pelos proprietários como “curso negro” devido ao desenvolvimento de uma diarreia preta. O tratamento preconizado pelos tratadores era retirar os animais do campo com “grama boiadeira”, os animais eram alojados num potreiro e recebiam água do poço, dessa forma muitos animais demonstravam melhora dos sinais de diarreia. A EME é aparentemente dose dependente, ou seja, para estabelecer a infecção e produzir alterações patológicas há necessidade da presença de altas dosagens do agente, dessa forma a retirada dos cavalos das áreas alagadiças (grama boiadeira) pode ter tido sucesso em alguns casos porque diminuiu a exposição do animal com o ambiente, que provavelmente mantém o vetor da riquétisa (Rikihisa, 1998; Dutra et al., 2001).

Em Santa Vitória do Palmar foram acompanhados casos de diarreia em cavalos de dezembro de 2008 a março de 2009. Uma propriedade apresentava uma manada de onze cavalos, onde ocorreram dois casos de diarreia, marcando uma morbidade de 18,18%. Nesta região foram relatados ainda mais quatro casos de diarreia grave com duas mortes em pelo menos cinco propriedades, somando os dois primeiros casos, a letalidade chegou a 33,33% na região. Alguns cavalos foram tratados com oxitetraciclina e outros com sulfas nas dosagens comerciais, segundo Rikihisa (1998) como alternativa a oxitetraciclina o uso de trimetropim mais sulfatiazida (5mg/kg/pv – baseado na fração do trimetropim) também podem ser efetivos no tratamento da diarreia.

A alta letalidade encontrada neste estudo (tabela 1) se assemelha ao já constatado em estudos anteriores na região (Dutra et al., 2001; Coimbra et al., 2006) em que a incidência atingiu até 46% dos animais oriundos de áreas livres introduzidos em ambiente endêmico e segundo Rikihisa, (1998) a letalidade pode variar de 5 a 30% em cavalos expostos naturalmente. Todas as propriedades apresentam características geográficas semelhantes às de ocorrência da enfermidade, de acordo com Dutra et al., 2001 e Coimbra, 2003, com campos

alagadiços e com canais de irrigação das culturas de arroz que cortam as propriedades tendo os animais acesso a esses ambientes.

Tabela. 1: Índices de morbidade e letalidade de EME acompanhados no período de 2006 a 2009 em quatro municípios localizados à encosta Sudeste do Rio Grande do Sul.

Propriedades	N animais	Morbidade %	Letalidade %
Arroio Grande	132	8,33	18,18
Rio Grande	90	7,77	42,85
Palmares do Sul	60	5	33,33
Santa Vitória do Palmar	11	18,18	33,33*

*valor sobre os casos ocorridos em cinco propriedades

Foram coletadas amostras de sangue para realização da Nested PCR 16 cavalos com diarreia, e destes um equino foi positivo, 6,25% (1/16), com um produto da PCR de 529pb, considerado compatível com *N. risticii* (figura 1). Alguns destes cavalos haviam sido tratados com oxitetraciclina e outros foram coletados em fase de recuperação dos sinais de diarreia, o que pode ter interferido para a baixa frequência de positivos na PCR. O animal positivo era uma égua oriunda do município de Santa Vitória do Palmar, e o sangue foi coletado antes da administração do tratamento.

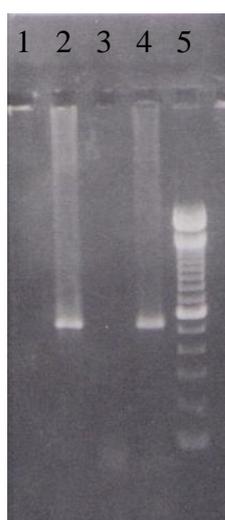


Figura 1: Eletroforese em agarose indicando o produto do PCR de 529pb do DNA da *N. risticii*. Na coluna 2 o cavalo positivo. Nas colunas 3, 4 e 5, o controle negativo, controle positivo e marcador de peso molecular de 100pb respectivamente.

Nas propriedades do estudo foram encontrados caracóis do gênero *Heleobia* com maior densidade (92,21%) nas raízes de aguapés. Duas espécies foram identificadas na região *H. robusta* e *H. piscium*. A presença de trematódeos (fases de rédias, cercárias e metacercárias) nos caracóis foi verificada com frequência que variou de 5 a 19,35%, nos meses mais quentes a frequência de caracóis infectados foi maior. Em Arroio Grande Coimbra (2003) e Coimbra et al. (2005) já haviam constatado frequência de 16,66% de caracóis infectados por trematódeos. Insetos da ordem Odonata coletados foram classificados em duas subordens: *Zigoptera* e *Anisoptera*. A frequência de metacercária encontradas na subordem *Anisoptera* foi de 8,33 e 11,11%. Fases de metacercárias em insetos aquáticos da Ordem Odonata, Trichoptera, Plecoptera e Ephemeroptera foram demonstradas estarem envolvidas na transmissão da ehrlichiose monocítica equina (Chae et al., 2000).

Este é o primeiro relato de casos compatíveis com ehrlichiose monocítica equina na região norte da Lagoa dos Patos e este estudo demonstra que a enfermidade pode ocorrer de forma esporádica, durante os meses mais quentes do ano, ou na forma de surto quando animais são introduzidos em ambientes endêmicos para a presença do vetor.

Referências

- 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, p. 143-147, 1994.
- 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.

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.

COFFMAN, E.A. ABD-ELDAIM, M.; CRAIG, L. E. Abortion in a horse following *Neorickettsia risticii* infection. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, p. 827-830, 2008.

COIMBRA, H.S. **Erlíquiose monocítica equina no Rio Grande do Sul: Aspectos clínicos, anátomo-patológicos e epidemiológicos**. 2003. 49p. Tese (Mestrado em Veterinária) - Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, RS.

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

COIMBRA, H.S.; FERNANDES, C.; SOARES, M.P. MEIRELES, M.C.A.; RADAMES, R.; SCHUCH, L.F.D. Erlíquiose 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.; MEIRELES, M.C.A.; ZAMBRANO, C.; SCHUCH, L.F.D. Ehrlichiose monocítica equina (EME) como causa de diarreia em equinos no Rio Grande do Sul. In: 14º Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & 2º Simpósio Latino-americano de Rickettsioses, 2006, Ribeirão Preto, SP. **Anais do...** p. 386, 2006.

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

DUTRA, F.; SCHUCH, L.F.D.; DELUCCHI, E.; CURCIO, B.R.; COIMBRA, H.S.; RAFFI, M.B.; DELLAGOSTIN, 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.

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

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, 2000.

RIKIHISA, Y. Rickettsial diseases. In: Reed S. M. & Bayly W. M. (1 ed). **Equine Internal Medicine**. Philadelphia, USA: W.B. Saunders Company, 1998, p.112-123.

5 ARTIGO 2

(segundo as normas da Revista Arquivos do Instituto Biológico).

PESQUISA DE TREMATÓDEOS DIGENÉTICOS EM *HELEOBIA* SPP.

(MOLUSCA: HYDROBIIDAE) EM ÁREA DE OCORRÊNCIA DA EHRlichiose

MONOCÍTICA EQUINA, NO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.

H.S. Coimbra*, L.F.D. Schuch¹, G. Müller², C.L. Gonçalves¹, C. Zambrano³, M.E.B.

Oyarzabal⁴, L.S. Prestes,¹ M.C.A. Meireles¹.

*Universidade Federal de Pelotas, Faculdade Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, campus universitário s/nº, CEP: 96010-900, Capão do Leão, RS, Brasil.

Email: coimbrahs@gmail.com

RESUMO

A ehrlichiose monocítica equina na região Sul do Rio Grande do Sul tem demonstrado ser importante nas criações de cavalos Crioulos, tem sido relatada e diagnosticada como causa de diarreia em equinos não estabulados e como causa prejuízos com tratamentos e morte de animais, sendo apontada como um fator limitante na criação em algumas regiões. O modo de transmissão pela via oral, intermediada por trematódeos em ambientes aquáticos, tem sido

¹ Universidade Federal de Pelotas/Faculdade de Veterinária/Departamento de Veterinária Preventiva

² Universidade Federal de Pelotas/Instituto de Biologia/Departamento de Microbiologia e Parasitologia

³ Médica Veterinária Autônoma

⁴ Universidade Federal do Rio Grande do Sul/Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

sustentada. Caracóis dulciaquícolos estão envolvidos como hospedeiros intermediários de trematódeos albergadores de *Neorickettsia risticii*. Um total de 16.846 caracóis *Heleobia* foram coletados nos municípios de Arroio Grande, Rio Grande, Palmares do Sul e Santa Vitória do Palmar, 92,2% dos caracóis foram encontrados nas raízes de aguapés (*Eichornea* spp.) A frequência de trematódeos presentes nos caracóis variou de 2,3% a 12,8% nas propriedades coletadas. Foram encontrados três tipos de cercárias, morfotipo 1, morfotipo 2 e morfotipo 3 e dois morfotipos de metacercárias nos caracóis. Um total de 357 insetos da ordem Odonata foram coletados, fases de metacercárias foram encontradas no tegumento da subordem *Anisoptera* com frequência de 1,66%. Mais estudos são necessários para identificação das fases larvais encontradas, bem como para conhecer o hospedeiro definitivo, identificar o parasito adulto e a relação de seu ciclo de vida com a ocorrência da ehrlichiose monocítica equina.

PALAVRAS-CHAVE: Trematódeos, *Heleobia* spp., *Neorickettsia risticii*.

RESEARCH OF TREMATODES DIGENETICS FROM *HELEOBIA* SPP (MOLLUSCA: HYDROBIIDAE) IN AREA OF OCCURRENCE OF EQUINE MONOCYTIC EHRLICHIOSIS, IN RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL.

ABSTRAT

The ehrlichiose monocítica equina in the region South of the Rio Grande Do Sul has demonstrated to be important in the creations of Crioulo horses, it has been reported and diagnosed as cause of diarrhea in equinos not surround and as cause of losses with treatments and death of the animals, being pointed as a limited factor in the range breeding in some regions. The way of transmission for the oral way, intermediated for trematodes in aquatic environments, has been supported. Freshwater snails are involved as intermediate hosts of trematodes and harbor of the *Neorickettsia risticii*. A total of 16.846 *Heleobia* snails

had been collected, in the cities of Arroio Grande, Rio Grande, Palmares do Sul and Santa Vitoria do Palmar, 92.2% of the snails had been found in the roots of aquatic plants (*Eichornea* spp.). The frequency of trematodes present in the snails varied of 2.3% - 12.8% in the collected regions. Three types of cercariae were found, morphology type 1, morphology type 2 and morphology type 3, And two morphologic type of metacercárias of the snails. A total of 357 insects of the Odonata order were collected, stages of metacercariae had been found in the tissues of suborder Anisoptera with 1.66% frequency. More studies are necessary for identification of the joined larval phases, as well as knowing the host definitive and identifying to the adult parasite and the relation of its cycle of life with the occurrence of equine monocytic ehrlichiosis.

KEY WORDS: Trematodes, *Heleobia* spp., *Neorickettsia risticii*.

INTRODUÇÃO

A ehrlichiose monocítica equina (EME) é uma doença infecciosa não contagiosa causada pela *Neorickettsia risticii*. A diarreia é a principal forma clínica e ocorre em 30% dos casos (RIKIHISA, 1998). A enfermidade para o Rio Grande do Sul tem demonstrado ser importante nas criações de cavalos Crioulos, devido a prejuízos com tratamentos e morte de animais e foi apontada como um fator limitante na criação em algumas regiões (DUTRA *et al.*, 2001; COIMBRA, 2003). Desde 1999, nas épocas de verão em propriedades localizadas próximas a lagoas de água doce a EME foi diagnosticada (DUTRA *et al.*, 2001; COIMBRA, 2003; COIMBRA, 2010).

Para o entendimento do modo de transmissão da EME estudos com vários vetores foram realizados, e atualmente o modo de transmissão pela via oral, intermediada por trematódeos digenéticos em ambientes aquáticos, tem sido sustentada (BARLOUGH *et al.*,

1998; RIKIHISA, 1998; KANTER *et al.*, 2000; PUSTERLA *et al.*, 2000; COIMBRA *et al.*, 2005).

Os trematódeos digenéticos tem um ciclo de vida complexo envolvendo dois a quatro hospedeiros e com fases de reprodução sexual e assexual. Em todos os ciclos conhecidos, o primeiro hospedeiro é um molusco, geralmente um caracol. Com poucas exceções, o hospedeiro definitivo, que contem o adulto, é um animal vertebrado (THATCHER, 1993).

No município de Arroio Grande, RS, em propriedade localizada próxima a Lagoa Mirim onde casos de EME foram confirmados, caracóis do gênero *Heleobia* foram identificados como positivos para *N. risticii*. Três espécies foram identificadas nesta região, *H. piscium*, *H. parchappei* e *H. davisi* (COIMBRA *et al.*, 2005).

Os caracóis *Heleobia* spp. pertencem ao filo Mollusca, classe Gastropoda, subclasse Prosobranchia e família Hydrobiidae estão presentes em várias regiões da planície costeira, do Rio Grande do Sul (SILVA, 1993; LANZER, 2001; SILVA; VEITENHEIMER-MENDES, 2004). São encontrados abundantemente nas raízes de macrófitas aquáticas que estão presentes em arroios, rios, lagoas, canais de irrigação e de drenagem nas propriedades.

De acordo FLORES; BRUGNI, (2006) caracóis do gênero *Heleobia* estão envolvidos como hospedeiros intermediários de trematódeos digenéticos, a espécie *Catatropis hatcheri* n. sp. (Digenea: Notocodylidae) foi encontrado parasitando *Heleobia hatchery*. COIMBRA *et al.*, (2005) encontraram cercárias do tipo *Parapleurolophocercous cercariae* parasitando caracóis *H. piscium*, infectadas com o DNA da *N.risticii*.

BARLOUGH *et al.* (1998), estudaram caracóis da família Pleuroceridae do gênero *Juga* como vetores de trematódeos portadores de *N. risticii*. PUSTERLA *et al.* (2000), reproduziram experimentalmente a EME em equinos inoculando fases de esporocistos e cercárias coletadas de caracóis da espécie *Juga yrekaensins*. KANTER *et al.* (2000) e MOTT *et al.* (2002), identificaram *N. risticii* em cercárias virguladas, *Xiphidiocercariae*, albergadas em caramujos

do gênero *Elimia*, incluindo as espécies *E. livescens* e *E. virginica*. As cercárias deste tipo são características de trematódeos digenéticos que utilizam como segundo hospedeiro intermediário um inseto.

Em pesquisa com insetos aquáticos CHAE, *et al.* (2000) e MOTT *et al.* (2002), encontraram as fases de metacercárias infectadas com *N. risticii*. Sugerindo que a riquetsia tenha sido transmitida durante os estágios de desenvolvimento do trematódeo.

PUSTERLA *et al.* (2003), encontraram trematódeos *Lecithodendrium* sp. e *Acanthatrium* sp. parasitando baço e intestino de morcegos e andorinhas em área enzoótica par a EME no norte da Califórnia. Tanto as andorinhas quanto os morcegos parasitados foram positivos para o DNA de *N. risticii* por PCR, sugerindo que a infecção por *N. risticii* ocorreu veiculada pelo trematódeo. GIBSON *et al.* (2005), encontraram DNA de *N. risticii* em trematódeos da espécie *Acanthatrium oregonense* que parasitavam o intestino de morcegos (*Eptesicus fuscus*) em região endêmica no estado da Pensilvânia, USA.

Este trabalho teve como objetivo identificar os trematódeos possíveis vetores de *N. risticii*, através da pesquisa em hospedeiros intermediários, caracóis do gênero *Heleobia* e insetos.

MATERIAL E MÉTODOS

Durante o período de 2006 a 2009 foram realizadas coletas de insetos (libélulas) e caracóis do gênero *Heleobia* como possíveis hospedeiros intermediários de trematódeos. As coletas foram realizadas em terras baixas da encosta sudeste do Rio Grande do Sul, nos municípios, Arroio Grande, Rio Grande, Santa Vitória do Palmar e Palmares do Sul, totalizando 16 coletas.

Em Arroio Grande, foram realizadas quatro coletas caracóis em duas localidades denominadas como propriedade 1 e propriedade 2. Em cada propriedade foram estabelecidos três pontos de coletas de 3 metros lineares. Diferentes substratos de cada ponto foram

coletados, plantas aquáticas (aguapé – *Eichornea* spp. e erva-de-bicho - *Polygonum* spp.) e sedimento presente nos canais de irrigação e no arroio Parapó. A amostragem das raízes das plantas (substratos) foi realizada utilizando uma peneira de 22cm de diâmetro por 9,5cm de profundidade. O sedimento de cada ponto foi coletado em até $\frac{3}{4}$ de balde de 5 litros de capacidade. Para retirada dos caracóis, as raízes e o sedimento foram lavados vigorosamente em balde com água do local e passados em peneira, sendo os caracóis retirados manualmente e acondicionados em recipientes plásticos com água do local. Após foram contados e separados em placas de petri contendo água destilada para observação e recuperação de cercárias e metacercárias. Alguns caracóis foram dissecados para verificar a frequência de parasitismo pelos trematódeos. As cercárias e metacercárias oriundas dos caracóis foram coletadas em água destilada e mantidas sob 4°C.

A partir de novembro de 2007 a março de 2009 incluiu-se na pesquisa de vetores insetos (libélulas). Os insetos foram capturados com uso de puçá e mantidos em recipiente com álcool 70% e após dissecados para verificar a presença de metacercárias em seu tegumento. Os insetos capturados foram enviados para identificação e classificação ao departamento de Microbiologia e Parasitologia, do Instituto de Biologia da UFPEL, os caracóis foram enviados para o Laboratório de Malacologia do departamento de Zoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para identificação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas quatro coletas realizadas no período de um ano em Arroio Grande, nas duas propriedades foram coletados 7630 caracóis *Heleobia* spp. e a maior densidade dos gastrópodes foi observada nas raízes de aguapés onde 92,2% (7037) dos caracóis foram encontrados, no sedimento 6,2% (477) e 1,5% (116) nas raízes de erva-de-bicho.

Em todos os substratos coletados foram identificadas espécies de *H. robusta* (SILVA; VEITENHEIMER-MENDES comunicação pessoal) e *H. piscium* (ORBIGNY, 1935) (Figura 1)

formas jovens e adultas. A espécie *H. piscium* foi encontrada nas duas propriedades enquanto *H. robusta* foi encontrada somente na propriedade 1. Fatores bióticos e abióticos como a salinidade, temperatura da água presença de substrato, podem interferir tanto na presença quanto na densidade populacional de determinadas espécies de *Heleobia* (FRANCESCO; ISLA, 2004).

Dentre os sete gêneros de Hydrobiidae representados no continente sul-americano, *Heleobia* é o que representa maior diversidade e distribuição com 71 espécies (HERSHELER; THOMPSON, 1992). No município de Arroio Grande foram identificados *H. piscium*, *H. parchapei* e *H. davisii* em raízes de aguapés por COIMBRA *et al.*, (2005).



Figura 1: *Heleobia robusta* (esquerda) *Heleobia piscium* (direita) encontrados nas raízes de aguapés, canais de irrigação das propriedades de estudo.

No período de verão foram verificadas as maiores quantidades de cercárias nos caracóis com uma frequência de 19,35%, na propriedade 1. Na propriedade 2 não foram encontrados caracóis nos canais de irrigação, pois os canais tinham sido limpos com a retirada de toda a vegetação. A frequência de trematódeos nos caracóis coletados na época de outono foi de 10,25% (4/39) na propriedade 1 e de 11,11% (2/18) na propriedade 2. Nas coletas do mês de agosto (inverno) a frequência de trematódeos nos caracóis foi 5% na propriedade 1, e na propriedade 2 foi 0%, nenhum trematódeo encontrado. Na primavera a frequência foi de

17,33 na propriedade 1, e na propriedades devido a falha na obtenção de dados, não foi possível apresentar os resultados (figura 2).

A partir de novembro de 2007 a março de 2009 foram coletados um total de 9216 caracóis *Heleobia* e um total de 357 insetos da ordem Odonata, classificados nas subordens *Anisoptera* (320) e *Zigoptera* (37). Nos insetos dissecados, foi verificada a fase de metacercária somente na subordem *Anisoptera*, com frequência de 5,3% (17/320). Nos insetos a metacercária pode apresentar diferentes estágios de maturidade (BODDEKE, 1960), isso pode ser observado nas diferentes formas que foram encontradas (Figura 3a, b e c). Libélulas da subordem *Anisoptera* foram citadas como segundo hospedeiro intermediário do *Prosthogonimus ovatus*, um trematódeo digenético parasito de aves, e metacercárias foram encontradas em diferentes fases de desenvolvimento no tegumento do inseto (BODDEKE, 1960). Esta espécie *Prosthogonimus ovatus* foi encontrada como parasita de três espécies de aves aquáticas na região Sul do Brasil (MONTEIRO *et al.*, 2007) e como parasita de passeriforme na região Sul do Rio Grande do Sul, Brasil (MASCARENHAS, 2008).

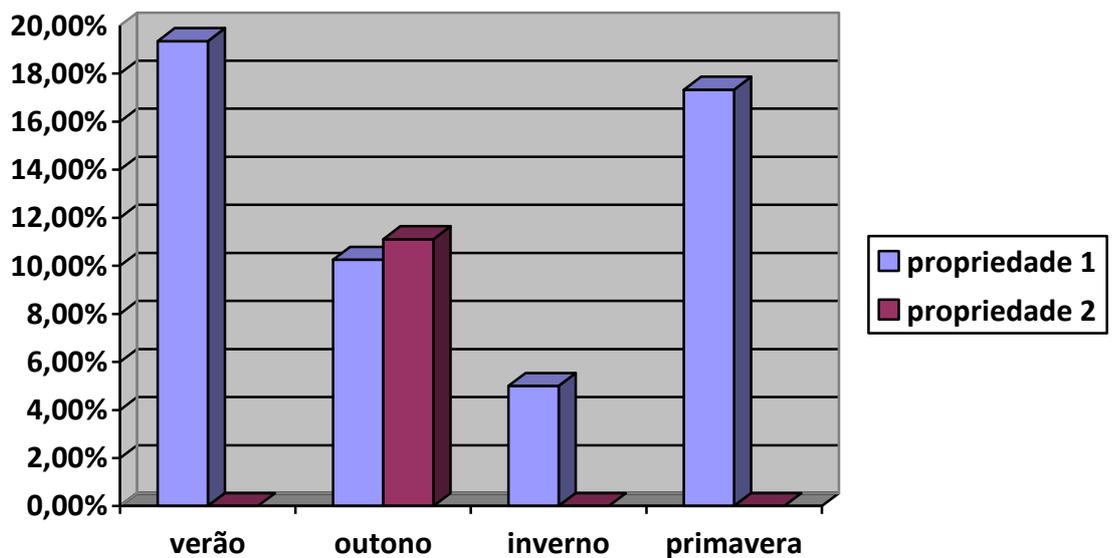


Figura 2 - Taxa de parasitismo em caracóis *Heleobia* spp. coletados em Arroio Grande no período de um ano.

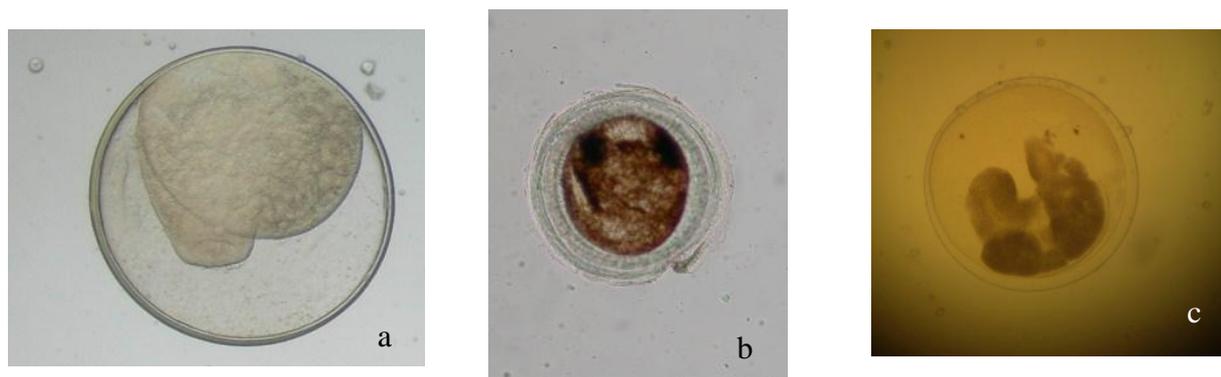


Figura 3 a, b e c: Metacercárias encontradas no tegumento das libélulas dissecadas. Aumento de 200x. Zoom digital.

Uma amostragem de 1671 caracóis foi dissecada sendo encontrado uma frequência de cercárias entre 2,3% a 12,8%. Em *Heleobia* spp. oriundos de Arroio Grande a frequência foi de 6,47% (63/973), de Rio Grande foi 12,83% (24/187), de Palmares do Sul foi zero (foram encontradas só as fases de metacercárias) e Santa Vitória do Palmar 4,72% (18/381) (tabela 1). COIMBRA *et al.* (2005) encontraram em Arroio Grande uma frequência de 16,6% de trematódeos parasitando caracóis *Heleobia* spp.

Ambas as espécies de *Heleobia* encontradas albergavam fases de rédias e cercárias. Para verificar a emissão de cercárias pelos caracóis, foram observadas diariamente dez placas contendo 50 caracóis cada. Os primeiros cinco dias de observação a emissão de aproximadamente 200 cercárias foi verificada a cada 24h, em pelo menos em três placas e emissão persistente por até 17 dias, principalmente no período noturno. Foram encontrados três tipos de cercárias, classificadas como morfotipo 1, morfotipo 2 e morfotipo 3.

Tabela 1. Taxa de parasitismo das fases de cercárias encontradas nos caracóis *Heleobia* spp. coletados em Rio Grande, Arroio Grande, Palmares do Sul e Santa Vitória do Palmar de 2006 a 2009.

Locais	Total de caracóis dissecados	Total de caracóis parasitados	Taxa de parasitismo %
Arroio grande	973	63	6,47
Rio Grande	187	24	12,83
Palmares do Sul	130	0	-
Santa Vitória do Palmar	381	18	4,72
Totais	1671	105	6,26

As cercárias classificadas como morfotipo 1 apresentavam características de corpo em forma elíptica, intensamente pigmentado. Presença de três ocelos fortemente pigmentados posicionados logo abaixo da ventosa oral, sendo os laterais mais facilmente observáveis que o ocelo central, uma vez que esses se destacavam por apresentarem uma faixa sem pigmento junto as suas faces internas. Ausência de acetábulo. Outro aspecto deste morfotipo, encista-se rapidamente no meio externo em metacercária fortemente pigmentada com características compatíveis com as cercárias do morfotipo 1, como a presença de ocelos fortemente pigmentados (Figura 4). Essas metacercárias foram denominadas de metacercárias morfotipo 1 (Figura 5). O conjunto de caracteres possíveis de serem observados indica que esta cercária originará trematódeos digenéticos das famílias Notocotylidae ou Pronocephalidae de acordo com SCHELL, (1970) e FRANDBSEN; CHRISTENSEN, (1984). Os moluscos, hospedeiros intermediários caracterizam-se por serem gastrópodes operculados, como no presente caso exemplares de *Heleobia* spp.



Figura 4: Cercária morfotipo 1. Aumento de 40x. Zoom digital.



Figura 5: Metacercária morfotipo 1, encontrada presa no funda da placa. Aumento 40x. Zoom digital

As cercárias do morfotipo 2 apresentavam as características de corpo pigmentado, sem manchas oclares e com presença de estilete na porção oral. As medidas encontradas foram de

0,24mm em comprimento total, 0,10mm comprimento de cauda e 0,14mm de corpo (Figura 6 a e b). Nas placas que apresentavam as cercárias morfotipo 2, foi verificado que estas não encistavam, ou seja, não foi observada nenhuma estrutura com características de metacercária no ambiente externo (placa de petri). O observado foi que após um período (acima de 4 horas), essas cercárias perdiam totalmente a motilidade e a vitalidade. Provavelmente, as cercárias de morfotipo 2 pertençam a uma espécie de trematódeo que necessita mais de um hospedeiro intermediário para formar a fase infectante de metacercária. Ainda, foram encontradas metacercárias presentes no interior de *Heleobia*, com frequência de 2,03% (34/1671). Essas metacercárias foram classificadas como morfotipo 2 (Figura 7). Essas características reafirmam uma possibilidade deste trematódeo necessitar de um segundo hospedeiro intermediário.

Tabela 2. Taxa de parasitismo das fases de metacercárias encontradas nos caracóis *Heleobia* spp. coletados em Arroio Grande, Rio Grande, Palmares do Sul e Santa Vitória do Palmar de 2006 a 2009.

Locais	Nº de caracóis dissecados	Nº de caracóis parasitados	Taxa de parasitismo (%)
Arroio Grande	972	16	1,64
Rio Grande	187	10	5,34
Palmares do Sul	130	3	2,3
Santa Vitória do Palmar	381	5	1,3
Total	1671	34	2,03

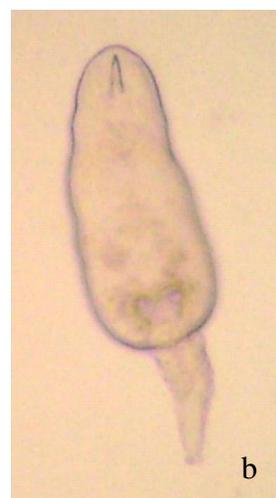


Figura 6 a e b: Cercária morfotipo 2. Aumento 10x. Zoom digital

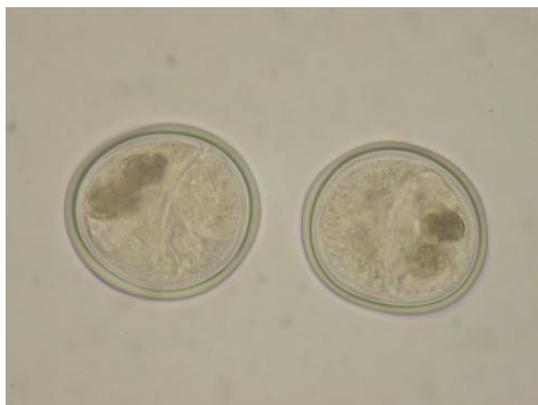


Figura 7: Metacercária morfotipo 2, encontrada nos tecidos e interior da concha dos *Heleobia* spp. Aumento 200x.

As cercárias de morfotipo 3 foram encontradas em duas das coletas realizadas e em pequena quantidade quando comparado com os outros morfotipos, o que não permitiu a coleta de maiores dados. O morfotipo 3 apresentou características como cauda bífida, e de 0,105mm de cauda e de 0,15 de corpo e um comprimento total de 0,255mm (Figura 8).



Figura 8: Cercária morfotipo3. Aumento 40x.
Zoom digital

Diversos tipos de cercárias de trematódeos foram descritos no Brasil por diferentes autores desde o início do século passado. Entre as larvas mais comumente encontradas destacam-se as cercárias de cauda bifurcada (onde está incluída a de *Schistosoma mansoni*) e de cauda simples (como a de *Fasciola hepatica*) que apresentam importância médico-veterinária. Uma gama de formas diferentes podem ser encontradas em moluscos. Para

algumas dessas larvas, os hospedeiros definitivos já são conhecidos, mas para grande maioria ainda não foi possível fazer a identificação, pois, os adultos são parasitos de peixes, anfíbios, répteis, aves ou mamíferos, alguns ainda desconhecidos para a ciência (MELO, 2007).

Com os resultados encontrados podemos concluir que os caracóis do gênero *Heleobia* e insetos da ordem Odonata, subordem *Anisoptera* são hospedeiros intermediários de trematódeos, por apresentarem pelo menos três morfotipos distintos de cercárias (caracóis) e fases de metacercárias (caracóis e insetos) nas localidades estudadas. Porém, mais estudos são necessários para identificação das fases larvais encontradas, bem como para conhecer o hospedeiro definitivo e identificar o parasito adulto e a relação de seu ciclo de vida com a ocorrência da ehrlichiose monocítica equina.

REFERENCIAS

- 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.
- BODDEKE, R. The life history of *Prosthogonimus ovatus* Rudolphi II the intermediate hosts. *Tropical an Geographical Medicine*, v. 12, p. 363-377, 1960.
- CHAE J.; PUSTERLA N.; JOHNSON E.; DEROCK E.; LAWER S.P; MADIGAN J.E. Infection of aquatic insects with Trematode metacercariae carrying *Ehrlichia risticii*, the cause of Potomac horse fever. *Journal Medical Entomology*, v. 37(4), p. 619-625, 2000.
- COIMBRA H.S. *Erliquiose monocítica equina no Rio Grande do Sul: Aspectos clínicos, anátomo-patológicos e epidemiológicos*. 2003. 40f. Dissertação (Mestrado em Ciências – área de Veterinária Preventiva). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2003.
- COIMBRA H.S.; SCHUCH L.F.D.; VEITEINHEMER-MENDES M.C.A.; MEIRELES M.C.A. *Neorickettsia* (*Ehrlichia*) *risticii* no Sul do Brasil: *Heleobia* spp (Mollusca: Hydrobilidae) e *Parapleurolophocercous cercariae* (Trematoda: Digenea) como possíveis vetores. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 72, n. 3, p. 325-329, 2005.

- DUTRA F.; SCHUCH L.F.D.; DELUCCHI E.; CURCIO B.R.; COIMBRA H.S.; RAFFI M.B.; DELLAGOSTIN 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.
- FLORES, V.; BRUGNI, N. *Catatropis hatcheri* n. sp. (Digenea: Notocotylidae) from *Heleobia hatchery* (Prosobranchia: Hydrobiidae) and notes on its life-cycle in Patagonia, Argentina. *Systematic Parasitology*, v. 63, p. 111-118, 2006.
- FRANCESCO, C.G De; ISLA, F.I. The life cycle and growth of *heleobia australis* (d'orbigny, 1835) and *h. conexa* (gaillard, 1974) (gastropoda: rissooidea) in mar Chiquita coastal lagoon (argentina). *Journal of Molluscan Studies*, v. 70, p. 173–178, 2004.
- FRANSEN, F. & N.O. CHRISTENSEN.. An introductory guide to the identification of cercariae from African freshwater snails with special reference to cercariae of trematodes species of medical and veterinary importance. *Acta Tropica*, v. 41, p. 181-202. 1984.
- 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.
- HERSHELER, R.; THONPSON, F.G. A review of the aquatic gastropod subfamily Cochliopinae (Prosobranchia: Hydrobiidae). *Malacological Review*, Ann Arbor, v. 5, p. 1-140, 1992. Suplemento 1.
- 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.
- LANZER, R. Distribuição, fatores históricos e dispersão de moluscos límnicos em lagoas do sul do Brasil. *Biociências*, Porto Alegre, v. 9, n. 2, p. 63-84, 2001.
- MASCARENHAS, C.S. *Helmintho e Atropodofauna de Paroaria coronata (Miller, 1776) (Passeriformes – Emberizidae)*. 2008. 40f. Dissetação (Mestrado em Parasitologia). Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2008.
- MELO, A.L. Formas larvais de trematódeos em moluscos límnicos. In: Vigilância e controle e moluscos de importância epidemiológica. Diretrizes técnicas: Programa de vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE). 2º Ed. Serie A: normas e manuais técnicos. Brasília, DF, editora do Ministério da Saúde (MS), p.71-80. 2007.

- MONTEIRO C.M.; AMATO J.F.R.; AMATO S.B. Prosthogonimus ovatus (Rudolphi) (Digenea, Prosthogonimidae) em três espécies de aves aquáticas da região Sul do Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 24, p. 253-257. 2007.
- 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.
- 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 Potomac horse fever. *Journal 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. 2000.
- RIKIHISA Y. Rickettsial diseases. In: Reed S. M. & Bayly W. M. *Equine Internal Medicine*. 1st edition. Philadelphia, USA, W.B. Saunders Company, p.112-123. 1998.
- SHELL, S.C. How to know the trematodes. Dubuque, WM. C. Brown Co. Publishers, 355p. 1970.
- SILVA, M. C. P. Da; VEITENHEIMERMENDES, I. L. Nova espécie de *Heleobia* (Rissooidea, Hydrobiidae) para a Planície Costeira do sul do Brasil. *Iheringia - Série Zoologia*, Porto Alegre, v. 94, n. 1, p. 89-94, 2004.
- SILVA, M.C.P. Dados morfológicos de *Heleobia parchappei* (Orbigny, 1835) (Prosobranchia, Hydrobiidae, Littoridininae). *Iheringia, Série Zoologia*, Porto Alegre, v. 75, p. 81-87, 1993.
- THATCHER, V.E. Trematódeos Neotropicais, Editora INPA, Amazonas, Brasil, 553 p. 1993.

6 CONCLUSÕES

Com os resultados encontrados podemos afirmar que a ehrlichiose monocítica equina é uma importante causa de diarreia e morte de nas criações de cavalos Crioulos.

As regiões de estudo e de ocorrência da enfermidade apresentam características ecológicas favoráveis para a manutenção dos possíveis vetores biológicos.

Caracóis do gênero *Heleobia* são encontrados em abundância em todos os pontos de coletas, nas quatro localidades estudadas, e são hospedeiros de pelo menos três morfotipos distintos de cercárias.

Insetos da ordem Odonata apresentam fases de metacercárias.

7 REFERÊNCIAS

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, p. 143-147. 1994.

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.; MUKHERJEE D.; MATTINGLY-NAPIER B. L.; DUTTA S.K. Diagnostic Application of Polymerase Chain Reaction for Detection of *Ehrlichia risticii* in Equine Monocytic Ehrlichiosis (Potomac Horse Fever). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p. 2228-2233. 1991.

CHAE J.; PUSTERLA N.; JOHNSON E.; DEROCK E.; LAWER S.P; MADIGAN J.E. Infection of aquatic insects with Trematode metacercariae carrying *Ehrlichia risticii*, the cause of Potomac horse fever. **Journal Medical Entomology**, v. 37(4), p. 619-625. 2000.

COIMBRA H.; SCHUCH L.F.; RIETCORREA 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. In: XIV congresso estadual de medicina veterinária; ii congresso de medicina veterinária do cone sul; VII exposição de equipamentos, produtos e serviços da medicina veterinária. **Anais do...** Gramado. v. 1, p. 200. 1999.

COIMBRA H.S. **Erlíquiose monocítica equina no Rio Grande do Sul: Aspectos clínicos, anátomo-patológicos e epidemiológicos.** 2003. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas. 49p.

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

COIMBRA H.S.; MEIRELES M.C.A.; ZAMBRANO C.; SCHUCH L.F.D. Ehrlichiose monocítica equina (EME) como causa de diarreia em equinos no Rio Grande do Sul. In: 14º Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & 2º Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses, Ribeirão Preto, SP, 2006. **Anais...** Ribeirão Preto, v.1, p. 381. 2006.

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

CURCIO, B. R.; RIET-CORREA, F.; RAFFI, M. B.; DUTRA, F.; SCHUCH, L. F. D.; Diarreia em equinos causada por *Ehrlichia risticii* no sul do Brasil. In: VII Congresso de iniciação científica, Pelotas, RS, 1998. **Anais...** Pelotas, v.1, p. 379. 1998.

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

DUTRA F.; SCHUCH L.F.D.; DELUCCHI E.; CURCIO B.R.; COIMBRA H.S.; RAFFI M.B.; DELLAGOSTIN 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. PEENEY 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.

FRANSEN, F. & N.O. CHRISTENSEN.. An introductory guide to the identification of cercariae from African freshwater snails with special reference to cercariae of trematodes species of medical and veterinary importance. **Acta Tropica,** v. 41, p. 181-202. 1984.

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 J.C.; 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, p. 1936-1939. 1989.
- 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.
- 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.
- LONG M.T.; GOETZ T.E.; WHITELEY H.E. KAKOMA I.; LOCK T.E. Identification of *Ehrlichia risticii* as the causative agent of two equine abortions following natural maternal infection. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 7, p. 201-205. 1995.
- 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.
- OLCHOWY T.W.J.; AMES T.R.; MOLITOR T.W. Serodiagnosis of equine monocytic ehrlichiosis in selected groups of horses in Minnesota. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 196, p. 1967-1970. 1990.
- PALMER J.E.; BENSON C.E.; WHITLOCK R.H. Equine ehrlichial colitis: resistance to rechallenge in experimental horses and ponies. **American Journal Veterinary Research**. v. 51, p. 763-765. 1990.
- 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 Potomac horse fever. **Journal 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. 2000.
- RIKIHISA Y. & PERRY B.D. Causative Ehrlichial Organisms in Potomac Horse Fever. **Infection and Immunity**, v. 49, p. 513-517. 1985.
- RIKIHISA Y. Rickettsial diseases. In: Reed S. M. & Bayly W. M. **Equine Internal Medicine**. Philadelphia, USA, W.B. Saunders Company, 1st edition. p.112-123. 1998.
- RIKIHISA Y.; STILLS H.; ZIMMERMAN G. Isolation and continuous culture of *Neorickettsia helminthoeca* in macrophage cell line. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p. 1928-1933. 1991.

RIKIHISA Y; Rickettsial link with acute equine diarrhoea. **Veterinary Record**, v.13, p. 390. 1984.

SHELL, S.C. **How to know the trematodes**. Dubuque, WM. C. Brown Co. Publishers, 355p. 1970.

STEELE K.E.; RIKIHISA Y.; WALTON A.M. Ehrlichia of Potomac Horse Fever Identified with a Silver Stain. **Veterinary Pathology**, v. 23, p. 531-533. 1986.

VEMUPALLI R.; BISWAS B.; DUTTA SK. Patogenic, immunologic, and molecular differences between two *Ehrlichia risticii* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 2987-2993. 1995.

WEN B.; RIKIHISA Y.; YAMAMOTO S.; KAWABATA N.; FUREST P.A. Characterization of SF agent, an *Ehrlichia* sp. Isolated from *Stellantchasmus falcatus* fluke, by 16S rRNA base sequence, serological, and morphological analysis. **International Journal Systematical Bacteriology**. v. 46, p. 149-154. 1996.

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