

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

***Neorickettsia risticii* no Sul do Brasil: Parâmetros clínicos, hematológicos e
caracterização molecular**

Juliana Garcia da Silva Teixeira

Pelotas, 2023

Juliana Garcia da Silva Teixeira

***Neorickettsia risticii* no Sul do Brasil: Parâmetros clínicos, hematológicos e
caracterização molecular**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Mário Carlos Araújo Meireles

Coorientador: Luiz Filipe Damé Schuch

Pelotas, 2023

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

T266n Teixeira, Juliana Garcia da Silva

Neorickettsia risticii no Sul do Brasil [recurso eletrônico] : parâmetros clínicos, hematológicos e caracterização molecular / Juliana Garcia da Silva Teixeira ; Mário Carlos Araújo Meireles, orientador ; Luiz Filipe Damé Schuch, coorientador. — Pelotas, 2023.
68 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1. Neorickettsiose equina. 2. *Neorickettsia risticii*. 3. Filogenia. 4. Sequenciamento genético. I. Meireles, Mário Carlos Araújo, orient. II. Schuch, Luiz Filipe Damé, coorient. III. Título.

CDD 636.10896342

Juliana Garcia da Silva Teixeira

Neorickettsia risticii no Sul do Brasil: Parâmetros clínicos, hematológicos e caracterização molecular

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 21/09/2023

Banca examinadora:

Prof. Dr. Mário de Araújo Meireles (Orientador)
Doutor em Microbiologia e Imunologia pela Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dr. Renata Osório de Faria
Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Helen Silveira Coimbra
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. João Luiz Zani
Doutor em Epidemiologia experimental e aplicada a zoonoses pela Universidade de São Paulo

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu marido Murilo e meus filhos amados Martín e Cecília, que precocemente compreenderam a definição de resiliência e perseverança, e souberam aguardar o tempo da realização deste sonho.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, razão de todo o propósito, que nunca me faltou, mesmo nas tantas vezes em que estive perdida, sem enxergar a saída.

A meu avô (*in memoriam*), agradeço por despertar o amor e fascínio que até hoje pulsa forte em mim pelos cavalos, com ele conheci a cancha reta e foi ali que tudo começou.

A meus pais, a quem devo o que sou, aqueles que sempre foram exemplo e principais referências pra mim, e que me ensinaram a batalhar e lutar pelos meus ideais, dedico essa conquista.

Meu irmão, por estar sempre presente, e ser o tio maravilhoso que é para os meus filhos.

A minha dinda (*in memoriam*), que narrava a todos sobre o meu sonho de criança, de um dia ser “doutora dos bichinhos”.

Murilo, meu par. Meu sincero agradecimento por estar caminhando ao meu lado nessa jornada, mesmo nos dias mais difíceis, quando tinha a certeza de que daria errado, tu me segurou e com teu abraço consegui seguir adiante.

Meus filhos amados, por tamanha generosidade e paciência.

À família que escolhi, meus sogros, agradeço todo apoio e as inúmeras vezes que me ajudaram... a fé e oração no meu trabalho sem dúvida me deram forças pra seguir.

Adriana e Graciela, obrigada por todas as impressões e edições em cima da hora, vocês são demais!!!

Leandro “Quindim”, muito obrigada pela parceria e ajuda de sempre!

Kaká, valeu toda dedicação e suporte!

Cris... por ser a melhor e estar, sempre por mim e para mim!

Aos amigos e demais familiares, agradeço profundamente todo o incentivo e palavras de apoio que sempre me foram dados.

Prof Schuch, o que dizer... Abriu a porta mais uma vez, acreditando na minha proposta e confiou um sonho em mim, espero ter sido digna dessa confiança.

Helen, obrigada por iniciar esta linda pesquisa e pela generosidade durante todo o percurso.

Prof Mário gratidão imensa pela oportunidade.

Profa. Renata, sempre pronta para uma palavra amiga e conversa no corredor do laboratório, Prof Rodrigo, obrigada pela paciência e ensinamentos.

Kauê e demais colegas de laboratório, agradeço muito pela parceria e ajuda nas inúmeras horas de bancada.

ABCCC, Radio Sul e Leôncio Severo, meu agradecimento por apoiarem a pesquisa e ajudar na divulgação e coleta de dados, sempre que solicitado.

UFPel, meu agradecimento sincero pela oportunidade de todo o aprendizado.

Epígrafe
“Feliz é quem toca seu destino sem questionar os motivos.”
Gujo Teixeira

Resumo

DA SILVA-GARCIA, Juliana. ***Neorickettsia risticii* no Sul do Brasil: Parâmetros clínicos, hematológicos e caracterização molecular.** 2023. 81f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

A Neorickettsiose Equina é causada pela *Neorickettsia (Ehrlichia) risticii*, bactéria intracelular, endossimbionte de trematódeos digenéticos, que são parte do ciclo de caramujos dulceaquícolas. Trata-se de enfermidade diarreica febril, sistêmica, aguda e potencialmente fatal, cujo caráter endêmico e sazonal afeta comumente cavalos de zonas alagadiças em épocas quentes. O estudo da inter-relação dos comportamentos clínico, bioquímico e hematológico de cavalos naturalmente infectados por *N. risticii*, pode promover o reconhecimento precoce desses padrões, hipoteticamente preditivos a sobrevivência dos animais acometidos. Hospedeiros intermediários envolvidos na transmissão do patógeno devem ser investigados quanto a presença do agente. Estudos prévios confirmaram a circulação da *N. risticii* no Sul do Brasil por Sorologia e PCR, entretanto, o sequenciamento genético e classificação filogenética ainda não estão claros. Logo, esta pesquisa realizou a descrição de parâmetros clínicos, bioquímicos e hematológicos de cavalos sintomáticos, assim como o diagnóstico molecular, sequenciamento genético e análise das relações filogenéticas de *N. risticii*. Realizou-se a análise do agente em animais assintomáticos e caramujos do gênero *Heleobia* oriundos de propriedades endêmicas. Os cavalos analisados foram admitidos no HCV-UFPel, entre fevereiro de 2022 a março de 2023, com sintomatologia compatível à NE, tendo como principal critério de inclusão um neste PCR com amplificação de um fragmento de 529 pb realizado utilizando DNA genômico (Gdna) sanguíneo. Os parâmetros clínicos que apresentaram alterações relevantes foram a diarreia e desidratação, culminando em alterações bioquímicas e hematológicas esperadas. Ataxia foi observada em um dos cavalos positivos. Os animais sintomáticos apresentaram a formação de bandas de 529pb, típicas para *N. risticii*, ao passo que assintomáticos e caramujos não amplificaram bandas. Reportam-se os primeiros sequenciamentos genéticos de *N. risticii* realizados no extremo Sul do Brasil, bem como o estudo filogenético do agente. Os resultados encontrados reforçam a necessidade de aprimorar a busca de achados significativos, que estabeleçam um critério de avaliação laboratorial associado com manifestações clínicas, que possa acelerar o diagnóstico e início do tratamento, objetivando minimizar o impacto econômico que ocorre em regiões endêmicas à enfermidade. A análise filogenética demonstrou que as amostras obtidas possuem alta similaridade entre si e com as demais sequências disponíveis na América do Sul. Portanto, nossos achados confirmam a circulação do agente na região e, através do enriquecimento do banco genético, encorajam estudos vindouros que aprofundem o conhecimento sobre o agente etiológico.

Palavras-chave: Neorickettsiose equina; *Neorickettsia risticii*; Filogenia; Sequenciamento genético.

Abstract

DA SILVA-GARCIA, Juliana. ***Neorickettsia risticii* in Southern Brazil: Clinical and hematological parameters with molecular characterization.** 2023. 81p. Dissertation (Doctoral Degree in Sciences) - Graduate Program in Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2023.

Equine Neorickettsiosis is caused by *Neorickettsia (Ehrlichia) risticii*, an intracellular endosymbiont of digenean trematodes, which are part of the freshwater snail cycle. It is a febrile, systemic, acute, and potentially fatal diarrheal disease, whose endemic and seasonal nature commonly affects horses in swampy areas in hot seasons. The study of the interrelationship of the clinical, biochemical, and hematological behaviors of horses naturally infected by *N. risticii* may promote the early recognition of these patterns, being hypothetically predictive for the survival of affected animals. Intermediate hosts involved in the transmission of the pathogen must be investigated for the presence of the agent. Previous studies confirmed the occurrence of *N. risticii* in Southern Brazil using Serology and PCR, however, the genetic sequencing and phylogenetic classification are still unclear. Therefore, this research carried out the description of clinical, biochemical, and hematological parameters of symptomatic horses, as well as molecular diagnosis, genetic sequencing, and analysis of the phylogenetic relationships of *N. risticii*. The agent was analyzed in asymptomatic animals and snails of the genus *Heleobia* from endemic properties. The horses analyzed were admitted to HCV-UFPel, between February 2022 and March 2023, with symptoms compatible with NE. The main inclusion criterion was a nested PCR with amplification of a 529 bp fragment carried out using blood genomic DNA (Gdna). The clinical parameters showing relevant alterations were diarrhea and dehydration, culminating in expected biochemical and hematological changes. Ataxia was observed in one of the positive horses. Symptomatic animals showed the formation of 529bp bands, typical for *N. risticii*, while asymptomatic animals and snails did not amplify bands. The first genetic sequencing of *N. risticii* carried out in the extreme south of Brazil is reported, alongside with the phylogenetic study of the agent. The results reinforce the need to improve the search for significant findings, in order to establish a laboratory evaluation criterion associated with clinical manifestations. Once the diagnosis and beginning of treatment is accelerated, the economic impact that occurs in regions endemic to the disease shall be minimized. Phylogenetic analysis showed that the samples obtained have high similarity to each other and to other sequences available in South America. Therefore, our findings confirm the occurrence of the agent in the region and, with the enrichment of the genetic bank, encourage future studies to deepen the knowledge on the etiological agent.

Keywords: Equine neorickettsiosis; *Neorickettsia risticii*; Phylogeny; Genetic sequencing.

Lista de Figuras

Artigo 1

Figura 1. Localização dos 04 casos de Neorickettsiose equina confirmados no Laboratório de Biologia Molecular Veterinária – LaBMol-Vet, UFPel (Rio Grande do Sul, Brasil).....28

Artigo 2

Figure 1. South American map, with a highlight for Brazil, the State of Rio Grande do Sul, in Southern Brazil and the location of the study highlighted in red 61

Figure 2. Agarose gel electrophoresis. The 529-bp PCR product of *Neorickettsia risticii* DNA. Note: 01 – Negative Control; 02 – Horse 01; 03 – Horse 02; 04 – Horse 03; 05 – Horse 04; 06 – Molecular Weight Marker..62

Figure 3. Phylogenetic analysis. *Neorickettsia risticii* based on 16S rDNA sequence comparison. GenBank™ accession numbers are indicated alongside the sample names. The evolutionary history was inferred using the Maximum Likelihood method and the Kimura 2-parameter model.....63

Figure 4. Percentage of similarity. *Neorickettsia risticii* similarity among the samples sequenced in the present study, originating from Rio Grande do Sul, is highlighted in red using the OR079499.2 sample as the reference. Obs. Reference sequence (1): OR079499.2 Raposa2. Identities normalized by aligned length. Colored by identity.64

Figure 5. The percentage of similarity. *Neorickettsia risticii* similarity between samples from South America, using sample MK760556.1 as reference, is marked in red.1 Obs. Reference sequence (1): MK760556.1 Rio de Janeiro. Identities normalized by aligned length. Colored by identity.....65

Figure 6. Percentage of similarity. *Neorickettsia risticii* similarity among all samples from this study is highlighted in red, using the *Neorickettsia helminthoeca* sample

(KX462531.1) as the reference. The eight samples sequenced in the present study are highlighted in blue. Obs. Reference KX462531.1 *N. helminthoeca*.....66

Lista de Tabelas

Tabela 1. Sinais clínicos apresentados pelos 4 animais na chegada no hospital veterinário.....	30
Tabela 2. Resultados dos exames bioquímico, hemograma, leucograma, análise plasmática, hemogasometria e de hemoparasitas dos 4 animais do estudo no dia que chegaram no hospital veterinário.	31

SUMÁRIO

1 Introdução.....	13
2 Revisão da literatura	15
3 Artigos.....	24
3.1 Artigo 1	25
3.2 Artigo 2.....	41
4 Considerações Finais	66
Referências	68
Anexos	76

1 Introdução

Dutra *et al.* (2001) investigaram uma doença que ocorria há mais de 100 anos no Rio Grande do Sul, localmente chamada “churrido equino”, uma diarreia endêmica cuja apresentação dos casos clínicos se dava nos períodos mais quentes do ano em propriedades com características geográficas semelhantes, compostas de campos e áreas alagadiças (Coimbra *et al.*, 2006). Essa enfermidade é causada por uma bactéria gram negativa intracelular obrigatória chamada *Neorickettsia risticii* (anteriormente *Ehrlichia risticii*) (Dutta *et al.*, 1985; Holland *et al.*, 1985). Foi renomeada por conter caracteres morfológicos, moleculares e biológicos compatíveis com o gênero *Neorickettsia* (Holland *et al.*, 1985; Dumler *et al.*, 2001). Mundialmente conhecida como *Potomac Horse Fever* (Febre do Cavalo de Potomac), apresenta atualmente registros de distribuição Global, o que, segundo Bertin *et al.* (2013) torna a nomenclatura ultrapassada. Portanto, pesquisas atuais adotaram a terminologia “Neorickettsiose Equina” (NE) (Bertin *et al.*, 2013), denominação que será utilizada também nesse estudo.

De acordo com Dutra *et al.* (2001), equinos em geral são suscetíveis à doença, que se manifesta de forma mais grave em animais transportados para áreas endêmicas, se comparados àqueles nascidos nestes ambientes. São considerados hospedeiros acidentais, adquirindo a infecção horizontalmente ao ingerir insetos aquáticos contendo trematódeos e metacercárias infestadas com a *N. risticii*, ou as formas livres de cercárias na água (Vaughan; Tkach; Greiman, 2012). Trata-se de uma enfermidade sistêmica aguda, potencialmente fatal, sendo a principal causa de diarreia em cavalos não estabulados no Rio Grande do Sul (Coimbra *et al.*, 1999; Dutra *et al.*, 2001). Dentre os sinais clínicos estão diarreia, febre, anorexia, letargia (depressão) e cólica, podendo evoluir para laminite e/ou aborto em éguas prenhes (Bertin *et al.*, 2013), implicando em grandes perdas econômicas (Rikihisa, 1985; 2004).

Portanto, o reconhecimento e tratamento precoce dos sinais considera-se a principal chave para minimizar os impactos causados pela doença, que não apresenta risco zoonótico (Dutra *et al.*, 2001; Coimbra *et al.*, 2006). Considerando as evidências epidemiológicas e distribuição mundial da NE, estima-se que a enfermidade ainda seja

subdiagnosticada no Brasil, reforçando a necessidade de investigação rotineira de enterocolites equinas nas manadas, uma vez que em propriedades com criação extensiva, a identificação dos sintomas é feita por funcionários de campo e, portanto, manifestações leves da doença podem não ser percebidas.

Apesar do amplo estudo epidemiológico da NE, percebe-se uma limitação de disponibilidade de dados referentes aos achados clínicos e laboratoriais com relação a cavalos naturalmente infectados (Bertin *et al.*, 2013). Sendo assim, sinais clínicos, achados macroscópicos e histológicos podem ser sugestivos de NE (Uzal; Diab, 2015), mas, apesar da sorologia ser utilizada como método de diagnóstico (*e.g.* Reação de Imunofluorescência Indireta - RIFI, ELISA e western immunoblotting) (Bertin *et al.*, 2013; (Biswas *et al.*, 1991), a confirmação da presença do agente é feita através de ensaio de PCR de amostras de fezes, conteúdo intestinal, *buffy coat* ou mesmo do sangue total (Barlough; Rikihisa; Madigan, 1997), bem como em moluscos e trematódeos (Barlough *et al.*, 1998; Long *et al.*, 2003; Pusterla *et al.*, 2003).

Uma vez que a relação filogenética da *N. risticii* na população equina do sul do Brasil parece ser um aspecto de suma importância na compreensão da epidemiologia da NE, o presente estudo teve como principal objetivo a descrição do sequenciamento genético da *N. risticii* através da análise de um fragmento do gene 16S rRNA, visando comparar as sequências obtidas com aquelas apresentadas previamente no GenBank™, dando início a realização de estudos filogenéticos, que aumentarão o entendimento atual sobre a distribuição e heterogenicidade do agente.

Os dados sobre NE disponíveis no Brasil são escassos, provavelmente devido à pouca investigação de enterocolites equinas. Porém, a confirmação da presença da *N. risticii* no estado do Rio Grande do Sul é importante para o conhecimento do agente, que está em circulação na região e salienta a importância de implementar medidas preventivas adequadas a fim de reduzir perdas econômicas. Além disso, dados que contribuam com a compreensão a respeito da ecologia, transmissão e epidemiologia da *N. risticii* são necessários para tornar mais efetivos a prevenção, diagnóstico e tratamento dessa enfermidade.

2 Revisão da literatura

2.1 Produção de Equinos no Rio Grande Do Sul

O Brasil possui o 4^o maior rebanho de cavalos do mundo, com aproximadamente 5,5 milhões de cabeças (FAO, 2016) e movimenta anualmente cerca de R\$ 16,15 bilhões, impulsionando o setor econômico primário do país. A equinocultura envolve vários segmentos e é responsável pela geração de aproximadamente 3 milhões de empregos diretos e indiretos (MAPA, 2016). O Rio Grande do Sul (RS) caracteriza-se economicamente pela produção integrada de agricultura-pecuária, com grandes extensões de áreas de arroz irrigado e uma população de equinos aproximada de 500.000 cabeças (IBGE, 2021). Além dos aspectos econômicos, observa-se que a equinocultura está diretamente ligada ao lazer, cultura, esporte e trabalho, vinculados às tradições gaúchas que salientam a relevância da criação de cavalos no Rio Grande do Sul (Costa *et al.*, 2013). Frente à importância do cavalo para a economia, reforça-se a necessidade de cuidados diferenciados com essa espécie (Lima; Cintra, 2016), tendo em vista que sua domesticação a tornou vulnerável a distúrbios gastrintestinais com consequentes repercussões sistêmicas, como a laminite, e outras condições clínicas com altas taxas de morbidade e mortalidade (Archer; Proudman, 2006; Proudman *et al.*, 2015).

2.1.1 Principais patologias que afligem equinos no RS

De acordo com Pierezan *et al.* (2009), o aumento das atividades econômicas envolvendo equinos resulta em uma modernização da medicina equina e maior valorização desses animais. Nesse contexto, entende-se que a aplicação de métodos de prevenção e controle de doenças, assim como o desenvolvimento de técnicas cirúrgicas e fármacos mais eficientes estão associadas à redução de perdas, tanto por mortes ou queda no desempenho. Considerando que poucos estudos existem sobre a prevalência de doenças de equinos no Brasil, restritos somente a sistemas ou órgãos específicos (Pimentel *et al.*, 2007; Reichmann; Dearo; Rodrigues, 2008; Trotte *et al.*, 2008), em estudo retrospectivo na região central do RS, Pierezan *et al.* (2009) apontou que as afecções do sistema digestivo foram as mais frequentes como causa de morte nesta espécie. Por outro lado, o sistema tegumentar obteve maior casuística em pesquisa realizada envolvendo diagnósticos de causas de morte e de lesões em

equinos na região Sul do Rio Grande do Sul entre 1978 e 2012, utilizando dados obtidos pelo Laboratório Regional de Diagnóstico da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (LRD/UFPel) (Marcolongo-Pereira *et al.*, 2014), cujos resultados demonstraram que equinos representaram 10,14% de todas as espécies animais que chegaram ao laboratório no período do estudo (Schild *et al.*, 2013). Dentre as principais enfermidades identificadas destacaram-se aquelas que causam a morte dos animais ou determinam os maiores prejuízos econômicos, conforme Marcolongo-Pereira *et al.* (2014). De acordo com Coimbra *et al.* (2006) e Marcolongo-Pereira *et al.* (2012b), doenças como a Neorickettsiose equina (*Neorickettsia risticii*) e a Pitiose (*Pythium insidiosum*) ocorrem com frequência em áreas úmidas e campos baixos sujeitos a alagamentos – características de alguns municípios da região sul do Rio Grande do Sul, favoráveis à presença destes patógenos.

2.2 Neorickettsiose Equina (NE)

Dutra *et al.* (2001) relataram uma antiga enfermidade observada a pelo menos 100 anos no Sul do Brasil e Uruguai, conhecida como “churrio” ou “churrido” equino. Conforme Dutra *et al.* (2001), Coimbra *et al.* (2003) e Coimbra *et al.* (2010) apresentava ocorrência anual nos meses de verão, em propriedades localizadas ao longo das margens da Lagoa Mirim. De acordo com Vaughan, Tkach e Greiman (2012), tratava-se de Neorickettsiose Equina (NE), cujo agente etiológico é uma bactéria gram negativa intracelular obrigatória reclassificada como *Neorickettsia risticii* (Dumler *et al.*, 2001), anteriormente *Ehrlichia risticii* (Dutta *et al.*, 1985; Holland *et al.*, 1985).

Conhecida como a principal causa de diarreia em cavalos não estabulados no Rio Grande do Sul, a NE - enterotifocolite potencialmente fatal (Rikihisa, 2004) tem, portanto característica sazonal, ocorrendo nos meses mais quentes e úmidos, tornando-se um tipo de colite comum em áreas consideradas endêmicas, aumentando a incidência em animais residentes próximo a aguadas (Madigan, 2000).

De acordo com Greiman *et al.* (2016), o complexo ciclo de vida das *Neorickettsias*, endossimbiontes de trematódeos digenéticos - reservatórios naturais e vetores, envolvem a reprodução sexuada em hospedeiro definitivo vertebrado - pássaros e ou morcegos insetívoros e reprodução assexuada em hospedeiro intermediário - caramujos dulceaquícolas são os primeiros e insetos aquáticos os segundos (Gibson *et al.*, 2005). Equinos em geral são suscetíveis à doença, que, por

sua vez, manifesta-se de forma mais grave em animais transportados para áreas endêmicas, se comparados àqueles nascidos nestes ambientes (Atwill *et al.*, 1992; Dutra *et al.*, 2001). Cavalos são considerados hospedeiros acidentais, adquirindo a infecção horizontalmente ao ingerir insetos aquáticos contendo trematódeos e metacercárias infestadas com a *N. risticii*, ou mesmo as formas livres de cercárias na água (Vaughan; Tkach; Greiman, 2012).

2.2.1 Sinais clínicos e patogenia

Dentre os sinais clínicos manifestados em cavalos naturalmente infectados estão diarreia, febre, anorexia, letargia (depressão) e cólica, podendo evoluir para laminite e/ou aborto em éguas prenhes, conforme Bertin *et al.* (2013), implicando desta forma em grandes perdas econômicas (Rikihisa, 1985; Rikihisa, 2004). Uma vez no trato gastrointestinal do cavalo, as *Neorickettsia* spp. invadem leucócitos, principalmente monócitos circulantes, macrófagos teciduais, mastócitos e células epiteliais das criptas intestinais, onde ocorre a multiplicação do agente (Rikihisa *et al.*, 1985), induzindo a exfoliação da mucosa colônica, cuja plena funcionalidade faz-se necessária para que ocorra a adequada reabsorção de Sódio e Cloreto (Ruby *et al.*, 2009). O comprometimento desta reabsorção desencadeia um mecanismo bem estabelecido de diarreia em cavalos (Sanchez, 2018; Rikihisa *et al.*, 1992). Uma vez que desequilíbrios hidroeletrolíticos e ácido-base podem ser agravantes em equinos com doença gastrointestinal grave (Marques, 1990), a detecção das alterações do equilíbrio ácido-base dos fluidos orgânicos é feita através da hemogasometria, considerado o método mais adequado (Luna, 1994). Ao considerar o trato gastrointestinal e fígado como componentes-chave do sistema digestivo equino, a análise hematológica e bioquímica torna-se útil na identificação da disfunção orgânica, no estreitamento do diagnóstico diferencial e, em muitos casos, monitoramento do progresso e resposta ao tratamento empregado (Denotta; Divers, 2020).

Ceco e cólon maior abrigam normalmente as lesões mais graves do trato gastrointestinal (Uzal; Plattner; Hostetter, 2016), apresentando áreas de hiperemia, hemorragias petequiais e úlceras pontuais (Cordes *et al.*, 1986; Dutra *et al.*, 2001). O conteúdo é aguado comumente, malcheiroso e marrom, descrevendo-se também o aumento dos linfonodos. Alterações semelhantes, embora incomuns, menos consistentes e severas podem ser detectadas no intestino delgado. Além disso, ocasionalmente observa-se ulceração gástrica, vesículas orais e laminite em alguns pacientes (Cordes *et al.*, 1986; Uzal; Plattner; Hostetter, 2016). Outras lesões, como

congestão pulmonar e edema podem ocorrer, o que se acredita ser secundário à endotoxemia (Uzal; Plattner; Hostetter, 2016).

Com relação às alterações histológicas, os achados mais expressivos ocorrem principalmente no intestino grosso e, em menor grau, no intestino delgado, de acordo com Uzal, Plattner e Hostetter (2016). Observa-se a perda e necrose do epitélio superficial, bem como criptas necróticas e/ou preenchidas por células inflamatórias e restos celulares (Baird; Arroyo, 2013; Cordes *et al.*, 1986; Dutra *et al.*, 2001). Segundo Cordes *et al.* (1986) um intenso infiltrado de células inflamatórias mistas, com predominância de células linfóides na lâmina própria que atinge a submucosa são comumente encontrados. Cordes *et al.* (1986) e Dutra *et al.* (2001) descrevem a presença de fios de fibrina, detritos e células inflamatórias degeneradas na lâmina própria e/ou sobrepostas à mucosa, bem como a severa congestão e hemorragias da mucosa nas áreas hiperêmicas detectadas macroscopicamente. Através de microscopia eletrônica as bactérias são detectadas como corpos elementares ou mórulas dentro do citoplasma de células epiteliais, macrófagos e mastócitos, principalmente do cólon maior (Cordes *et al.*, 1986; Uzal; Plattner; Hostetter, 2016; Rikihisa *et al.*, 1985).

Sinais clínicos, achados macroscópicos e histológicos podem ser sugestivos de NE, especialmente se organismos compatíveis forem detectados por manchas de prata em cortes histológicos (Uzal; Diab, 2015). No entanto, outros agentes, como *Salmonella* spp. e *Clostridium* spp. poderiam ter apresentação clinicopatológica semelhante e manchas de prata podem ser difíceis de interpretar em alguns casos (observações inéditas dos autores). Portanto, tornam-se necessários testes auxiliares apropriados para descartar outras causas de enterocolite.

2.2.2 Achados bioquímicos e histológicos

Casos foram confirmados no Sul do Brasil, em propriedades próximas às Lagoas Mirim e Mangueira, municípios de Santa Vitória do Palmar, Rio Grande e Arroio Grande (Coimbra *et al.*, 1999; Dutra *et al.*, 2001). Portanto, a epidemiologia da NE tem sido investigada no estado desde 1999 (Dutra *et al.*, 2001; Coimbra *et al.*, 2003; Coimbra *et al.*, 2010). Ensaio sorológico detectaram o DNA da *N. risticii* em cavalos (Dutra *et al.*, 2001), e, posteriormente Coimbra *et al.* (2003) conduziram a identificação de caramujos do gênero *Heleobia* que albergavam cercarias do tipo *Parapleurolophocercous cercariae* como portadores de *N. risticii* por meio de diagnóstico molecular. Coimbra *et al.* (2005) identificaram três espécies de caracóis

do gênero *Heleobia* (*H. piscium*, *H. parchappei* e *H. davisii*), posteriormente resultando como positivos para *N. risticii* gastrópodes, trematódeos e cavalos naturalmente infectados (Coimbra *et al.*, 2006).

Segundo Dutta, Vemulapalli e Biswas (1998), a doença foi originalmente reconhecida em 1979 às margens do rio Potomac, em Maryland (USA), e desde então também diagnosticada Canadá, reconhecida na Europa e outras partes do mundo, incluindo América do Sul (Arroyo *et al.*, 2021; Palmer, 1993; Paulino, 2020; Rikihisa, 1991). Cicuttin *et al.* (2013; 2017), detectaram a presença de *N. risticii* através de diagnóstico molecular em morcegos *Tadarida brasiliensis* do Brasil e Argentina, e pesquisas atuais também em Buenos Aires, Argentina, identificaram *Oligoryzomys flavescens* (1.2%) como positivo pelo PCR para o fragmento 16S rRNA da família Anaplasmataceae e a sequência apresentou 99.7% de identidade com a *Neorickettsia risticii* (Cicuttin *et al.*, 2022). No Brasil, estudos sorológicos indicaram a circulação do agente em outros estados brasileiros, como Paraná (Marutani; Headley; Bracarense, 2019) e região Sudeste do país (Ferrão *et al.*, 2007; Roier *et al.*, 2016; Moreira *et al.*, 2013). Paulino *et al.* (2020) reportaram a presença do DNA da *N. risticii* em cavalos no estado do Rio de Janeiro, disponibilizaram as sequências genéticas no GenBank™, e avaliaram a heterogenicidade a partir da diversidade filogenética do 16S rDNA da *N. risticii*.

2.2.3 Diagnóstico e tratamento

A doença foi reproduzida experimentalmente por diferentes meios, incluindo ingestão oral de trematódeos e insetos, inoculação intravenosa de monócitos infectados, e inoculação subcutânea ou intravenosa da bactéria (Dutta *et al.*, 1988; Holland *et al.*, 1985; Madigan *et al.*, 2000; Pusterla *et al.*, 2000).

De acordo com Teymournejad *et al.* (2020) e Mott *et al.* (1997) o cultivo celular de *Neorickettsia* spp. isoladas de cavalos acometidos pela Neorickettsiose Equina proporciona um diagnóstico altamente sensível e definitivo. No entanto, o isolamento desse agente em cultivo celular pode levar dias a semanas, tornando esse processo menos prático e viável (Thirumalapura *et al.*, 2023). Recentemente uma nova espécie, nomeada *Neorickettsia findlayensis* foi isolada de cavalos portadores da doença (Teymournejad *et al.*, 2020). Devido a restrições técnicas, econômicas e de tempo, o método de diagnóstico mais utilizado é Nested PCR, que detecta *N. risticii* e *N. findlayensis*, conforme Teymournejad *et al.* (2020) e Mott *et al.* (1997) ou *N. risticii* PCR em tempo real (PCR quantitativo) de acordo com Pusterla *et al.* (2000), em que

ambos os testes são baseados na sequência da *Neorickettsia* 16S rRNA, ou mesmo a sorologia (microscopia por imunofluorescência indireta, utilizando como antígenos as células P388D1, infectadas por *N. risticii* e *N. findlayensis* (Teymournejad *et al.*, 2020; Mott *et al.*, 1997; Pretzman *et al.*, 1987)).

Conforme Bertin *et al.* (2013) e Biswas *et al.* (1991), a confirmação do diagnóstico de NE é feito via PCR de amostras de fezes, conteúdo intestinal, *buffy coat* ou mesmo sangue total. A sensibilidade do Nested PCR na detecção da *N. risticii* por amostras de sangue ou fezes tem sido comparada ao cultivo celular, tornando-se o teste mais conveniente e rápido para o diagnóstico preciso de uma infecção ativa, uma vez que um resultado positivo de PCR à *N. risticii* indica a presença de DNA do agente na amostra, e, um animal com sinais clínicos compatíveis, confirma o diagnóstico (Mott *et al.*, 1997). Os autores salientam que apesar de baixo, o risco de resultados falso-positivos em condições ideais de laboratório existe, sendo, portanto, recomendado o uso de ambiente estéril, ponteiras com filtro e controle negativo adequado em cada corrida de PCR. Um marcador de tamanho de DNA e um produto amplificado devem ser incluídos como controles positivos em cada corrida de gel de agarose para determinação precisa do tamanho do produto, contribuindo na prevenção de um resultado de teste de PCR falso-negativo devido à falha de reagente ou equipamento.

A sorologia por ensaio de imunofluorescência indireta de anticorpos pode ser útil para diagnóstico ante mortem, embora a cinética de produção de anticorpos seja muito variável e influenciada pela vacinação (Baird; Arroyo, 2013; McKenzie *et al.*, 2019; Palmer; Whitlock; Benson, 1986). No entanto, de acordo com Baird e Arroyo (2013) um aumento de título de 4 vezes em 3-4 semanas torna-se relevante com relação ao diagnóstico. Segundo os mesmos autores, devido à expansão da vacinação, os testes sorológicos podem ser comprometidos, a menos que novos testes sejam capazes de distinguir a exposição natural ao agente da exposição via vacinação. Portanto, a sorologia não é considerada uma técnica direta para o diagnóstico, uma vez que cavalos infectados apresentam um aumento rápido nos títulos de anticorpos, que usualmente começa antes do aparecimento dos sinais clínicos. Além disso, títulos altos persistem comumente por mais de um ano depois da exposição inicial (Mott *et al.*, 1997), impossibilitando a distinção de casos agudos para casos de exposição antiga.

De acordo com Rikihisa *et al.* (2002) a eficácia das vacinas de células inteiras inativadas é discutível, uma vez que aquelas disponíveis comercialmente (*N. risticii*-based bacterina) proporcionam limitada ou nenhuma proteção, já que a enfermidade acontece mesmo em cavalos imunizados. Esta falha vacinal atribui-se à resposta imunológica insuficiente e variantes antigênicas (Chaichanasiriwithaya *et al.*, 1994; Palmer, 1989; Rikihisa, 2020; Rikihisa, 2022).

Segundo Atwill, Mohammed e Lopez (1996), apesar do amplo conhecimento sobre os efeitos negativos causados aos plantéis, apenas uma pequena proporção dos acometidos por NE tem acesso ao diagnóstico e tratamento adequado, fazendo com que a demora no início da intervenção terapêutica seja um fator decisivo para a sobrevivência dos animais (Palmer, 1989). O reconhecimento e tratamento precoce dos sinais considera-se a principal chave para minimizar os impactos causados pela doença, que, segundo Dutra *et al.* (2001) e Coimbra *et al.* (2006) não apresenta potencial risco zoonótico.

O tratamento mais eficaz conhecido para a NE baseia-se na administração de Oxitetraciclina IV, 6.6mg/kg a cada 12 horas durante os estágios iniciais da manifestação clínica (Rikihisa, 2004), quando normalmente ocorre uma resposta satisfatória (Rikihisa *et al.*, 2022). De acordo com Palmer (1992) observa-se melhora do quadro nas primeiras 12 horas de tratamento, incluindo diminuição da temperatura retal, aumento de atitude e apetite e retorno da motilidade intestinal. Os sinais clínicos são frequentemente resolvidos de 3 a 5 dias, acrescenta Heller *et al.* (2004). Caso essa intervenção terapêutica precoce não ocorra, o curso da NE pode durar de 05 a 10 dias, com uma taxa de mortalidade estimada de 17 a 36% (Palmer, 1989). Heller *et al.* (2004) afirma que o tratamento de suporte, tal como fluído endovenoso e drogas anti-inflamatórias não esteroidais devem ser instituídas em caso de desenvolvimento de diarreia, assim como os sinais de laminite, que devem ser observados e tratados apropriadamente.

Considerando as evidências epidemiológicas e distribuição mundial da NE, sugere-se que ainda seja subdiagnosticada no Brasil, reforçando a necessidade de investigação rotineira de enterocolites equinas. Ainda assim, é apontada como um fator limitante na criação de cavalos Crioulos em algumas regiões devido ao prejuízo econômico com tratamentos e morte de animais (Coimbra *et al.*, 2003; Dutra *et al.*, 2001). O presente estudo busca esclarecer e comparar a sintomatologia clínica e parâmetros laboratoriais de animais positivos à NE, a fim de estabelecer fatores

preditivos à sobrevivência daqueles acometidos por essa doença, que possam auxiliar no diagnóstico precoce e ou diferencial de outras enfermidades. Portanto, através deste, descrevemos e discutimos os achados clínicos e laboratoriais da Neorickettsiose Equina em pacientes positivos à enfermidade, bem como fazemos o relato dos primeiros sequenciamentos genéticos de *N. risticii* no Rio Grande do Sul – Brasil. Além disso, uma vez que a relação filogenética da *N. risticii* na população equina do sul do Brasil parece ser um aspecto muito importante na compreensão de sua epidemiologia, realizou-se a descrição do sequenciamento genético do agente através da análise de um fragmento do gene 16S rRNA, a fim de comparar as sequências obtidas com aquelas apresentadas previamente no GenBank™. O estudo das relações filogenéticas foi iniciado, buscando aprimorar o entendimento atual sobre a distribuição e heterogenicidade do agente, direcionando pesquisas vindouras, estabelecendo diretrizes para o futuro isolamento dessa bactéria.

2.2.4 Sequenciamento genético

As técnicas moleculares são consideradas ferramentas que suprem as limitações das técnicas convencionais de diagnóstico, identificação e diferenciação de microrganismos (Gasser, 2006). Nesse contexto, a PCR é tida como método de diagnóstico capaz de identificar o agente envolvido na infecção por espécie ou mesmo de subespécie (Martin *et al.*, 2005). Sendo assim, o sequenciamento genético é frequentemente utilizado no desenvolvimento de estudos sobre caracterização genotípica de microrganismos, preferencialmente de genes que mantêm alto grau de conservação dentro do gênero avaliado e que apresentem sequências de nucleotídeos longas. Na realização de estudos evolutivos sobre parasitos do gênero Ehrlichia tem sido frequentemente utilizadas sequências do gene 16S rRNA (Carret *et al.*, 1999; Allsopp; Allsopp, 2007), que, segundo Stackebrandt e Goebel (1994) é amplamente utilizado para diagnóstico de doenças bacterianas. Além disso, a sequência de rDNA 16S é altamente conservada, o que permite a criação de um perfil bacteriano que aumenta a compreensão da relação entre a divergência genética e distribuição geográfica de *N. risticii*.

Pesquisas recentes reportam o isolamento de uma nova espécie de Neorickettsia - *N. findlayensis*, causadora de enfermidade semelhante à NE em cavalos da região leste de Ontario, Canadá (Teymournejad *et al.*, 2020). Segundo os autores, quando inoculada experimentalmente, a *N. findlayensis* Fin17 demonstrou-se capaz de infectar cavalos, causando NE ou mesmo a manifestação subclínica da

enfermidade; filogeneticamente é considerada mais divergente da *N. risticii* do que a *N. sennetsu*, responsável pela Neorickettsiose Sennetsu em humanos.

3 Artigos

3.1 Artigo 1

Parâmetros clínicos e hematológicos de cavalos da Raça Crioula com Neorickettsiose Equina no Sul do Brasil

Juliana Garcia da Silva, Luiz Filipe Damé Schuch, Rodrigo Casquero Cunha, Kauê
Rodríguez Martins, Carlos Eduardo Wayne Nogueira, Karina Goularte, Mário Carlos
Araújo Meireles

Será submetido à Revista Brasileira de Microbiologia

Parâmetros clínicos e hematológicos de cavalos da Raça Crioula com Neorickettsiose Equina no Sul do Brasil¹

Juliana Garcia da Silva^{1*}; Luiz Filipe Damé Schuch¹²; Rodrigo Casquero Cunha¹; Kauê Rodriguez Martins¹; Carlos Eduardo Wayne Nogueira¹; Karina Goularte¹; Mário Carlos Araújo Meireles¹

¹ Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas CEP 96160-000, Rio Grande do Sul, Brazil.

²E-mail: – lfdschuch@gmail.com

³E-mail: meireles@ufpel.edu.br

*Corresponding author. E-mail: jugarsilva@gmail.com

Resumo

A Neorickettsiose equina (NE), severa doença diarreica febril, é considerada uma enfermidade sistêmica aguda e potencialmente fatal cujo agente etiológico é *Neorickettsia (Ehrlichia) risticii*, bactéria endossimbionte de trematódeos digenéticos, de ocorrência confirmada no Brasil. O estudo do comportamento clínico e hematológico de cavalos naturalmente infectados por *N. risticii* faz-se necessário, uma vez que o reconhecimento precoce desses padrões pode ser preditivo a sobrevivência dos animais acometidos. **Metodologia:** Foram analisados os quadros clínicos com descrição de achados hematológicos, bioquímicos e histológicos de equinos admitidos no HCV-UFPel, entre fevereiro de 2022 a março de 2023, com sintomatologia compatível à NE, tendo como principal critério de inclusão um teste PCR com amplificação de um fragmento de 529 pb realizado utilizando DNA genômico (Gdna) sanguíneo de cada animal. **Resultados:** Os parâmetros clínicos que apresentaram alterações relevantes foram a diarreia e desidratação, presentes na totalidade de casos (4/4), além de sinais de febre e pulso digital nos membros de 50% (2/4) dos pacientes. Alterações hematológicas ocorreram em 50% (2/4) dos casos, como o aumento de hemácias, hemoglobina e hematócrito, bem como leucopenia e neutropenia. No exame bioquímico do soro sanguíneo a Creatina, ureia (azotemia) e GGT apresentaram-se elevadas em 100% (4/4) dos animais, fosfatase alcalina e AST em 75% (3/4) e 50% (2/4), respectivamente, enquanto 75% (3/4) dos casos positivos tiveram aumento nos níveis de fibrinogênio. Ataxia foi observada em um dos cavalos positivos. **Conclusões e Importância clínica:** Os resultados confirmam a circulação do agente no extremo Sul do Brasil e a análise dos parâmetros clínicos e hematológicos reforça a necessidade de aprimorar a pesquisa quanto ao comparativo desses achados, a fim de estabelecer um critério de avaliação laboratorial associado com manifestações clínicas, que possa acelerar o diagnóstico e início do tratamento, objetivando minimizar o impacto econômico que ocorre em regiões endêmicas à enfermidade.

Palavras-chave: Neorickettsiose equina; *Neorickettsia risticii*.

¹ Será submetido à "Revista Brasileira de Microbiologia".

Clinical and hematological parameters of Creole horses with Equine Neorickettsiosis in Southern Brazil

Abstract

Equine Neorickettsiosis (EN), a severe febrile diarrheal disease, is considered an acute systemic illness which is potentially fatal. Its etiologic agent is *Neorickettsia (Ehrlichia) risticii*, an endosymbiont of digenean trematodes whose occurrence has been confirmed in Brazil. The study of the clinical and hematological behavior of horses naturally infected by *N. risticii* is necessary, since the early identification of such patterns can be predictive for the survival of affected animals. **Methodology:** Analysis was conducted with horses admitted to the HCV-UFPel between February 2022 and March 2023, which had description of hematological, biochemical, and histological findings in their clinical conditions, and symptoms compatible with EN. The main inclusion criterion was a nested PCR with amplification of a 529 bp fragment carried out using blood genomic DNA (Gdna) of each animal. **Results:** The clinical parameters showing relevant alterations were diarrhea and dehydration, present in all cases (4/4), in addition to signs of fever and digital pulse in the limbs of 50% of the patients (2/4). Hematological alterations occurred in 50% of cases (2/4), such as increased red blood cells, hemoglobin, and hematocrit, as well as leukopenia and neutropenia. In the biochemical examination of blood serum, Creatine, urea (azotemia) and GGT were found elevated in 100% of the animals (4/4); alkaline phosphatase and AST in 75% (3/4) and 50% (2/4), respectively; and 75% of positive cases (3/4) showed raised Fibrinogen levels. Ataxia was observed in one of the positive horses. **Conclusions and Clinical importance:** Results confirm the circulation of this agent in the extreme south of Brazil. The analysis of clinical and hematological parameters reinforces the need to improve research regarding the comparison of these findings, in order to establish a laboratory evaluation standard associated with clinical manifestations. Once the diagnosis and initiation of treatment is accelerated, the economic impact in endemic regions shall be minimized.

Keywords: Equine neorickettsiose; *Neorickettsia risticii*.

Introdução

Segundo Rikihisa (2004) a Neorickettsiose equina (NE) trata-se de uma enterotifocolite potencialmente fatal, causada por uma bactéria gram negativa intracelular obrigatória chamada *Neorickettsia risticii* (anteriormente *Ehrlichia risticii*) (Dutta *et al.*, 1985; Holland *et al.*, 1985). De acordo com Greiman (2013), as *Neorickettsias* são endossimbiontes de trematódeos digenéticos e apresentam um complexo ciclo de vida, contaminando cavalos - hospedeiros acidentais, durante o pastoreio através da ingestão de insetos aquáticos, portadores de metacercárias infectadas ou cercárias de trematódeos de vida livre (Vaughan; Tkach; Greiman, 2012).

Portanto, animais residentes próximo a aguadas são mais suscetíveis a essa doença, que possui sazonalidade definida pelos meses mais quentes e úmidos (Madigan, 2000). A enfermidade já foi identificada nas Américas do Norte, do Sul, e Europa (Rikihisa, 1991; Palmer, 1993; Paulino, 2020; Arroyo *et al.*, 2021), e é relatada como a principal causa de diarreia em cavalos não estabulados no Rio Grande do Sul, com casos confirmados em propriedades nos municípios de Santa Vitória do Palmar, Rio Grande e Arroio Grande, próximas as Lagoas Mirim e Mangueira (Coimbra *et al.*, 1999; Dutra *et al.*, 2001). Equinos em geral são suscetíveis, e a manifestação ocorre de forma mais grave em animais transportados para áreas endêmicas em comparação àqueles nascidos nestes ambientes (Atwill *et al.*, 1992; Dutra *et al.*, 2001).

Dentre os sinais clínicos observados em cavalos naturalmente infectados estão diarreia aquosa, desidratação, febre, anorexia, letargia (depressão) e cólica, podendo evoluir para laminite e/ou aborto em éguas prenhes (Bertin *et al.*, 2013), o que implica em grandes perdas econômicas (Rikihisa, 1985; Rikihisa, 2004). Rikihisa *et al.* (1985) afirma que, uma vez no trato gastrointestinal do cavalo, as *Neorickettsia* spp. invadem leucócitos e células epiteliais das criptas intestinais, onde ocorre a multiplicação do agente, induzindo a exfoliação da mucosa colônica, comprometendo a reabsorção de sódio e cloreto (Ruby *et al.*, 2009), o que desencadeia um mecanismo bem estabelecido de diarreia em cavalos (Rikihisa *et al.*, 1992; Sanchez, 2018).

Ao considerar o trato gastrointestinal e fígado como componentes-chave do sistema digestivo equino, a análise hematológica e bioquímica torna-se útil na identificação da disfunção orgânica, no estreitamento do diagnóstico diferencial e, em muitos casos, monitoramento do progresso e resposta ao tratamento empregado (Denotta; Divers, 2020). Em casos de NE, as alterações macro e microscópicas mais graves do trato gastrointestinal normalmente estão abrigadas no ceco e cólon maior (Uzal; Plattner; Hostetter, 2016), sendo possível a detecção de lesões semelhantes, porém menos consistentes e severas no intestino delgado. O conteúdo comumente é aguado, mal cheiroso e marrom. Alguns pacientes desenvolvem lesões como laminite, congestão e edema pulmonar (Cordes *et al.*, 1986; Uzal; Plattner; Hostetter, 2016) secundárias à endotoxemia (Uzal; Plattner; Hostetter, 2016).

O cultivo celular de *Neorickettsia* spp. isolada de cavalos acometidos pela Neorickettsiose Equina proporciona um diagnóstico altamente sensível e definitivo (Mott *et al.*, 1997; Teymournejad *et al.*, 2020). Contudo, devido a restrições técnicas, econômicas e de tempo, o método mais utilizado é o Nested PCR, que detecta *N. risticii* (Teymournejad *et al.*, 2020). O tratamento indicado baseia-se na administração

de Oxitetraciclina IV, 6.6 mg/kg a cada 12 horas durante os estágios iniciais da manifestação clínica (Rikihisa, 2004), quando normalmente ocorre uma resposta satisfatória (Rikihisa *et al.*, 2022).

Considerando a importância da NE em áreas endêmicas devido à severidade, custo do tratamento e alta taxa de mortalidade em animais que desenvolvem laminite secundária (Oke, 2019), e frente ao potencial impacto econômico gerado, trabalha-se com a hipótese da existência de padrões clínicos e laboratoriais em animais positivos à *N. risticii*, sem histórico de imunização prévia, que podem ser preditivos e relacionados à sobrevivência de cavalos diagnosticados com NE. Assim, o objetivo do presente estudo foi descrever e comparar os parâmetros clínicos e hematológicos de equinos com NE atendidos no HCV-UFPel a fim de antecipar o diagnóstico e direcionar a conduta terapêutica dos animais acometidos com a doença.

Materiais e Métodos

Para atender ao objetivo da pesquisa, foi utilizada uma análise casuística de cavalos sintomáticos em atendimento na região Sul do Rio Grande do Sul (RS). No período compreendido entre fevereiro de 2022 a março de 2023, foram submetidas a diagnóstico biomolecular amostras de sangue de equinos internados no Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal de Pelotas (HCV-UFPel) sob suspeita de Neorickettsiose equina (n=10). Os cavalos residiam na região sul do RS, Brasil, nos municípios de Rio Grande (a) e Arroio Grande (b), próximos à Lagoa Mirim (Fig. 1).

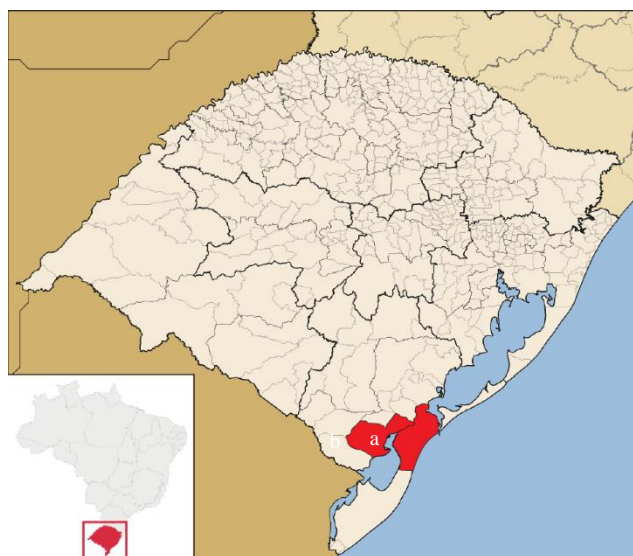


Figura 1. Localização dos 04 casos de Neorickettsiose equina confirmados no Laboratório de Biologia Molecular Veterinária – LaBMol-Vet, UFPel (Rio Grande do Sul, Brasil).

Os critérios de inclusão basearam-se em animais que apresentaram quadro clínico compatível com a doença, registro detalhado de anamnese, presença de exames complementares anexados e resultado positivo à PCR específico para *N.*

risticii. Aqueles pacientes com dados incompletos foram desconsiderados, mas seguiram hospitalizados e em tratamento.

Para a coleta das amostras foram utilizados tubos contendo EDTA. Foram coletados 5,0 ml de sangue de cada cavalo no dia da chegada (considerado dia zero), mantidos sob refrigeração até seu processamento no laboratório, visando a extração do DNA. Também foram coletados os dados referentes a situação clínica do paciente, data do início dos sintomas, *status* vacinal, localização e histórico epidemiológico da propriedade. Além disso, realizou-se avaliação clínica na chegada ao Hospital, assim como exames complementares, tais como Ultrassonografia abdominal, Hemograma, Leucograma, Bioquímico, Hemogasometria e Análises Plasmáticas, realizados no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária (LPCVet) - UFPel.

A análise dos dados laboratoriais foi realizada com base em valores fisiológicos de cavalos saudáveis, posteriormente comparados com os padrões observados previamente em animais com diagnóstico confirmado da doença. A presença de Laminite foi avaliada segundo a Escala Obel (graus de 1 a 4), com aumento subjetivo de pressão arterial no pulso; enquanto a confirmação do quadro foi feita através de radiografia do membro afetado.

Um dos animais analisados não foi responsivo ao tratamento adotado e, por isso, foi submetido à eutanásia e necropsia. Nesse caso, amostras de órgãos das cavidades abdominal e torácica, tais como fragmentos de intestino, estômago, coração, pulmão, baço, fígado e rim foram coletadas e fixadas em formol tamponado a 10% e posteriormente enviadas para estudo histológico no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), no Rio Grande do Sul (RS).

O diagnóstico molecular das amostras foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular Veterinária – LaBMol-Vet, situado na Universidade Federal de Pelotas (UFPel) RS/Brasil. O DNA genômico foi extraído com Brazol[®] das amostras de sangue, seguindo instruções do fabricante. A quantificação das amostras foi feita através de espectrofotometria, utilizando Nanodrop Lite (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), e a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) foi a técnica de diagnóstico empregada, visando amplificar uma porção de 529pb do gene que codifica para o fragmento 16S do RNA-ribossômico da *N. risticii*, em duas etapas (Nested PCR), conforme descrito por Barlough *et al.* (1997), com os Primers: ER-3b ATTTGAGAGTTTGATCCTGG, ER-2c GTTTTAAATGCAGTTCTTGG; e ER-3a CTAGCGGTAGGCTTAAC, ER-2a CACACCTAACTTACGGG. Água livre de nuclease foi utilizada como controle negativo, e o estudo procedeu-se sem o uso de controle positivo, confirmando o diagnóstico através do sequenciamento genético das amostras amplificadas.

O tratamento dos animais baseou-se em antibioticoterapia, terapia de suporte à sintomatologia clínica apresentada inicialmente com fluidoterapia, analgesia e, conforme o avanço dos quadros, intensificação dos cuidados específicos a cada paciente com a indução profilática de hipotermia digital através do uso da crioterapia nos casos clínicos com risco de desenvolvimento de laminite associada à sepse (Van Eps, 2010).

Resultados

Do total de dez animais avaliados, quatro se enquadraram nos critérios estabelecidos e, portanto, entraram no estudo, com idades entre 05 e 09 anos, e peso variando de 390 a 490 kg. Os meses de maior incidência dos casos com diagnóstico positivo foram março (75%) e fevereiro (25%). O uso de vacinas específicas anteriormente ao estudo não foi relatado, e com relação ao sexo, três eram fêmeas (75%), e um macho (25%), todos da raça Crioula. Os sinais clínicos mais comuns apresentados no exame físico na chegada ao Hospital incluíram diarreia e desidratação (100%), febre, estado de alerta e apetite mantidos em 50% dos casos. Pulso digital nos membros ao chegar foi detectado em 25% dos casos, enquanto outros 25% desenvolveram o quadro durante a internação. Ataxia foi sintoma presente em um dos casos (Tabela 1).

Tabela 1. Sinais clínicos apresentados pelos 4 animais na chegada no hospital veterinário.

Sinais clínicos	Cavalo 1	Cavalo 2	Cavalo 3	Cavalo 4
Temperatura		39,3	37,9	38,8
Diarreia	SIM	SIM	SIM	SIM
Desidratação	SIM	SIM	NÃO	SIM
Conteúdo líquido no cólon	SIM	SIM	NÃO	NÃO
Motilidade intestinal	Hiper	Normal	Normal	Ausente
Anorexia	NÃO	NÃO	NÃO	SIM
Depressão	NÃO	NÃO	NÃO	
Pulso digital	NÃO	NÃO	SIM	SIM
Outros	-	Ataxia		Sudorese intensa, mucosas congestas (oral: halo cianótico)

Revelou-se no Hemograma que 50% apresentaram hemácias, hemoglobina e hematócrito elevados. Com relação ao Leucograma, 50% demonstraram leucopenia e neutropenia, ocorrendo um aumento desses níveis no decorrer dos dias, enquanto 25% dos casos demonstraram leucocitose e neutrofilia no momento da chegada ao Hospital. As anormalidades mais comumente encontradas no exame bioquímico do soro sanguíneo foram creatina, ureia (azotemia) e gama glutamil transferase (GGT) elevado em 100% dos animais, fosfatase alcalina e aspartato aminotransferase (AST) em 75% e 50% dos casos, respectivamente. As alterações de maior relevância na Hemogasometria, avaliada em 03 dos 04 pacientes estudados foram a hiponatremia em 66,67% (2/3), hipocloremia, hipercalemia em 33,33% (1/3), e um anion gap abaixo dos parâmetros de referência em 66,67% (2/3) dos casos e acima em 33,33% (1/3). As análises plasmáticas revelaram que 75% (3/4) dos casos positivos tiveram aumento nos níveis de fibrinogênio (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados dos exames bioquímico, hemograma, leucograma, análise plasmática, hemogasometria e de hemoparasitas dos 4 animais do estudo no dia que chegaram no hospital veterinário.

Exame	Parâmetros	Cavalo 1	Cavalo 2	Cavalo 3	Cavalo 4	Referência*
Bioquímico*	AST (TGO) (UI/L)	176,6	338,0	626,0	330,6	226 – 366
	Creatinina (mg/dL)	2,3	4,4	1,0	5,5	1,2 - 1,9
	Ureia (mg/dL)	161,1	165,5	116,3	98,8	21,4 - 51,36
	Albumina (g/dL)	2,17	3,15	2,3	2,98	2,6 - 3,7
	Fosfatase alcalina (UI/L)	256,4	560,4	270,7	519,8	143 – 395
	GGT (UI/L)	2,5	16,7	16,8	16,4	4,3 - 13,4
Hemograma**	Hemácias (milhões/ul)	7,5	15,9	9,9	14,7	6,8 - 12,9
	Hemoglobina (g/dL)	11,0	22,7	16,0	22,2	11 – 19
	Hematócrito (%)	30,8	66,7	45,6	65,4	32 – 53
	RDW (%)	19,4	21,2	17,8	19,2	24 – 27
Leucograma	Leucócitos Totais (uL)	19.000	4.000	5.300	10.200	5.400 - 14.300
	Segmentados (/uL)	15.580	3.120	3.339	7.446	2.260 - 8.580
	Linfócitos (/uL)	3.040	720	1.802	2.550	1.500 - 7.700
Análise plasmática	Fibrinogênio (mg/dL)	400	800	400	100	100 – 400
Hemogasometria	Na (mmol/L)	-	131,4	124,1	135,9	132 – 146
	Cl (mmol/L)	-	96,2	91,8	98	96 – 102
	iCa (mmol/L)	-	1,184	1,374	1,538	-
	K (mmol/L)	-	3,37	2,69	5,37	2,4 a 4,7
	AG (mmol/L)	-	15,6	2,69	5,37	6 – 14
Hemoparasitas		Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	-

*Tabela de Referência (Bioquímico): Kaneko (2008).

**Tabela de Referência (Hemograma): Schalm (2010).

Na necropsia do cavalo eutanasiado foi encontrada repleção de líquido e uma porção do cólon com mucosa de coloração enegrecida observadas no intestino grosso, enquanto o intestino delgado apresentou-se sem alterações na avaliação e intacto ao corte, assim como as demais estruturas do sistema digestivo, morfológicamente inalteradas. O fígado encontrava-se difusamente amarelo pálido, enquanto os rins estavam com formato e coloração normais, envoltos por grande volume adiposo e friáveis ao corte.

O exame histopatológico das amostras desse animal revelou no intestino grosso a presença de edema segmentar multifocal acentuado. O intestino delgado apresentou acentuada perda de vilosidades e criptas com grave necrose e inflamação da mucosa, composta por linfócitos, plasmócitos, macrófagos e eosinófilos (em menor quantidade), bem como acúmulo de fibrina e debris em sua superfície, compatível com enterite fibrinonecrótica segmentar acentuada. Em grau mais leve, edema e infiltrado inflamatório foram igualmente observados na submucosa e serosa.

O mesentério por sua vez apresentava vasos linfáticos dilatados e discreto infiltrado inflamatório linfoplasmocítico, bem como nódulos de mineralização em endotélio de artérias e vênulas (*corpos intimais*). Hiperplasia de ductos biliares

multifocal leve e fibrose periportal em ponte leve foram identificadas no fígado. Observou-se inflamação linfoplasmocítica periportal discreta e leve degeneração por glicogênio nos hepatócitos. Capilares alveolares pulmonares apresentavam-se congestionados, com grande quantidade de hemácias. Alterações microscópicas não foram observadas em coração, baço, rim e estômago.

Na análise de PCR, quatro equinos apresentaram a formação de bandas de 529pb, típicas para *Neorickettsia risticii*, confirmadas por sequenciamento genético. Durante a internação, três cavalos (75%) sobreviveram à diarreia e o tempo médio de desfecho, desde a chegada ao HCV-UFPel até a alta de cada animal foi de 17,5 dias (variando entre 14 e 21 dias). Um dos cavalos (25%) não responsivo ao tratamento, foi submetido à eutanásia ao terceiro dia de internação.

Discussão

O predomínio de casos no mês de agosto, verão no Hemisfério Norte, foi descrito por Bertin *et al.* (2013), corroborando com Uzal *et al.* (2022) que reafirma o aumento de incidência entre julho e agosto. No presente estudo, assim como Dutra *et al.* (2001), que registrou o predomínio de casos em março e fevereiro, os meses de maior ocorrência dos casos com diagnóstico positivo foram março (75%) e fevereiro (25%), verão no Brasil, Hemisfério Sul. A região estudada situa-se ao redor da Lagoa Mirim, onde infecção natural em cavalos já foi descrita por Dutra *et al.* (2001), sinalizando que as áreas de baixa altitude e campos predominantemente alagadiços sejam ambientes ideais para perpetuação do agente. Essas áreas são planícies costeiras, utilizadas para o cultivo de arroz irrigado, que em geral tem a irrigação encerrada no início do mês de fevereiro, sugerindo este ser um fator de risco para a ocorrência da NE, uma vez que a identificação do patógeno em trematódeos e caramujos do gênero *Heleobia*, ambos envolvidos no ciclo da *N. risticii*, realizada por Coimbra *et al.* (2005), foi conduzida em canais de irrigação e rios da mesma região.

Uma vez que o exame físico é parte fundamental da avaliação do paciente equino acometido de distúrbios dos equilíbrios hídricos e eletrolíticos (Alves *et al.*, 2008), os sinais clínicos dos pacientes com NE foram condizentes com aqueles descritos por Knowles *et al.* (1983), especificamente um período de febre, anorexia e depressão. Segundo o autor, a laminite pode preceder, acompanhar ou mesmo continuar após o início da diarreia, e tem como principal característica a relutância em andar, com presença de pulso digital. Em pesquisa retroativa conduzida por Gomez *et al.* (2022), registrou-se a prevalência de quadro de laminite em 8% (24/298) do total de cavalos diarreicos, dos quais 22% (7/32) eram positivos para *N. Risticii*. No presente estudo, laminite foi diagnosticada em 50% dos casos, comparando-se com Shawn (2018), que encontrou até 40% dos cavalos afetados, tornando-se um fator muitas vezes determinante à eutanásia, indicada em casos de severidade ou cronicidade, uma vez que a rotação da terceira falange e descolamento do casco podem ocorrer, de acordo com Knowles *et al.* (1983).

Dentre os casos positivos para *N. Risticii* acompanhados neste estudo, 25% (1/4) não sobreviveram, semelhante aos dados de Gomez *et al.* (2022), cujo percentual de não sobreviventes foi de 28%. Em nosso estudo, 75% (1/4) dos animais positivos para *N. risticii* sobreviveram até a alta hospitalar, acordando com Gomez *et al.* (2022), que apresentou 72% de sobrevivência, coerente com relatos anteriores

apontando uma variação de 65 a 73% nas taxas de sobrevivência de cavalos com diarreia diagnosticados com *N. risticii* (Mattei, 2020; Bertin *et al.*, 2013).

Mudanças hematológicas nos estágios iniciais da NE foram observadas por Dutta *et al.* (1988) e Uzal *et al.* (2022), variando de normal à leucopenia, caracterizada por neutropenia - anormalidade hematológica inicial mais habitual e linfopenia, embora leucocitose acentuada possa ocorrer alguns dias após o início da doença, devido ao aumento de fibrinogênio na resposta de fase aguda, como resultado de inflamação das lesões causadas pelo processo patológico de *N. risticii* (Heller, 2004). Segundo DeNotta e Divers (2020), apesar de nem todos os pacientes apresentarem neutropenia, monocitose leve é uma característica comumente observada na infecção por *N. risticii* em cavalos. Estes achados reforçam os dados laboratoriais de Mulville *et al.* (1991), que demonstraram variação na fase inicial da doença, impedindo sua utilização isolada para a realização do diagnóstico definitivo.

Pacientes com condições intestinais inflamatórias agudas geralmente apresentam achados hematológicos e bioquímicos sugestivos de endotoxemia, como leucopenia caracterizada por neutropenia e contração do volume plasmático, representado pelo aumento do hematócrito e azotemia, bem como distúrbios eletrolíticos, conforme descrevem DeNotta e Divers (2020), alterações semelhantes àquelas apresentadas em nosso estudo (hiponatremia, hipocloremia e hipercalemia, além de AG também alterado). Além disso, no presente estudo identificou-se azotemia em 100% dos casos e aumento do hematócrito, hemoglobinas e neutropenia em 50%. Bertin *et al.* (2013) associaram ao possível reflexo do grau de hipovolemia a ocorrência da elevação dos níveis de hemoglobina no sangue, e DeNotta e Divers (2020) atribuíram a condição de hipovolemia por perda de fluidos gastrointestinais (desidratação) à elevação do hematócrito. Esses distúrbios resultam da inflamação intestinal e da ruptura da barreira mucosa, levando à perda de fluidos, eletrólitos e proteínas, bem como à translocação de endotoxinas e bactérias para a corrente sanguínea (Gomez *et al.*, 2013).

Paulino *et al.* (2020) afirmam que as alterações bioquímicas nos animais positivos são marcantes, no entanto, não parece haver diferença significativa quando comparados à população negativa. Uzal *et al.* (2022) por sua vez, relatam que alterações nos resultados da bioquímica sérica, incluindo hiponatremia, hipocloremia e hipoalbumemia são rotineiramente observados em cavalos diarreicos com NE, uma vez que, conforme DeNotta e Divers (2020), a ocorrência da concentração de proteína total – especialmente albumina abaixo dos valores esperados, considerando a relação da eritrocitose quanto ao grau de desidratação estimado, trata-se de uma combinação frequentemente observada em cavalos com colite aguda e indica a perda de proteínas do intestino afetado. Em nosso estudo, a diminuição dos valores de albumina e aumento do hematócrito foi identificada em 50% dos casos no momento da chegada ao HCV-UFPel.

Rikihisa *et al.* (1992) observaram a inibição da reabsorção de Sódio e Cloreto ao promover infecção experimental com *N. risticii*, o que justifica clinicamente a importância de avaliar dados como concentrações séricas destes eletrólitos, à medida que estas informações podem ser usadas para indiretamente estimar a severidade da colite em cavalos com NE. Bertin *et al.* (2013) afirma que de acordo com a severidade dos casos, determinada pelo grau de dano intestinal, os distúrbios clinicopatológicos

podem apresentar variações, comprovando ainda que a gravidade da perda de eletrólitos, hemoconcentração e azotemia pré-renal foram fatores preditores de sobrevivência nos cavalos analisados.

A elevação de creatinina, Gama Glutamil Transferase (GGT) e ureia (azotemia), bem como o aumento do hematócrito nos casos acompanhados são apontados como principais parâmetros laboratoriais indicativos de alteração renal em decorrência da desidratação e hipovolemia, causadas possivelmente pela diarreia associada à febre. Segundo Shawn (2018), estes sintomas compõem a apresentação clínica mais usual da doença, presentes em 93% dos casos.

Um dos animais analisados apresentou ataxia, manifestação condizente com os sinais clínicos de encefalopatia, causados por hiperamonemia, ocasionalmente observada em cavalos com doença gastrointestinal aguda (Dunkel *et al.*, 2011). DeNotta e Divers (2020) também relataram um caso positivo para *N. risticii*, com sintomatologia neurológica e hiperamonemia dentre os achados laboratoriais, condição que se desenvolve em um pequeno número de cavalos com doença gastrointestinal aguda, cuja magnitude pode estar relacionada a alterações do microbioma no intestino (aumento da quantidade de bactérias produtoras de amônia) e/ou aumento da permeabilidade intestinal. Segundo os autores, os sinais neurológicos se desenvolvem rapidamente e podem levar à morte em menos de 24 horas, embora alguns cavalos possam ter uma diminuição rápida (<48 horas) nas concentrações de amônia e recuperação completa se a doença intestinal primária for resolvida.

A repleção de líquido no intestino grosso identificada neste estudo sugere ligação com as alterações hematológicas encontradas nos cavalos positivos, uma vez que enteropatias frequentemente comprometem a integridade da barreira gastrointestinal, afetando o balanço hídrico, levando à mobilização de fluido intravascular para o interstício e sequestro de líquido para o intestino, condizendo com o quadro de desidratação apresentado nos animais analisados (Alves, 2015). O conteúdo líquido e a coloração enegrecida da mucosa de uma porção do cólon observados nesse estudo corroboram com os achados de Coimbra (2006), que descreveu a presença de conteúdo fecal totalmente líquido e hemorragia difusa, assim como Knowles (1983), que relatou áreas focais de congestão e conteúdo aquoso no órgão. Entretanto, o mesmo autor observou enterocolite necrótica primariamente do cólon maior e ceco, com vasculite e coagulação intravascular, enquanto Coimbra (2006) caracterizou a presença de discreto infiltrado inflamatório mononuclear na mucosa do intestino como enterite-linfo-histiocitária, com predominância de macrófagos.

De acordo com laudo emitido no exame histopatológico, edema segmentar multifocal acentuado foi constatado no intestino grosso, da mesma forma que Coimbra (2006) relatou intenso processo inflamatório com dilatação e congestão dos capilares sanguíneos e edema da submucosa, apresentando ainda nos respectivos cortes histológicos várias estruturas granulares compatíveis com *N. risticii* no interior do citoplasma de macrófagos. Apesar de não terem sido identificadas estruturas morfológicamente compatíveis com bactérias nas amostras analisadas, essa possibilidade não foi descartada, condizendo com Heller (2004), que por sua vez afirmou que em sua pesquisa nenhum patógeno aeróbico significante foi isolado de

culturas do trato gastrointestinal ou mesmo de linfonodos mesentéricos. Rikihisa *et al.* (1985), por sua vez afirma que a *N. risticii* é consistentemente encontrada nas paredes do cólon maior dos equinos que desenvolvem sinais clínicos de NE.

Os achados macroscópicos de intestino delgado no presente estudo não apontaram alterações aparentes em sua avaliação, mostrando-se intacto ao corte, diferente daqueles relatados por Coimbra (2006) e Knowles (1983), cuja presença de conteúdo líquido e muco na luz intestinal estiveram evidentes, bem como áreas hemorrágicas, congestionadas e com focos de secreção purulenta nas mucosas. No exame histopatológico do mesmo órgão, constatou-se a presença de enterite fibrinonecrotica segmentar acentuada, caracterizada pela perda de vilosidades e criptas com grave necrose e inflamação da mucosa, condizente com os achados de Heller (2004), que descreveu o embotamento e fusão das vilosidades em decorrência de enterocolite difusa, severa, erosiva e ulcerativa.

Heller (2004) também relatou a presença de lesões secundárias devido a bacteremia ou endotoxemia, tais como: infarto renal, nefrite intersticial, hepatite periportal e adrenalite. Alterações evidentes no fígado não foram encontradas por Coimbra (2006), enquanto em nosso estudo, apresentava-se com hiperplasia de ductos biliares multifocal e fibrose periportal em ponte; ambas as lesões consideradas leves e crônicas, porém sem causa definida.

A congestão de capilares alveolares encontrada em nosso estudo assemelhava-se ao achado de Knowles (1983), que descreveu o acúmulo de fluidos nos pulmões. O mesmo autor relatou depleção de tecidos linfoides em baço e gânglios linfáticos e Coimbra (2006), por sua vez corroborou com esses achados, apontando a mesma alteração histológica no baço, acrescentando ainda a degeneração centrolobular de fígado e pneumonia intersticial subaguda linfo-histiocitária multifocal com hemossiderose discreta de pulmão. Em nosso estudo, alterações microscópicas não foram observadas em coração, baço, rim e estômago.

De forma geral o PCR tornou-se o teste mais conveniente e rápido para o diagnóstico preciso de uma infecção ativa, uma vez que o Nested PCR é considerado tão sensível quanto o cultivo celular na detecção de *N. risticii* (Mott *et al.*, 1997). Um resultado positivo de PCR à *N. risticii* indica a presença de DNA do agente na amostra, e, associado aos sinais clínicos compatíveis em um animal, suporta o diagnóstico. Apesar de falsos positivos poderem ocorrer, o risco é muito baixo em condições ideais de laboratório, utilizando controle negativo adequados (Mott *et al.*, 1997). Dutra *et al.* (2001) e Stewart *et al.* (1995), entretanto, sugerem a inexistência de um padrão de referência com relação ao diagnóstico da NE, uma vez que nenhum teste *ante mortem* é considerado 100% sensível ou específico, e mudanças pós morte são frequentemente leves e inespecíficas.

Assim como Bertin *et al.* (2013), que descreveram um tempo mais curto de hospitalização para os animais não sobreviventes (33% foram eutanasiados no dia da admissão) do que os sobreviventes, que tiveram um tempo médio de hospitalização de 1-15 dias, em nosso estudo o período de internação foi menor para o animal não sobrevivente (3 dias), com relação aos sobreviventes (média de 17,5 dias). Nenhum dado epidemiológico sugeriu alguma diferença entre sobreviventes e não sobreviventes. Nenhum dos animais do estudo apresentou registro de comprovação vacinal contra a Neorickettsiose equina.

De acordo com Bertin *et al.* (2013), a administração de Oxitetraciclina aparece como indicação de parte do tratamento para cavalos que vivem em áreas endêmicas e apresentem sinais clínicos condizentes com os da NE, antes mesmo do diagnóstico. Sua utilização é baseada na eficácia comprovada por um estudo *in vitro* contra a *N. risticii* (Wells *et al.*, 1988), assim como no tratamento de cavalos naturalmente infectados (Bertin *et al.*, 2013).

Conclusão

Conclui-se que dentre os parâmetros clínicos avaliados, diarreia e desidratação, presentes na totalidade de casos foram os que apresentaram maior relevância, culminando em alterações hematológicas, como o aumento de hemácias, hemoglobina e hematócrito, bem como leucopenia e neutropenia, ambos presentes em 50% dos casos. No exame bioquímico do soro sanguíneo a Creatinina, ureia (azotemia) e GGT apresentaram-se elevadas em 100% dos animais, fosfatase alcalina e AST em 75 e 50%, respectivamente, enquanto 75% dos casos positivos apresentaram aumento nos níveis de fibrinogênio no momento da chegada ao HCV-UFPEl.

Referências

- ALVES GES (2015) Decisões críticas sobre o equino com cólica: quando encaminhá-lo para cirurgia? A cirurgia é a melhor conduta? In: SIMPÓSIO NACIONAL DE EQUINOS, 1., 2015, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária. p. 100-117.
- ALVES GES, *et al.* (2008) Fluidoterapia em equinos. *Ver. Bras. Med. Equina*, 18:14-24.
- ARROYO LG, *et al.* (2021) Potomac horse fever in Ontario: Clinical, geographic, and diagnostic aspects. *Can. Vet. J.*, 62(6):622.
- ATWILL ER, *et al.* (1992) Retrospective evaluation of factors associated with the risk of seropositivity to *Ehrlichia risticii* in horses in New York state. *Am. J. Vet. Res.*, 53(10):1931-1934.
- BARLOUGH JE, RIKIHISA Y, MADIGAN JE. (1997) Nested polymerase chain reaction for detection of *Ehrlichia risticii* genomic DNA in infected horses. *Vet. Parasitol.*, 68(4):367-373.
- BERTIN FR *et al.* (2013) Clinical and Clinicopathological Factors Associated with Survival in 44 Horses with Equine Neorickettsiosis (Potomac Horse Fever). *J. Vet. Intern. Med.*, 27(6):1528-1534.
- COIMBRA HS, *et al.* (1999). Diarreia 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, 1999, Gramado, RS. *Anais...* Gramado: v.1, 1999. p. 200.

COIMBRA HS, *et al.* (2006) Erliquiose monocítica equina no Rio Grande do Sul: aspectos clínicos, anatomopatológicos e epidemiológicos. *Pesq. Vet. Bras.*, 26(2):97-101.

CORDES DO, *et al.* (1986) Enterocolitis caused by *Ehrlichia sp.* in the horse (Potomac Horse Fever). *Vet. Pathol.*, 23(4):471-477.

DENOTTA SAL, DIVERS TJ. (2020) Clinical pathology in the adult sick horse: the gastrointestinal system and liver. *Vet. Clin.: Equine Pract.*, 36(1):105-120.

DOUGLAS JW, WARDROP KJ (Eds). (2010) Schalm's veterinary hematology. Hoboken: WILEY-BLACKWELL. p. 1456.

DUNKEL B, *et al.* (2011) Putative intestinal hyperammonemia in horses: 36 cases. *Equine Vet. J.*, 43(2): 133-40.

DUTRA F, *et al.* (2001) Equine monocytic ehrlichiosis (Potomac horse fever) in horses in Uruguay and southern Brazil. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 13(5):433-437.

DUTTA SK, *et al.* (1985) Experimental reproduction of Potomac horse fever in horses with a newly isolated Ehrlichia organism. *J. Clin. Microbiol.*, 22(2):265-269.

DUTTA SK, *et al.* (1988) Disease features in horses with induced equine monocytic ehrlichiosis (Potomac horse fever). *Am. J. Vet. Res.*, 49(10):1747-1751.

GOMEZ DE, *et al.* (2022) Acute diarrhea in horses: A multicenter Canadian retrospective study (2015 to 2019). *Can. Vet. J.*, 63:1033-1042.

GOMEZ DE, *et al.* Physiochemical interpretation of acidbase abnormalities in 54 adult horses with acute severe colitis and diarrhea. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 27, n. 3, p. 548-53, 2013.

GREIMAN SE, TKACH VV, VAUGHAN JA. (2013) Transmission rates of the bacterial endosymbiont, *Neorickettsia risticii*, during the asexual reproduction phase of its digenean host, *Plagiorchis elegans*, within naturally infected lymnaeid snails. *Parasit. Vectors*, 6(1):1-7.

HELLER MC, *et al.* (2004) Two cases of *Neorickettsia (Ehrlichia) risticii* infection in horses from Nova Scotia. *Can. Vet. J.*, 45(5):421.

HOLLAND CJ, *et al.* (1985) Isolation, experimental transmission, and characterization of causative agent of Potomac horse fever. *Sci.*, 227(4686):522-524.

KANEKO JJ, HARVEY JW, BRUSS ML (Eds). (2008) *Clinical biochemistry of domestic animals*. Massachusetts: ACADEMIC PRESS, 2008.

KNOWLES RC, *et al.* Acute equine diarrhea syndrome (AEDS): a preliminary report. In: ANNUAL CONVENTION-AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS (USA), [s. n.], 1983, Las Vegas, *Anais...* Las Vegas: [s.n.] 1983, p. 353.

MADIGAN JE, *et al.* (2000) Transmission of *Ehrlichia risticii*, the agent of Potomac horse fever, using naturally infected aquatic insects and helminth vectors: preliminary report. *Equine Vet. J.*, 32(4):275-279.

MATTEI DN, KOPPER JJ, SANZ MG (2020) Equine coronavirus-associated colitis in horses: a retrospective study. *J. Equine Vet. Sci.*, 87:102906.

MOTT J, *et al.* (1997) Comparison of PCR and culture to the indirect fluorescent-antibody test for diagnosis of Potomac horse fever. *J. Clin. Microbiol.*, 35(9): 2215-2219.

MULVILLE P (1991) Equine monocytic ehrlichiosis (Potomac horse fever): a review. *Equine Vet. J.*, 23(6):400-404.

OKE S (2019) Potomac horse fever vaccination options for horses. *The Horse*, Jul 23, 2019. Available in: <https://thehorse.com/176499/potomac-horse-fever-vaccination-options-for-horses/> Accessed on August 15, 2019.

PALMER JE (1993) Potomac horse fever. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, 9(2):399-410.

PAULINO PG, *et al.* (2020) Detection of *Neorickettsia risticii*, the agent of potomac horse fever, in horses from Rio de Janeiro, Brazil. *Sci. Rep.*, 10(1):7208.

RIKIHISA Y (1991) Protection against murine Potomac horse fever by an inactivated *Ehrlichia risticii* vaccine. *Vet. Microbiol.*, 27(3-4):339-350.

RIKIHISA Y (2022) The "biological weapons" of *Ehrlichia chaffeensis*: novel molecules and mechanisms to subjugate host cells. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 11:e.830180.

RIKIHISA Y, *et al.* (1992) Loss of absorptive capacity for sodium and chloride in the colon causes diarrhea in Potomac horse fever. *Res. Vet. Sci.*, 52(3):353-362.

RIKIHISA Y, *et al.* (2004) Analysis of p51, groESL, and the major antigen P51 in various species of *Neorickettsia*, an obligatory intracellular bacterium that infects trematodes and mammals. *J. Clin. Microb.*, 42(8):3823-3826.

RIKIHISA Y, PERRY BD, CORDES DO. (1985) Ultrastructural study of ehrlichial organisms in the large colons of ponies infected with Potomac horse fever. *Infect. Immun.*, 49(3):505-512.

RUBY R, MAGDESIAN KG, KASS PH (2009) Comparison of clinical, microbiologic, and clinicopathologic findings in horses positive and negative for *Clostridium difficile* infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 234(6):777-784.

SANCHEZ LC (2018) Disorders of the gastrointestinal system. In: REED SM, *et al.* (eds.) *Equine Internal Medicine*. 4th ed. Amsterdam: ELSEVIER, 2018. p. 709-842.

SHAW SD, STÄMPFLI H. (2018) Diagnosis and treatment of undifferentiated and infectious acute diarrhea in the adult horse. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, 34(1):39-53. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2017.11.002>

STEWART MC, *et al.* (1995) Acute febrile diarrhea in horses: 86 cases (1986-1991). *Aust. Vet. J.*, 72(2):41-44.

TEYMOURNEJAD O, *et al.* (2020) Isolation and molecular analysis of a novel *Neorickettsia* species that causes Potomac horse fever. *MBio - Clin. Sci. Epidemiol.*, 11:e03429-19.

UZAL FA, *et al.* (2022) Bacterial and viral enterocolitis in horses: a review. *J. Vet. Diagn. Invest*, 34(3):354-375.

UZAL FA, PLATTNER BL, HOSTETTER JM (2016) Alimentary system. In: MAXIE, M. G. (Ed). *Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. 6th ed. v. 2. Amsterdam: ELSEVIER, 2016. p. 1-257.

VAN EPS AW (2010) Therapeutic hypothermia (cryotherapy) to prevent and treat acute laminitis. *Vet. Clin. North Am.: Equine Pract.* 26, 125-133, 2010.

VAUGHAN JA, TKACH VV, GREIMAN SE. (2012) *Neorickettsial* endosymbionts of the digenea: diversity, transmission and distribution. *Adv. Parasitol.*, 79: 253-297.

WELLS MY, RIKIHISA, Y (1988) Lack of lysosomal fusion with phagosomes containing *Ehrlichia risticii* in P388D1 cells: abrogation of inhibition with oxytetracycline. *Infect. Imm.*, 56(12):3209-3215.

3.2 Artigo 2

Detection and Phylogenetic Relationship of *Neorickettsia risticii* in Horses from Southern Rio Grande do Sul, Brazil

Juliana Garcia da Silva; Kauê Rodriguez Martins; Natalia Rahal; Luiz Filipe Damé Schuch; Rodrigo Casquero Cunha; Mário Carlos Araújo Meireles

Submetido à Revista Journal of Equine Veterinary Science

1 **Original Research**

2
3
4 **Detection and Phylogenetic Relationship of *Neorickettsia risticii* in Horses from**
5 **Southern Rio Grande do Sul, Brazil**

6
7
8
9 J.G. Silva^{a*}, K.R. Martins^b, N.M. Rahal^c, L.F.D. Schuch^d, R.C. Cunha^e, M.C.A. Meireles^f

10
11 ^a *Department of Preventive Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine,*
12 *Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Capão do Leão, s/n, Pelotas Highway*
13 *(BR-392), Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brazil, 96160-000.*

14 ^b *Molecular Veterinary Laboratory, Department of Veterinary Medicine, School of Veterinary*
15 *Medicine, (UFPel), Campus Capão do Leão, s/n, Pelotas Highway (BR-392), Capão do*
16 *Leão, Rio Grande do Sul, Brazil, 96160-000.*

17 ^c *Department of Veterinary Sciences, School of Veterinary Medicine, Universidade Federal*
18 *de Pelotas (UFPel), Campus Capão do Leão, s/n, Pelotas Highway (BR-392), Capão do*
19 *Leão, Rio Grande do Sul, Brazil, 96160-000.*

20 ^d *Associate Professor, Department of Veterinary Medicine (UFPel), Campus Capão do Leão,*
21 *s/n, Pelotas Highway (BR-392), Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brazil, 96160-000.*

22 ^e *Professor, Department of Veterinary Medicine (UFPel), Campus Capão do Leão, s/n,*
23 *Pelotas Highway (BR-392), Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brazil, 96160-000.*

24 ^f *Professor, Department of Preventive Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine,*
25 *Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Capão do Leão, s/n, Pelotas Highway*
26 *(BR-392), Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brazil, 96160-000.*

27
28
29
30
31 * *Corresponding author.*

32 *E-mail address: jugarsilva@gmail.com (J.G. Silva)*

33
34

35 **Abstract**

36 **Background:** *Neorickettsia risticii*, an obligate intracellular bacterium, is the causative agent
37 of Potomac Horse Fever (PHF) — a systemic, acute, and potentially fatal diarrheal disease.
38 This pathogen is an endosymbiont of digenetic trematodes, with freshwater snails playing a
39 role in its biological cycle. The disease exhibits endemic and seasonal patterns, primarily
40 affecting horses in wetlands during warmer months, and has been documented in the United
41 States, Canada, Europe, and South America. Previous studies confirmed the pathogen's
42 presence in herds from southern Brazil via serology and PCR; however, its genetic sequencing
43 and phylogenetic classification remained unresolved.

44 **Objective:** This study aimed to perform molecular diagnosis, genetic sequencing, and
45 phylogenetic analysis of *N. risticii* in naturally infected symptomatic horses, as well as to
46 screen asymptomatic animals and *Heleobia* spp. snails from endemic farms.

47 **Methods:** The agent's DNA was investigated in blood and snail samples using nested PCR.

48 **Results:** Symptomatic animals yielded a 529-bp product (consistent with *N. risticii*), whereas
49 asymptomatic horses and snails showed no amplification. We report the first genetic sequences
50 of *N. risticii* from southern Brazil, along with a phylogenetic study of the pathogen.

51 **Conclusion:** Sequence comparison and phylogenetic analysis revealed high similarity among
52 the obtained samples and other sequences from South America. Our findings confirm the
53 agent's circulation in the region and, by enriching the genetic database, encourage further
54 studies to elucidate the etiological agent's epidemiology.

55

56 **Keywords:** Brazilian horses; Equine diarrhea; Freshwater snails; Nested PCR detection;
57 Trematode-borne disease

58

59

60 1. Introduction

61 *Neorickettsia risticii* is the causative agent of Equine Neorickettsiosis (EN), a systemic,
62 acute, severe, and sometimes fatal disease characterized by fever, depression, anorexia,
63 dehydration, watery diarrhea, laminitis, and/or abortion, leading to significant economic losses
64 [1-3]. The pathogen is maintained in various trematode species that parasitize birds or
65 insectivorous bats and use freshwater snails and aquatic insects as first and second intermediate
66 hosts [4]. Horses are considered accidental hosts, acquiring the infection horizontally through
67 the ingestion of aquatic insects containing trematodes and metacercariae infected with *N.*
68 *risticii*, or free cercariae in water [1]. After ingestion, the pathogen replicates in the epithelial
69 cells of the colon, tissue macrophages, mast cells, and monocytes [5]. Considered a common
70 equine colitis in endemic areas, occurring seasonally in warm, humid months, with higher
71 incidence near water sources [6]. Vaughan et al. [1] suggested that EN may represent an ancient
72 disease, historically known as “churrio” or “churrido” in horses for over a century in southern
73 Brazil and Uruguay, it recurs annually along Lagoa Mirim, implying a South American origin
74 before spreading to North America [7].

75 The disease has been identified in both North and South America, as well as in Europe
76 [9-11]. Cicuttin et al. [12,13] detected *N. risticii* through molecular diagnostics in *Tadarida*
77 *brasiliensis* bats from Brazil and Argentina. Additionally, in Argentina, *Oligoryzomys*
78 *flavescens* tested PCR-positive for the 16S rRNA fragment of the Anaplasmataceae family,
79 with the sequence exhibiting 99.7% identity to *N. risticii* [14].

80 Serological studies indicated the agent's presence in southeastern Brazil [15-18]. In Rio
81 Grande do Sul, EN has been diagnosed since 1999, predominantly in summer, on properties
82 near freshwater lagoons [19; 20]. Serological assays detected *N. risticii* DNA in horses [7].
83 Subsequently, Coimbra et al. [19] identified *Heleobia* snails hosting *Parapleurolophocercous*
84 cercariae as carriers of *N. risticii* through molecular diagnostics. Coimbra et al. [20] identified

85 three species of Heleobia snails (*H. piscium*, *H. parchappei*, and *H. davisii*), which were later
86 found to harbor *N. risticii* in snails, trematodes, and naturally infected horses [20].

87 Although several molecular studies have reported the presence of *Neorickettsia* DNA
88 in different hosts, only four species have been fully characterized: *N. sennetsu* [21], *N.*
89 *helminthoeca* [22], *N. risticii*, and a newly isolated species, *N. findlayensis*, which causes a
90 disease similar to EN in horses in eastern Ontario, Canada [23].

91 Regarding diagnosis, cell culture isolation of *Neorickettsia* spp. from horses affected
92 by Equine Neorickettsiosis represents a sensitive diagnostic method [23, 24]. However, due to
93 technical, economic, and time constraints, the most used method for confirming the diagnosis
94 is the Nested PCR assay, detecting the agent in fecal samples, intestinal content, buffy coat, or
95 whole blood [25-27].

96 Epidemiological evidence suggests EN remains underdiagnosed in Brazil, necessitating
97 routine investigations into equine enterocolitis. The disease limits Crioulo horse breeding due
98 to economic losses from treatment and mortality [7,19]. Given the phylogenetic relevance of
99 *N. risticii* in southern Brazil, this study aimed to sequence the 16S rRNA gene and compare
100 findings with GenBank™ sequences to enhance knowledge on its distribution and genetic
101 diversity.

102

1032. Materials and methods

1042.1 Ethical approval

105 The study protocol was approved by *Universidade Federal de Pelotas* Animal Care
106 and Use Committee (Aproval number 121/2023/CEUA/REITORIA, Process number
107 23110.005607/2023-39; Approval date: 16 June 2023).

108 2.2 Collection of blood and environmental samples

109 Approximately 5.0 mL of blood was collected from 10 field-raised horses (n= 10)
110 presenting clinical signs compatible with EN. The animals were attended to and hospitalized
111 at the Veterinary Clinical Hospital of the Federal University of Pelotas (HCV-UFPel) between
112 February 2022 and March 2023. Samples were stored in EDTA tubes and kept at 4°C until
113 genomic DNA extraction. The main inclusion criterion was a positive result in the Nested PCR
114 test, confirming the amplification of a 529 bp fragment corresponding to the *N. risticii* gene
115 [28].

116 Simultaneously, 28 asymptomatic horses (n= 29) from a property with a confirmed
117 positive EN case in the municipality of Rio Grande (RS) were analyzed. These animals were
118 tested three days after the detection of the agent in a symptomatic blood sample. To characterize
119 EN endemism in the region, *Heleobia* snails were also analyzed by PCR. The snails were
120 collected from a historically endemic site in Rio Grande (32°12'17.1"S 52°28'08.9"W) during
121 February (n=120) and March (n=200) of 2022 (Fig. 1).

122 The parasitism rate was determined according to Coutinho [29], after counting, the
123 snails were sorted by size and maintained in petri dishes submerged in chlorine-free water
124 under artificial light for three days to stimulate cercariae release. Parasitism frequency was
125 determined by dissecting the mollusks between two glass slides. Shell fragments were
126 discarded, and the viscera were examined at 8x magnification under a stereomicroscope,
127 revealing sporocysts or rediae harbored within the hosts [30]. The collected material was
128 divided into pools, which were subsequently analyzed using Nested PCR.

129 *2.3 Genomic DNA extraction, Nested PCR and sequencing*

130 The laboratory procedures for this study were conducted at the Veterinary Molecular
131 Biology Laboratory (LaBMol-Vet), located at the Federal University of Pelotas (UFPel), RS,
132 Brazil. Genomic DNA extraction from buffy coat, whole blood, and macerated pools of soft

133 tissues from gastropods were performed using Brazol[®], following the manufacturer's
134 instructions for each case.

135 Sample quantification was carried out via spectrophotometry using a Nanodrop Lite
136 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Polymerase Chain Reaction (PCR)
137 was the diagnostic technique used to amplify a 529 bp portion of the *N. risticii* 16S rRNA gene
138 fragment, following the Nested PCR protocol described by Barlough et al. [28].

139 In the first PCR step, 3 μ L of the target DNA and a pair of oligonucleotides (ER-3b:
140 ATTTGAGAGTTTGATCCTGG, ER-2c: GTTTTAAATGCAGTTCTTGG) were used to
141 amplify a 599 bp region of the *N. risticii* 16S rRNA gene. In the second step, 1.5 μ L of the first
142 PCR product was used as a template, and a second pair of internal primers (ER-3a:
143 CTAGCGGTAGGCTTAAC, ER-2a: CACACCTAACTTACGGG) amplified the internal 529
144 bp region.

145 PCR reactions were prepared to a final volume of 50 μ L, containing 1U Taq DNA
146 Polymerase (Ludwig Biotecnologia, Porto Alegre, RS, Brazil), 20 μ L Tris-HCl (pH 8.4), 50
147 μ L KCl, 400 μ L dNTP, 1.5 μ L MgCl₂, 40 pmol of each primer, and DNase/RNase-free water
148 (qsp 50 μ L). Nuclease-free water served as negative control, while no positive control was
149 used; genetic sequencing of amplified samples confirmed the results.

150 Both PCR stages were conducted under the same temperature and time conditions:
151 initial denaturation at 94°C for 5 minutes, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 1
152 minute, annealing at 60°C for 2 minutes, and elongation at 72°C for 1.5 minutes. A final
153 extension was performed at 72°C for 7 minutes in a 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems,
154 Waltham, Massachusetts, USA). After cycling, the temperature was lowered to 4°C until the
155 material was processed or stored under refrigeration.

156 The PCR products were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis stained with
157 ethidium bromide (2 μ L per 100 mL). A volume of 20 μ L of the PCR product mixed with 4

158 μ L of loading buffer (40% sucrose, 0.06% bromocresol blue) was loaded and run at 100V for
159 60 minutes using 1X TBE buffer as the running solution. The amplified products were
160 visualized under UV light (MacoVue, UV-25 Hoefer), and band sizes were determined by
161 comparison to a 100 bp molecular weight marker (Ludwig Biotecnologia, Porto Alegre, RS,
162 Brazil). Amplified bands were excised from the gel using sterile scalpel blades, weighed, and
163 placed into labeled 2.0 mL polypropylene tubes.

164 Positive samples were purified using the Gel DNA Purification Kit (MEBEP
165 Bioscience, Shenzhen, China). The 16S rRNA gene was processed using the ABI PRISM
166 BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) and sequenced on a
167 3730xl DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).
168 Electropherograms in AB1 format were manually verified using the MEGA software version
169 11 [31]. Forward and reverse sequences were assembled into consensus sequences and
170 subsequently aligned.

171 Eight sequences were submitted to GenBank™ under accession numbers OR352967.1,
172 OR079487.2, OR079489.2, OR079491.2, OR079493.2, OR079495.2, OR079497.2, and
173 OR079499.2. Multiple sequence alignment was performed using the Clustal W tool,
174 incorporating representative *N. risticii* 16S rRNA sequences (Appendix A: Supplementary
175 material). The sequence data retrieved from GenBank™ are summarized in Table 1, detailing
176 ID, base pair count, definition, authors, title, species, date, and location.

177 The "Find Best DNA/Protein Model" tool was applied to determine the best substitution
178 model, identifying the K2 (Kimura-2 parameter) + G (Gamma distribution) model with the
179 lowest Bayesian Information Criterion (BIC) score, thus describing the optimal substitution
180 pattern for the analyzed sequences. Finally, a Nearest-Neighbor-Interchange (NNI)
181 phylogenetic tree was constructed with 1,000 bootstrap replicates based on the 16S rRNA gene
182 alignment.

183 3. Results

184 Out of a total of 10 horses hospitalized under suspicion of Potomac Horse Fever (PHF),
185 four (40%) amplified the 529-bp 16S rRNA gene fragment, characteristic of *Ehrlichia*,
186 *Anaplasma*, and *Neorickettsia*, while all asymptomatic animals ($n=28$) tested negative in the
187 PCR assay. The environmental samples tested showed parasitism rates of 23.13% and 40.5%,
188 however were negative for the presence of *N. risticii*. All PCR products of the *16S rRNA* gene,
189 compatible with the genus Rickettsiales when analyzed under ultraviolet light transillumination
190 (Fig. 2), were re-amplified, and the resulting amplicons were purified and sequenced.

191 All positive samples were successfully sequenced by Sanger and deposited in
192 GenBank™ under the following accession numbers: Pampa (OR352967.1), Milonga 1 and 2
193 (OR079487.2 and OR079489.2), Corsario 1, 2, and 3 (OR079491.2, OR079493.2, and
194 OR079495.2), and Raposa (OR079497.2 and OR079499.2). These sequences are described as
195 "partial *N. risticii* 16S rRNA gene fragments from Rio Grande do Sul" and serve as the
196 foundation for phylogenetic studies in subsequent research. The phylogenetic relationship
197 among the samples analyzed in this study is illustrated in Fig. 3.

198 The phylogenetic analysis of *N. risticii* based on *16S rRNA* highlighted the formation
199 of three main clusters sharing a common ancestor. In the phylogenetic dendrogram, the eight
200 samples sequenced in this study remained grouped within the same cluster alongside positive
201 *N. risticii* samples from other *N. risticii* sequences originating from South America. These
202 included blood samples from equines (Rio de Janeiro, Brazil) and bats (Buenos Aires,
203 Argentina), also deposited in GenBank™. The similarity percentage among the samples
204 identified in this study ranged from 97.6% to 99.2%. The reference sample used for this
205 analysis was OR079499.2 (Fig. 4).

206 When compared with other samples from South America analyzed in this study, a
207 similar percentage ranging from 92.9% to 100% was detected, using a sample from Rio de
208 Janeiro (MK760556.1) as the reference (Fig. 5).

209 The phylogenetic analysis based on the KX462531.1 sequence revealed that the *N.*
210 *risticii* samples from this study showed similarity with other samples, ranging from 87.8% to
211 90%. The percentage of identity between the samples sequenced in this study and those selected
212 for the construction of the phylogenetic tree ranged from 84.5% to 96.7% (Fig. 6).

213

2144. Discussion

215 The present study confirms the circulation of *N. risticii* among horses in southern Rio
216 Grande do Sul, as 40% of symptomatic animals (4/10) were found to harbor the agent in blood
217 samples analyzed by Nested PCR. These findings are consistent with those of Coimbra et al.
218 [32], who detected *N. risticii* in 42.8% (3/7) of horses using the same test. Mott et al. [24]
219 emphasize that PCR is a reliable test for detecting active infections: positive results indicate
220 the presence of *N. risticii* DNA in the sample, and in animals with clinical signs, confirms the
221 hypothesis of infection.

222 This technique is considered the most suitable for rapid and accurate diagnosis of active
223 infections and is as sensitive as cell culture for detecting the pathogen responsible for Potomac
224 Horse Fever (PHF). According to Pusterla et al. [27] and Kanter et al. [33], Polymerase Chain
225 Reaction based on the 16S rRNA gene provides a sensitive diagnostic test due to the conserved
226 nature of the 16S rRNA gene among strains and the lack of cross-reactivity with other
227 *Rickettsia*, increasing the reliability of the results presented in this study.

228 Coimbra et al. [20] suggest that horses raised in floodplain areas have greater exposure
229 to environments potentially infected by trematodes that may carry the agent. However,
230 asymptomatic horses tested negative in molecular assays, possibly due to acquired immunity

231 in animals born in endemic areas. Dutra et al. [7] indicate that although the species is generally
232 susceptible to the disease, the more severe form tends to occur in horses newly introduced to
233 these areas compared to native ones. Additionally, Coimbra et al. [32] noted that in properties
234 with extensive farming systems, the identification of symptoms is usually performed by field
235 workers, which may lead to mild manifestations of the disease going unnoticed.

236 Coimbra et al. [19] identified gastropods of the *Heleobia* genus as carriers of
237 *Parapleurolophocercous* cercariae, which in turn harbored *N. risticii* on a property near Lagoa
238 Mirim, where PHF cases were confirmed. In this study, environmental snail collections
239 conducted in an endemic location during the Southern Hemisphere summer showed higher
240 parasitism rates of 23.13% and 40.5% compared to 19.35% observed during the same season
241 by Coimbra et al. [32]. However, *N. risticii* was not detected in these samples, suggesting a
242 low prevalence of the bacterium in snails, even in areas with a history of PHF in horses. Pusterla
243 et al. [27] argue that the percentage of infected snails may be influenced by various biological
244 factors, such as the type, maturity stage of the snail and trematodes, as well as the time of year
245 and region studied. Thus, this study does not rule out the possibility of *N. risticii* presence in
246 snails, as the data highlight the need for further research with a larger number of samples.

247 The present study demonstrated that the selected region is highly similar to other
248 specimens of *N. risticii*, whose sequences are available in GenBank™, indicating that this
249 region is highly conserved in *N. risticii*. This suggests a close relationship with other members
250 of the genus *Neorickettsia*, including *N. sennetsu* and *N. helminthoeca*, whose close association
251 implies that these bacteria share a common evolutionary history. Furthermore, phylogenetic
252 analysis revealed genetic similarity among *N. risticii* strains in South America, which could
253 have positive implications for diagnosis, treatment, and, in the future, the development of a
254 local vaccine for Potomac Horse Fever (PHF). Based on the 16S rRNA fragment sequencing
255 results from *N. risticii* samples in this study, it was possible to obtain the phylogenetic

256 classification and confirm a genetic similarity of 87.8% to 90% with *N. helminthoeca*.
257 Phylogenetically, *N. findlayensis* is more divergent from *N. risticii* than *N. sennetsu*, the
258 causative agent of *Sennetsu* Neorickettsiosis in humans [23].

259 The genetic similarity results among local samples obtained in this study align with the
260 findings of Paulino et al. [10], where Brazilian samples showed no genetic variation among
261 themselves but differed from North American strains. Previous studies have reported
262 geographical segregation within the United States, indicating that sequences from California
263 and Oregon were distinct from those from Ohio, Maryland, Pennsylvania, and Buenos Aires,
264 which formed their own cluster [24, 33, 34].

265 Sequencing a greater number of regional and national samples will be critical not only
266 for confirming definitive diagnoses but also for characterizing isolates found in different
267 regions of Brazil. This would enable the development of diagnostic techniques using native
268 materials and the design of oligonucleotide primers based on sequences from Brazilian samples
269 rather than relying solely on North American, Asian, or European sequences. Additionally,
270 studying the presence and genetic characterization of Brazilian isolates would help identify
271 proteins encoded by these genes, which could serve as candidates for immunodiagnostic
272 research.

273 Thus, a molecular characterization of *Ehrlichia* agents found in samples from various
274 vectors, combined with a larger number of samples isolated from different natural and wild
275 hosts across diverse regions of Brazil, could provide a more comprehensive and definitive
276 molecular characterization. This would facilitate the analysis of antigenic variants.

277 To the best of our knowledge, these are the first genetic sequences of *N. risticii* obtained
278 from blood samples of horses in Rio Grande do Sul. Considering that phylogenetic trees are
279 widely accepted evolutionary models, often based on amino acid or DNA sequences [35], and
280 are used to understand the origin and evolution of existing and even extinct species, we initiated

281 the study of phylogenetic relationships of *N. risticii* in southern Brazil. This effort enhances
282 the current understanding of the distribution and heterogeneity of this agent, guiding future
283 research and establishing directives for the eventual isolation of this bacterium. Proteomic
284 studies are necessary to advance the development of a national immunogen that could meet the
285 demand of herds regularly affected by this disease.

286 Additionally, regular environmental sampling and analysis to update data on the
287 parasitism and infection rates of snails and trematodes throughout different seasons, combined
288 with serological monitoring of herds in endemic regions, could help prevent disease outbreaks
289 or accelerate responses to early symptoms in animals introduced to high-risk areas, reducing
290 disease severity and economic losses.

291 **5. Conclusion**

292 PCR-negative results for asymptomatic horses and snails from endemic areas highlight the
293 need for a larger sample size to update data on parasitism in snails and contamination with *N.*
294 *risticii*. Limited research on Potomac Horse Fever (PHF) in Brazil, especially regarding equine
295 enterocolitis, emphasizes the importance of incorporating molecular diagnosis (Nested PCR)
296 to confirm *N. risticii* presence in horses, allowing for quicker treatment of symptomatic
297 animals. This is crucial for preventing economic losses in regions like Rio Grande do Sul,
298 where the bacterium circulates. Genetic sequencing of *N. risticii*-positive samples from
299 southern Brazil has begun, revealing close phylogenetic similarities with isolates from Brazil,
300 Argentina, the United States, and Canada.

301

302 **Conflict of interest statement**

303 None of the authors has any financial or personal relationships that could
304 inappropriately influence or bias the content of the paper.

305

306 **Acknowledgements**

307 The authors thank the Veterinary Molecular Biology Laboratory (LaBMol-Vet) and the
308 Veterinary Clinical Hospital of UFPel for their support. We also appreciate the funding
309 agencies, farm owners, veterinarians, and laboratory staff for their valuable contributions.

310

311 **Author contributions**

312 Juliana Garcia da Silva and Kauê Rodriguez Martins contributed to sample processing, writing
313 the draft, and reviewing the manuscript. The other authors were responsible for
314 conceptualization, funding acquisition, and manuscript review.

315

316 **Declaration of generative AI in scientific writing**

317 The authors acknowledge the use of AI-assisted technology for grammar improvement and
318 language refinement in the preparation of this manuscript. However, all intellectual content,
319 data interpretation, and conclusions are the sole responsibility of the authors.

320

321 **References**

- 322 [1] Vaughan JA, Tkach VV, Greiman SE. Neorickettsial endosymbionts of the digenea:
323 diversity, transmission and distribution. *Adv Parasitol* 2012;79:253–97.
- 324 [2] Rikihisa Y, Perry BD, Cordes DO. Ultrastructural study of ehrlichial organisms in the
325 large colons of ponies infected with Potomac horse fever. *Infect Immun* 1985;49(3):505–12.
- 326 [3] Rikihisa Y, Inoue A, Zhang Y, Fukui T, Takahashi M, Lee R, et al. Analysis of p51,
327 groESL, and the major antigen P51 in various species of Neorickettsia, an obligatory
328 intracellular bacterium that infects trematodes and mammals. *J Clin Microbiol*
329 2004;42(8):3823–6.

- 330 [4] Gibson KE, Rikihisa Y, Zhang Y, Martin C, Reed S, Lin Y, et al. *Neorickettsia risticii* is
331 vertically transmitted in the trematode *Acanthatrium oregonense* and horizontally transmitted
332 to bats. *Environ Microbiol* 2005;7(2):203–12.
- 333 [5] Cordes DO, Eamens GJ, Kinde H, Rickard MD. Enterocolitis caused by *Ehrlichia* sp. in
334 the horse (Potomac horse fever). *Vet Pathol* 1986;23(4):471–7.
- 335 [6] Madigan JE, Rikihisa Y, Palmer JE, Pusterla N, Chae JS. Transmission of *Ehrlichia*
336 *risticii*, the agent of Potomac horse fever, using naturally infected aquatic insects and
337 helminth vectors: preliminary report. *Equine Vet J* 2000;32(4):275–9.
- 338 [7] Dutra F, Pusterla N, Reubel GH, Madigan JE, Chae JS, DeRock E, et al. Equine
339 monocytic Ehrlichiosis (Potomac horse fever) in horses in Uruguay and southern Brazil. *J*
340 *Vet Diagn Invest* 2001;13(5):433–7.
- 341 [8] Arroyo LG, Weese JS, Staempfli HR. Potomac horse fever in Ontario: Clinical,
342 geographic, and diagnostic aspects. *Can Vet J* 2021;62(6):622–8.
- 343 [9] Palmer JE. Potomac horse fever. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1993;9(2):399–410.
- 344 [10] Paulino PG, Santos HA, Baldani CD, Guimaraes A, Massard CL, Oliveira RR, et al.
345 Detection of *Neorickettsia risticii*, the agent of Potomac horse fever, in horses from Rio de
346 Janeiro, Brazil. *Sci Rep* 2020;10(1):7208.
- 347 [11] Rikihisa Y. Protection against murine Potomac horse fever by an inactivated *Ehrlichia*
348 *risticii* vaccine. *Vet Microbiol* 1991;27(3–4):339–50.
- 349 [12] Cicuttin GL, Salvo MN, Dohmen FEG. Molecular detection of *Neorickettsia risticii* in
350 Brazilian free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*) from Buenos Aires, Argentina. *Pesq Vet*
351 *Bras* 2013;33:648–50.
- 352 [13] Cicuttin GL, Bruno A, Aristegui E, Brambati D, Nava S, Gury Dohmen F. *Neorickettsia*
353 *risticii*, *Rickettsia* sp. and *Bartonella* sp. in *Tadarida brasiliensis* bats from Buenos Aires,
354 Argentina. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2017;52:1–5.

- 355 [14] Cicuttin GL, Herculini C, Aristegui E, Bruno A, Brambati D, Nava S. Detection of
356 *Neorickettsia* sp. in *Oligoryzomys flavescens* rodent from a protected urban area in Buenos
357 Aires City (Argentina). *Vet Parasitol Reg Stud Rep* 2022;32:100742.
- 358 [15] Marutani VHB, Headley SA, Bracarense APFRL. Putative equine neorickettsiosis in a
359 mare from Southern Brazil. *Acta Sci Vet* 2019;47:1–7.
- 360 [16] Ferrão CM, Moreira L, Dutra F, Santos JL, Guimaraes A, Oliveira RR, et al. Equine
361 monocytic ehrlichiosis (EME) in Rio de Janeiro state, Brazil. *Arq Bras Med Vet Zootec*
362 2007;59:1575–8.
- 363 [17] Moreira L, Paulino PG, Dutra F, Santos JL, Guimaraes A, Oliveira RR, et al. Frequency
364 of equine monocytic ehrlichiosis (EME) in Brazil. *Pesq Vet Bras* 2013;33:697–9.
- 365 [18] Costa RL, Massard CL, Guimaraes A, Oliveira RR, Almosny NR. Molecular
366 investigation of *Neorickettsia risticii* in trematodes and snails in a region with serological
367 evidence of this agent in horses, state of Rio de Janeiro. *Arq Bras Med Vet Zootec*
368 2016;68(6):1470–8.
- 369 [19] Coimbra HS. Erliquiose monocítica equina no Rio Grande do Sul: aspectos clínicos,
370 anátomo-patológicos e epidemiológicos. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-
371 Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de
372 Pelotas. 2003;49p.
- 373 [20] Coimbra HS, Leite RC, Labruna MB, Soares CO. *Neorickettsia (Ehrlichia) risticii* no sul
374 do Brasil: *Heleobia* spp. (Mollusca: Hydrobilidae) e *Parapleurolophocercous cercariae*
375 (Trematoda: Digenea) como possíveis vetores. *Arq Inst Biol* 2005; 72:325–9.
- 376 [21] Dittrich S, Rattanavong S, Lee SJ, Panyanivong P, Craig SB, Tulsiani SM, et al.
377 *Neorickettsia sennetsu* as a neglected cause of fever in South-East Asia. *PLoS Negl Trop Dis*
378 2015;9(7):e0003908.

- 379 [22] Headley SA, Scorpio DG, Greiman SE, Uzal FA. *Neorickettsia helminthoeca* and
380 salmon poisoning disease: a review. *Vet J* 2011;187(2):165–73.
- 381 [23] Teymournejad O, Lin M, Bekebrede H, Kamr A, Toribio RE, Arroyo LG, et al. Isolation
382 and molecular analysis of a novel *Neorickettsia* species that causes Potomac horse fever.
383 *Mbio* 2020;11(1):e03429–19.
- 384 [24] Mott J, Rikihisa Y, Zhang Y, Reed S, Lin Y. Comparison of PCR and culture to the
385 indirect fluorescent-antibody test for diagnosis of Potomac horse fever. *J Clin Microbiol*
386 1997;35(9):2215–9.
- 387 [25] Biswas B, Unver A, Rikihisa Y. Diagnostic application of polymerase chain reaction for
388 detection of *Ehrlichia risticii* in equine monocytic ehrlichiosis (Potomac horse fever). *J Clin*
389 *Microbiol* 1991;29(10):2228–33.
- 390 [26] Bertin FR, Reubel GH, Madigan JE. Clinical and clinicopathological factors associated
391 with survival in 44 horses with equine neorickettsiosis (Potomac horse fever). *J Vet Intern*
392 *Med* 2013;27(6):1528–34.
- 393 [27] Pusterla N, Madigan JE, DeRock E, Johnson E, Lawler SP, Rikihisa Y. Helminthic
394 transmission and isolation of *Ehrlichia risticii*, the causative agent of Potomac horse fever, by
395 using trematode stages from freshwater stream snails. *J Clin Microbiol* 2000;38(3):1293–7.
- 396 [28] Barlough JE, Rikihisa Y, Madigan JE. Nested polymerase chain reaction for detection of
397 *Ehrlichia risticii* genomic DNA in infected horses. *Vet Parasitol* 1997;68(4):367–73.
- 398 [29] Coutinho JO. Índices de infestação natural dos planorbídeos pelas cercárias do
399 *Schistosoma mansoni* na cidade do Salvador-Bahia. *An Fac Med São Paulo* 1950;25:29–53.
- 400 [30] Thiengo SC, Fernandez MA, Mattos AC, Simone LRL, Maldonado A. Rapid spread of
401 an invasive snail in South America: the giant African snail, *Achatina fulica*, in Brazil. *Biol*
402 *Invasions* 2007;9:693–702.

- 403 [31] Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis
404 version 11. *Mol Biol Evol* 2021;38(7):3022–7.
- 405 [32] Coimbra HS, Moreira LM, Dutra F, Paulino PG, Santos JL, Guimaraes A, et al.
406 Erliquiose monocítica equina no Rio Grande do Sul: aspectos clínicos, anátomo-patológicos e
407 epidemiológicos. *Pesq Bras Vet* 2006;26(2):97–101.
- 408 [33] Kanter M, Ohashi N, Rikihisa Y. Analysis of 16S rRNA and 51-kilodalton antigen gene
409 and transmission in mice of *Ehrlichia risticii* in virgulate trematodes from *Elimia livescens*
410 snails in Ohio. *J Clin Microbiol* 2000;38(9):3349–58.
- 411 [34] Cicuttin GL, Salvo MN, Dohmen FEG. Molecular characterization of *Ehrlichia canis*
412 infecting dogs, Buenos Aires. *Ticks Tick Borne Dis* 2016;7(5):954–7.
- 413 [35] Chor B, Tuller T. Maximum likelihood of evolutionary trees: hardness and
414 approximation. *Bioinformatics* 2005;21(suppl_1):i97–106.
- 415

Tab. 1. Genbank™ sequences of samples used in the construction of the phylogenetic tree.

ID	bp	Definition	Authors	Title	Species	Date	Local
OR352967.1	529 bp	Uncultured Neorickettsia sp. clone Pampa1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Martins, K.R. et al.	Detection and sequencing of Neorickettsia risticii 16s rRNA isolated from horse blood in Rio Grande do Sul, Brazil	<i>Equus caballus</i>	01/08/2023	RS-Brasil
OR079487.2	527 bp	Neorickettsia risticii isolate Neorickettsia_risticii_ER2A_Milonga1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Martins, K.R. et al.	Detection and sequencing of Neorickettsia risticii 16s rRNA isolated from horse blood in Rio Grande do Sul, Brazil	<i>Equus caballus</i>	29/06/2023	RS-Brasil
OR079491.2	531 bp	Neorickettsia risticii isolate Neorickettsia_risticii_ER2A_Corsario1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Martins, K.R. et al.	Detection and sequencing of Neorickettsia risticii 16s rRNA isolated from horse blood in Rio Grande do Sul, Brazil	<i>Equus caballus</i>	29/06/2023	RS-Brasil
OR079497.2	529 bp	Neorickettsia risticii isolate Neorickettsia_risticii_ER2A_Raposa1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Martins, K.R. et al.	Detection and sequencing of Neorickettsia risticii 16s rRNA isolated from horse blood in Rio Grande do Sul, Brazil	<i>Equus caballus</i>	29/06/2023	RS-Brasil
OR079499.2	533 bp	Neorickettsia risticii isolate Neorickettsia_risticii_ER2A_Raposa2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Martins, K.R. et al.	Detection and sequencing of Neorickettsia risticii 16s rRNA isolated from horse blood in Rio Grande do Sul, Brazil	<i>Equus caballus</i>	29/06/2023	RS-Brasil
OR079493.2	527 bp	Neorickettsia risticii isolate Neorickettsia_risticii_ER2A_Corsario2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Martins, K.R. et al.	Detection and sequencing of Neorickettsia risticii 16s rRNA isolated from horse blood in Rio Grande do Sul, Brazil	<i>Equus caballus</i>	29/06/2023	RS-Brasil
OR079489.2	531 bp	Neorickettsia risticii isolate Neorickettsia_risticii_ER2A_Milonga2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Martins, K.R. et al.	Detection and sequencing of Neorickettsia risticii 16s rRNA isolated from horse blood in Rio Grande do Sul, Brazil	<i>Equus caballus</i>	29/06/2023	RS-Brasil
OR079495.2	538 bp	Neorickettsia risticii isolate Neorickettsia_risticii_ER2A_Corsario3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Martins, K.R. et al.	Detection and sequencing of Neorickettsia risticii 16s rRNA isolated from horse blood in Rio Grande do Sul, Brazil	<i>Equus caballus</i>	29/06/2023	RS-Brasil
MH476282.1	1405 bp	Neorickettsia findlayensis strain Fin17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Teymournejad, O. et al.	Isolation and Molecular Analysis of a Novel Neorickettsia Species That Causes Potomac Horse Fever	<i>horse blood</i>	13/08/2020	Ohio – USA
MK760556.1	1322 bp	Neorickettsia risticii isolate 001 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Paulino, P.G. et al.	First molecular detection of Neorickettsia risticii in horses from the state of Rio de Janeiro, Brazil	<i>Equus caballus</i>	13/04/2019	RJ – Brasil
MK760559.1	1322 bp	Neorickettsia risticii isolate 004 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Paulino, P.G. et al.	First molecular detection of Neorickettsia risticii in horses from the state of Rio de Janeiro, Brazil	<i>Equus caballus</i>	13/04/2019	RJ – Brasil
MK760560.1	1328 bp	Neorickettsia risticii isolate 005 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Paulino, P.G. et al.	First molecular detection of Neorickettsia risticii in horses from the state of Rio de Janeiro, Brazil	<i>Equus caballus</i>	13/04/2019	RJ – Brasil
MK760557.1	1309 bp	Neorickettsia risticii isolate 002 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Paulino, P.G. et al.	First molecular detection of Neorickettsia risticii in horses from the state of Rio de Janeiro, Brazil	<i>Equus caballus</i>	13/04/2019	RJ – Brasil
MK760558.1	1301 bp	Neorickettsia risticii isolate 003 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Paulino, P.G. et al.	First molecular detection of Neorickettsia risticii in horses from the state of Rio de Janeiro, Brazil	<i>Equus caballus</i>	13/04/2019	RJ – Brasil
KX462531.1	1324 bp	Neorickettsia helminthoeca 16S ribosomal RNA gene, complete	Greiman, S.E. et al.	Nanophyetus salmincola, vector of the salmon poisoning disease Bacteria; Pseudomonadota; Alphaproteobacteria; Rickettsiales; Anaplasmataceae; Neorickettsia	<i>Canis lupus familiaris</i>	31/08/2017	USA
KX001784.1	1309 bp	Neorickettsia risticii strain 812 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Cicuttin, G.L et al.	Phylogenetic characterization of Neorickettsia risticii detected in bats Tadarida brasiliensis, Buenos Aires	<i>Tadarida brasiliensis</i>	17/07/2016	Buenos Aires, Argentina

M73219.1	1377 bp	Neorickettsia sennetsu strain Miyayama 16S ribosomal RNA, partial sequence	Anderson, B.E. et al.	Ehrlichia chaffeensis, a new species associated with human ehrlichiosis	<i>type strain of Neorickettsia sennetsu</i>	13/11/2013	USA
JX125043.1	305 bp	Uncultured Neorickettsia sp. clone M6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Cicuttin, G.L. et al.	Molecular detection of Neorickettsia risticii in Brazilian free-tailed bats (Tadarida brasiliensis) from Buenos Aires, Argentina	<i>Tadarida brasiliensis</i>	12/06/2013	Buenos Aires, Argentina
AF295572.1	527 bp	Neorickettsia risticii 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Chae, J.S. et al.	Infection of aquatic insects with trematode metacercariae carrying Ehrlichia risticii, the cause of Potomac horse fever	<i>mayfly nymph (Ephemeroptera, Heptageniidae, Heptagenia)"</i>	20/08/2010	California – USA
AF295566.1	527 bp	Neorickettsia risticii 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Chae, J.S. et al.	Infection of aquatic insects with trematode metacercariae carrying Ehrlichia risticii, the cause of Potomac horse fever	<i>stonefly nymph (Plecoptera, Perlodidae, Skwala)</i>	20/08/2010	California – USA
AF380257.1	1448 bp	Ehrlichia risticii from horse 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Mott, J. et al.	Molecular analysis of Neorickettsia risticii in adult aquatic insects in Pennsylvania, in horses infected by ingestion of insects, and isolated in cell culture	<i>horse 1</i>	23/04/2002	Ohio – USA
AF206303.1	527 bp	Ehrlichia risticii from Caddisfly larvae 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Chae, J.S. et al.	Infection of aquatic insects with trematode metacercariae carrying Ehrlichia risticii, the cause of Potomac horse fever	<i>Caddisfly larvae (Trichoptera; Limnephilidae; Dicosmoecus)"</i>	03/09/2000	California – USA
AF206300.1	1495 bp	Ehrlichia risticii from Caddisfly larvae 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Chae, J.S. et al.	Infection of aquatic insects with trematode metacercariae carrying Ehrlichia risticii, the cause of Potomac horse fever	<i>Caddisfly larvae</i>	03/09/2000	California – USA
AY005439.1	1455 bp	Ehrlichia risticii isolate S22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Kanter, M. et al.	Analysis of the 16S rRNA and the 51-kDa antigen gene and transmission in mice of Ehrlichia risticii in Virgulate Trematodes from Elimia livescens snails in Ohio	<i>snail</i>	01/09/2000	Ohio – USA
AF179351.1	527 bp	Ehrlichia risticii strain Shasta 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pusterla, N. et al.	Helminthic transmission and isolation of Ehrlichia risticii, the causative agent of Potomac horse fever, by using trematode stages from freshwater stream snails	<i>cercariae infected snail</i>	14/03/2000	California – USA
AF036654.1	1443 bp	Ehrlichia risticii 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Reubel, G.H. et al.	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	<i>Juga/snail</i>	15/12/1999	California – USA
AF036653.1	1410 bp	Ehrlichia risticii 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Reubel, G.H. et al.	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	<i>Eclipse/horse/Pensylvania</i>	15/12/1999	California – USA
OK035564.1	305 bp	Neorickettsia risticii isolate R153 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Cicuttin, G.L. et al.	Detection of Neorickettsia sp. in Oligoryzomys flavescens rodent from a protected urban area in Buenos Aires City (Argentina)	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	01-FEB-2022	Argentina
MH476283.1	1405	Neorickettsia findlayensis strain Tom16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Teymournejad, O. et al.	Isolation and Molecular Analysis of a Novel Neorickettsia Species That Causes Potomac Horse Fever	<i>horse blood - "Tom16"</i>	13/08/2020	Ohio - USA – Canada

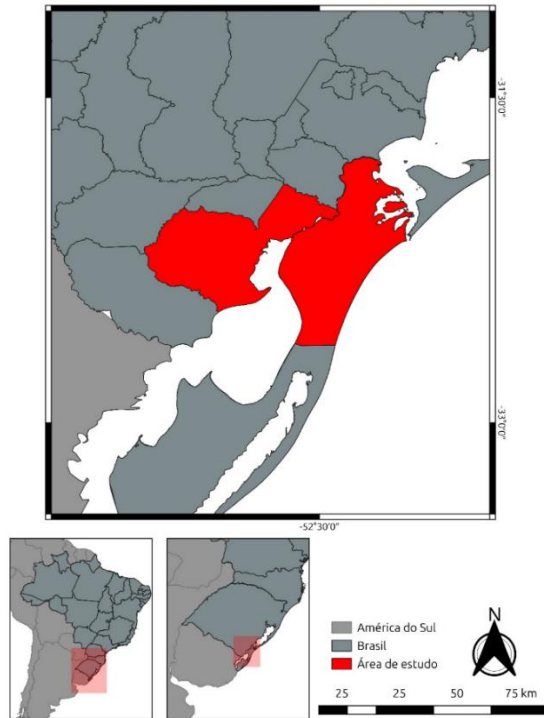
Figure legends

Fig. 1. South American map, with a highlight for Brazil, the State of Rio Grande do Sul, in Southern Brazil and the location of the study highlighted in red.

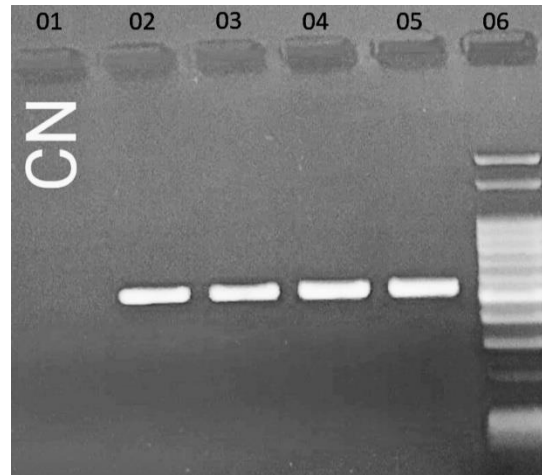


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis. The 529-bp PCR product of *Neorickettsia risticii* DNA. Note: 01 – Negative Control; 02 – Horse 01; 03 – Horse 02; 04 – Horse 03; 05 – Horse 04; 06 – Molecular Weight Marker.

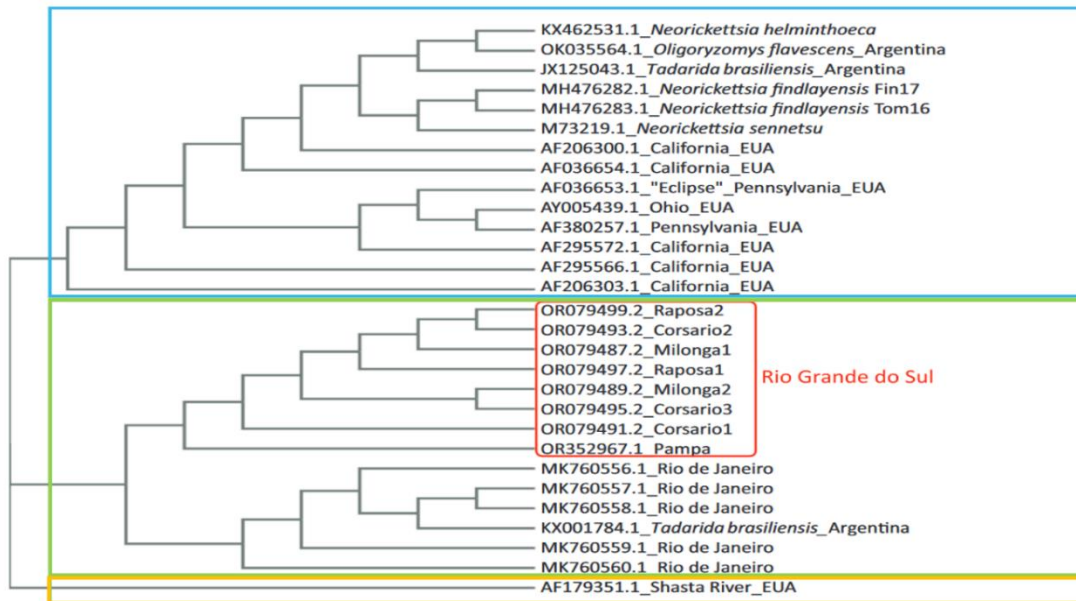


Fig. 3. Phylogenetic analysis. *Neorickettsia risticii* based on 16S rDNA sequence comparison. GenBank™ accession numbers are indicated alongside the sample names. The evolutionary history was inferred using the Maximum Likelihood method and the Kimura 2-parameter model.

	cov	pid	1 [
1 KX462531.1 <i>Neorickettsia</i>	100.0%	100.0%	-----AAGCGAACGGACTTTGACGCTGC
2 OR079499.2 <i>Raposa2</i>	38.4%	87.8%	-----TCTAGCGGTAGGCTTAACACATGCAAGCGAACGGAAATCAGGGCTGC
3 OR079489.2 <i>Milonga2</i>	38.3%	89.1%	-----TCTAGCGGTAGGCTTAACACATGCAAGCGAACGGAAATCAGGGCTGC
4 OR079487.2 <i>Milonga1</i>	38.1%	89.4%	-----CTAGCGGTAGGCTTAACACATGCAAGCGAACGGAAATCAGGGCTGC
5 OR079497.2 <i>Raposa1</i>	38.1%	89.2%	-----TCTAGCGGTAGGCTTAACACATGCAAGCGAACGGAAATCAGGGCTGC
6 OR079495.2 <i>Corsario3</i>	38.5%	88.7%	-----GATTTCTAGCGGTAGGCTTAACACATGCAAGCGAACGGAAATCAGGGCTGC
7 OR079493.2 <i>Corsario2</i>	38.0%	89.2%	-----TCTAGCGGTAGGCTTAACACATGCAAGCGAACGGAAATCAGGGCTGC
8 OR079491.2 <i>Corsario1</i>	38.3%	89.3%	-----TCTAGCGGTAGGCTTAACACATGCAAGCGAACGGAAATCAGGGCTGC
9 MH476282.1 <i>Neorickettsia</i>	99.9%	89.6%	-----CTCAGAAGCAACGCTCCCGGTAGGCTTAACACATGCAAGCGAACGGAAATCAAAGCTGC
10 MH476283.1 <i>Neorickettsia</i>	99.9%	89.6%	-----CTCAGAAGCAACGCTCCCGGTAGGCTTAACACATGCAAGCGAACGGAAATCAAAGCTGC
11 M73219.1 <i>Neorickettsia</i>	99.1%	90.5%	-----ATCAAAGCTGC
12 MK760556.1 <i>Rio_de_Janeiro</i>	99.8%	95.2%	-----CGAACGGAAATCAGGGCTGC
13 MK760559.1 <i>Rio</i>	99.8%	95.2%	-----CGAACGGAAATCAGGGCTGC
14 MK760560.1 <i>Rio</i>	99.9%	94.9%	-----ATGCAAGCGAACGGAAATCAGGGCTGC
15 JX125043.1 <i>Tadarida</i>	23.0%	96.7%	-----
16 MK760557.1 <i>Rio</i>	98.9%	95.5%	-----CGAACGGAAATCAGGGCTGC
17 MK760558.1 <i>Rio</i>	98.3%	95.5%	-----GAATCAGGGCTGC
18 KX001784.1 <i>Tadarida</i>	98.9%	95.5%	-----CGAACGGAAATCAGGGCTGC
19 OK035564.1 <i>Oligoryzomys</i>	23.0%	96.7%	-----
20 AF036653.1 "Eclipse" <i>Pennsylvania_EUA</i>	99.9%	89.3%	-----CTAGCGGTAGGCTTAACACATGCAAGCGAACGGAAATCAGGGCTGC
21 AY005439.1 <i>Ohio_EUA</i>	99.9%	86.7%	-----CTCAGAAGCAACGCTAGCGGTAGGCTTAACACATGCAAGCGAACGGAAATCAGGGCTGC
22 AF380257.1 <i>Pennsylvania_EUA</i>	99.8%	87.0%	ATTTGAGAGTTTTGATCCTGGCTCAGAAGCAACGCTAGCGGTAGGCTTAACACATGCAAGCGAACGGAAATCAGGGCTGC
23 AF206300.1 <i>California_EUA</i>	99.9%	84.5%	ATTTGAGAGTTTTGATCCTGGCTCAGAAGCAACGCTAGCGGTAGGCTTAACACATGCAAGCGAACGGAAATCAGGGCTGC
24 AF036654.1 <i>California_EUA</i>	99.9%	87.5%	ATTTGAGAGTTTTGATCCTGGCTCAGAAGCAACGCTAGCGGTAGGCTTAACACATGCAAGCGAACGGAAATCAGGGCTGC
25 OR352967.1 <i>Pampa</i>	38.1%	90.0%	-----TCTAGCGGTAGGCTTAACACATGCAAGCGAACGGAAATCAGGGCTGC
26 AF295572.1 <i>California_EUA</i>	38.1%	90.2%	-----CTAGCGGTAGGCTTAACACATGCAAGCGAACGGAAATCAGGGCTGC
27 AF295566.1 <i>California_EUA</i>	38.1%	90.2%	-----CTAGCGGTAGGCTTAACACATGCAAGCGAACGGAAATCAGGGCTGC
28 AF206303.1 <i>California_EUA</i>	38.1%	90.2%	-----CTAGCGGTAGGCTTAACACATGCAAGCGAACGGAAATCAGGGCTGC
29 AF179351.1 <i>Shasta</i>	38.1%	90.2%	-----CTAGCGGTAGGCTTAACACATGCAAGCGAACGGAAATCAGGGCTGC

Fig. 6. Percentage of similarity. *Neorickettsia risticii* similarity among all samples from this study is highlighted in red, using the *Neorickettsia helminthoeca* sample (KX462531.1) as the reference. The eight samples sequenced in the present study are highlighted in blue. Obs. Reference KX462531.1 *N. helminthoeca*.

4 Considerações Finais

Essa pesquisa buscou relacionar os sinais clínicos apresentados por equinos sob suspeita de NE com parâmetros bioquímicos e hematológicos apresentados por eles, bem como a realização do diagnóstico definitivo da doença, que, a partir da análise da Nested PCR, associada ao sequenciamento genético, permitiu a confirmação dos amplicómeros nas amostras de *N. risticii* encontradas infectando equinos sintomáticos. Esse resultado evidencia a possibilidade de diagnosticar a NE pela análise de amostras sanguíneas, utilizando a Nested PCR, além de confirmar sua circulação no extremo Sul do RS – Brasil.

O sequenciamento de amostras de *Neorickettsia risticii* oriundas do extremo Sul do Brasil realizado neste estudo, enriquece o pequeno grupo de sequências brasileiras já depositadas no Genbank™ e o agrupamento filogenético do fragmento do gene 16S rRNA permitiu iniciar uma caracterização parcial da espécie *N. risticii* cujas amostras apresentaram estreita similaridade entre si e com as demais regiões do Brasil, Argentina, Estados Unidos e Canadá. Espera-se que o estudo filogenético iniciado possa trazer subsídios para futuras investigações sobre o impacto causado devido à presença deste agente para saúde animal no plantel equino brasileiro.

Além disso, a ausência de gastrópodes e cavalos assintomáticos positivos para *Neorickettsia risticii* não descarta a circulação deste agente na população dos invertebrados e equinos presentes na região do estudo, uma vez que evidências moleculares indicam a existência do patógeno nesta localidade.

A realização de acompanhamento sorológico periódico das manadas oriundas de regiões endêmicas, possibilitaria a delimitação de áreas de risco, tornando-se medida profilática ao aparecimento de novos casos, principalmente ao introduzir animais à propriedade.

Estudos complementares com maior amostragem, testagem pareada de amostras de sangue e fezes se fazem necessários para que seja possível aumentar a sensibilidade e especificidade do teste, sequenciando e comparando as cepas encontradas com aquelas já existentes, possibilitando uma melhor compreensão da distribuição geográfica e prevalência da *Neorickettsia* spp., causadora da Neorickettsiose Equina.

Isolar e caracterizar amostras de *N. risticii* de diversas localizações geográficas pode colaborar no desenvolvimento de medidas preventivas mais eficazes.

Compreende-se como relevante que a partir desta pesquisa, futuras investigações abrangendo mais espécimes analisem a sensibilidade e especificidade no diagnóstico da NE através de PCR em tempo real, tornando o diagnóstico molecular uma rotina, aumentando a velocidade de entrega de resultados e dando início a pesquisa na área proteômica (p51) no Rio Grande do Sul, objetivando o desenvolvimento da primeira vacina brasileira, desenvolvida a partir de cepas locais, próprias da região acometida, que seja eficaz e imunize as manadas em áreas de potencial risco. A inclusão de antígenos imunoprotetores, derivados de espécies de *Neorickettsia* oriundas da mesma localidade, possibilita o aumento da eficácia de vacinas contra a NE.

Este trabalho relata os primeiros sequenciamentos genéticos desenvolvidos a partir de amostras de origem equina no extremo sul do Brasil, e demarca o início dos estudos filogenéticos de *N. risticii* nessa região. Possibilitou a realização do diagnóstico da NE, bem como a verificação de similaridade existente entre as amostras coletadas e cepas de outras regiões do mundo. Porém, mais estudos periódicos e com amostragens maiores são necessários para elucidar a real ocorrência da NE no RS, além da importância em analisar equinos de outras regiões do estado e determinar fatores e regiões relacionadas à ocorrência de contaminação por *N. risticii*.

Os resultados aqui obtidos proporcionaram conhecimentos importantes, que contribuem para o esclarecimento da etiologia e epidemiologia do da NE no RS. As informações obtidas servem de base para nortear novas pesquisas científicas voltadas a estudos epidemiológicos, clínico-patológicos e terapêuticos. O trabalho colaborou para a disponibilização e adoção de técnicas moleculares para fins de pesquisa na UFPel-RS. A execução do projeto contribuiu ainda para o treinamento e capacitação na técnica de sequenciamento de amostras de DNA, possibilitando avanços importantes no conhecimento científico sobre a natureza dos microrganismos.

Referências

- ALLSOPP, M. T. E. P.; ALLSOPP, B. A. Extensive genetic recombination occurs in the field between different genotypes of *Ehrlichia ruminantium*. **Veterinary Microbiology**, v. 124, n. 1-2, p. 58-65, 2007.
- ARROYO, L. G. *et al.* Potomac horse fever in Ontario: Clinical, geographic, and diagnostic aspects. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 62, n. 6, p. 622, 2021.
- ATWILL, E. R. *et al.* Retrospective evaluation of factors associated with the risk of seropositivity to *Ehrlichia risticii* in horses in New York State. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 10, p. 1931-1934, 1992.
- ATWILL, E. R.; MOHAMMED, H. O.; LOPEZ, J. W. Evaluation of travel and use as a risk factor for seropositivity to *Ehrlichia risticii* in horses of New York state. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 3, p. 272-277, 1996.
- BAIRD, J. D.; ARROYO, L. G. Historical aspects of Potomac horse fever in Ontario (1924–2010). **The Canadian Veterinary Journal**, v. 54, n. 6, p. 565, 2013.
- BARLOUGH, J. E.; RIKIHISA, Y.; MADIGAN, J. E. Nested polymerase chain reaction for detection of *Ehrlichia risticii* genomic DNA in infected horses. **Veterinary parasitology**, v. 68, n. 4, p. 367-373, 1997.
- BERTIN, F. R. *et al.* Clinical and clinicopathological factors associated with survival in 44 horses with equine neorickettsiosis (Potomac horse Fever). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, n. 6, p. 1528-1534, 2013.
- BISWAS, B. *et al.* Diagnostic application of polymerase chain reaction for detection of *Ehrlichia risticii* in equine monocytic ehrlichiosis (Potomac horse fever). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 10, p. 2228-2233, 1991.
- CARRET, C. *et al.* *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 298-301, 1999.
- CHAICHANASIRIWITHAYA, W. *et al.* Antigenic, morphologic, and molecular characterization of new *Ehrlichia risticii* isolates. **Journal Clinical Microbiology**, v. 32, p.3026-3033, 1994.
- CICUTTIN, G. L. *et al.* Detection of *Neorickettsia* sp. in *Oligoryzomys flavescens* rodent from a protected urban area in Buenos Aires City (Argentina). **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 32, p. 100742, 2022.

CICUTTIN, G. L. *et al.* Molecular detection of *Neorickettsia risticii* in Brazilian free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*) from Buenos Aires, Argentina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 648-650, 2013.

CICUTTIN, G. L. *et al.* *Neorickettsia risticii*, *Rickettsia sp.* and *Bartonella sp.* in *Tadarida brasiliensis* bats from Buenos Aires, Argentina. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 52, p. 1-5, 2017.

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

COIMBRA, H. S. *et al.* Diarreia 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, 1999, Gramado, RS. **Anais...** Gramado: v.1, 1999. p. 200, 1999.

COIMBRA, H. S. *et al.* Ehrlichiose monocítica eqüina no Rio Grande do Sul: aspectos clínicos, anátomo-patológicos e epidemiológicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, p. 97-101, 2006.

COIMBRA, H. S. *et al.* *Neorickettsia (Ehrlichia) risticii* no Sul do Brasil: *Heleobia spp.* (*Mollusca: Hydrobilidae*) e *Parapleurolophocecous cercariae* (*Trematoda: Digenea*) como possíveis vetores. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 325-329, 2005.

CORDES, D. O. *et al.* Enterocolitis caused by *Ehrlichia sp.* in the horse (Potomac horse fever). **Veterinary Pathology**, v. 23, n. 4, p. 471-477, 1986.

COSTA, E. *et al.* Panorama da equinocultura no Rio Grande do Sul. **A Hora Veterinária**, v. 196, p. 45-49, 2013.

DENOTTA, S.L.; DIVERS, T. J. Clinical pathology in the adult sick horse: the gastrointestinal system and liver. **Veterinary Clinics: Equine Practice**, v. 36, n. 1, p. 105-120, 2020.

DUMLER, J. S. *et al.* Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 51, n. 6, p. 2145-2165, 2001.

DUTRA, F. *et al.* Equine monocytic Ehrlichiosis (Potomac horse fever) in horses in Uruguay and southern Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, n. 5, p. 433-437, 2001.

DUTTA, S. K. *et al.* Disease features in horses with induced equine monocytic ehrlichiosis (Potomac horse fever). **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 10, p. 1747-1751, 1988.

DUTTA, S. K. *et al.* Experimental reproduction of Potomac horse fever in horses with a newly isolated Ehrlichia organism. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 22, n. 2, p. 265-269, 1985.

DUTTA, S. K.; VEMULAPALLI, R.; BISWAS, B. Association of deficiency in antibody response to vaccine and heterogeneity of *Ehrlichia risticii* strains with Potomac horse fever vaccine failure in horses. **Journal of clinical microbiology**, v. 36, n. 2, p. 506-512, 1998.

FERRÃO, C. M. *et al.* Equine Monocytic Ehrlichiosis (EME) in Rio de Janeiro State, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1575-1578, 2007.

GIBSON, K. E. *et al.* *Neorickettsia risticii* is vertically transmitted in the trematode *Acanthatrium oregonense* and horizontally transmitted to bats. **Environmental microbiology**, v. 7, n. 2, p. 203-212, 2005.

GREIMAN, S. E.; TKACH, V. V.; VAUGHAN, J. A. Transmission rates of the bacterial endosymbiont, *Neorickettsia risticii*, during the asexual reproduction phase of its digenean host, *Plagiorchis elegans*, within naturally infected lymnaeid snails. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2013.

HELLER, M. C. *et al.* Two cases of *Neorickettsia (Ehrlichia) risticii* infection in horses from Nova Scotia. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 45, n. 5, p. 421, 2004.

HOLLAND, C. J. *et al.* Isolation, experimental transmission, and characterization of causative agent of Potomac horse fever. **Science**, v. 227, n. 4686, p. 522-524, 1985.

LIMA, R.A. S.; CINTRA, A. G. **Revisão do estudo do complexo do agronegócio do cavalo**. Brasília: MAPA, 2016, 56p.

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.

LUNA, S. P. L. Interpretação de exames laboratoriais. Diagnóstico em cólica equina. In: FORUM DE GASTROENTEROLOGIA EQUINA, I., 1994, Curitiba. **Anais...** Curitiba CBCAV, 1994. p. 38-48.

MADIGAN, J. E. *et al.* 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, n. 4, p. 275-279, 2000.

MARCOLONGO-PEREIRA, C. *et al.* Doenças de equinos na região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, p. 205-210, 2014.

MARQUES, L. C. Equilíbrio hídrico-eletrolítico. Cólica Equina II: Diagnóstico e tratamento. In: CICLO DE PALESTRAS SOBRE CÓLICA EQUINA, II., 1990, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal, 1990. (Bol. Tec. p.47-70).

- MARTIN, K. J.; RYGIWICZ, P. T. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. **BMC microbiology**, v. 5, n. 1, p. 1-11, 2005.
- MARUTANI, V. H. B.; HEADLEY, S. A.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Putative equine neorickettsiosis in a mare from Southern Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 47, 2019.
- MCKENZIE, H. C. *et al.* Immunogenicity of Potomac horse fever vaccine when simultaneously co-administered with rabies vaccine in a multivalent vaccine or as two monovalent vaccines at separate sites. **Equine Veterinary Journal**, v. 51, n. 6, p. 774-778, 2019.
- MOREIRA, L. M. C. *et al.* Frequency of Equine Monocytic Ehrlichiosis (EME) in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 6, p. 697-699, 2013.
- MOTT, J. *et al.* Comparison of PCR and culture to the indirect fluorescent-antibody test for diagnosis of Potomac horse fever. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 9, p. 2215-2219, 1997.
- PALMER, J. E. Potomac horse fever. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 9, n. 2, p. 399-410, 1993.
- PALMER, J. E. Prevention of Potomac horse fever. **The Cornell Veterinarian**, v. 79, n. 3, p. 201-205, 1989.
- PALMER, J. E.; BENSON, C. E.; WHITLOCK, R. H. Effect of treatment with oxytetracycline during the acute stages of experimentally induced equine ehrlichial colitis in ponies. **American journal of veterinary research**, v. 53, n. 12, p. 2300-2304, 1992.
- PALMER, J. E.; WHITLOCK, R. H.; BENSON, C. E. Equine ehrlichial colitis (Potomac horse fever): recognition of the disease in Pennsylvania, New Jersey, New York, Ohio, Idaho, and Connecticut. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 189, n. 2, p. 197-199, 1986.
- PAULINO, P. G. *et al.* Detection of *Neorickettsia risticii*, the agent of Potomac horse fever, in horses from Rio de Janeiro, Brazil. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 7208, 2020.
- PIEREZAN, F. *et al.* Achados de necropsia relacionados com a morte de 335 equinos: 1968-2007. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 275-280, 2009.
- PIMENTEL, L. A. *et al.* Doenças do sistema nervoso central de equídeos no semi-árido. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 589-597, 2009.
- PRETZMAN, C. T.; RIKIHISA, Y; RALPH, D. Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting Potomac horse fever disease, **Journal of Clinical Microbiology**, v.25, p.31, 1987.

- PROUDMAN, C. J. *et al.* Pre-operative and anaesthesia-related risk factors for mortality in equine colic cases. **The veterinary journal**, v. 171, n. 1, p. 89-97, 2006.
- PUSTERLA, N. *et al.* 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. *et al.* 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, n. 3, p. 1293-1297, 2000.
- PUSTERLA, N. *et al.* Infection rate of *Ehrlichia risticii*, the agent of Potomac horse fever, in freshwater stream snails (*Juga yrekaensis*) from northern California. **Veterinary Parasitology**, v. 92, n. 2, p. 151-156, 2000.
- REICHMANN, P.; DEARO, A. C. O.; RODRIGUES, T. C. Ocorrência de doenças oftalmológicas em equinos utilizados para tração urbana na cidade de Londrina, PR. **Ciência Rural**, v. 38, p. 2525-2528, 2008.
- RIKIHISA, Y. *et al.* Analysis of p51, groESL, and the major antigen P51 in various species of *Neorickettsia*, an obligatory intracellular bacterium that infects trematodes and mammals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 8, p. 3823-3826, 2004.
- RIKIHISA, Y. *et al.* Loss of absorptive capacity for sodium and chloride in the colon causes diarrhoea in Potomac horse fever. **Research in Veterinary Science**, v. 52, n. 3, p. 353-362, 1992.
- RIKIHISA, Y. Protection against murine Potomac horse fever by an inactivated *Ehrlichia risticii* vaccine. **Veterinary Microbiology**, v. 27, n. 3-4, p. 339-350, 1991.
- RIKIHISA, Y. The “biological weapons” of *Ehrlichia chaffeensis*: novel molecules and mechanisms to subjugate host cells. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 830180, 2022.
- RIKIHISA, Y.; PERRY, B. D.; CORDES, D. O. Ultrastructural study of ehrlichial organisms in the large colons of ponies infected with Potomac horse fever. **Infection and Immunity**, v. 49, n. 3, p. 505-512, 1985.
- ROIER, S. *et al.* A novel mechanism for the biogenesis of outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria. **Nature communications**, v. 7, n. 1, p. 10515, 2016.
- RUBY, R.; MAGDESAN, K. G.; KASS, P. H. Comparison of clinical, microbiologic, and clinicopathologic findings in horses positive and negative for *Clostridium difficile* infection. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 234, n. 6, p. 777-784, 2009.
- SANCHEZ, L. C. Disorders of the gastrointestinal system. In: REED, S. M. *et al.* (eds.) **Equine Internal Medicine**. 4th ed. Amsterdam: ELSEVIER, 2018. p. 709-842.

SCHILD, A.L. *et al.* Doenças diagnosticadas pelo Laboratório Regional de Diagnóstico no ano de 2012 e comentários sobre algumas doenças. **Boletim do Laboratório Regional de Diagnóstico**, v. 35, Pelotas. 63p.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B. M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 846-849, 1994.

TEYMOURNEJAD, O. *et al.* Isolation and molecular analysis of a novel *Neorickettsia* species that causes Potomac horse fever. **Mbio**, v. 11, n. 1, p. 10.1128/mbio.03429-19, 2020.

THIRUMALAPURA, N. R. *et al.* Improved molecular detection of *Neorickettsia risticii* with a duplex real-time PCR assay in the diagnosis of Potomac horse fever. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 35, n. 1, p. 62-66, 2023.

TROTTE, M. N. S. *et al.* Histopatologia de lesões tumoriformes presentes na cavidade nasal de equídeos do Brasil. **Ciência Rural**, v. 38, p. 2535-2539, 2008.

UZAL, F. A.; DIAB, S. S. Gastritis, enteritis, and colitis in horses. **Veterinary Clinics: Equine Practice**, v. 31, n. 2, p. 337-358, 2015.

UZAL, F. A.; PLATTNER, B. L.; HOSTETTER, J. M. Alimentary system. In: MAXIE, M. G. (Ed). Jubb, Kennedy, and **Palmer's Pathology of Domestic Animals**. 6th ed. v. 2. Amsterdam: ELSEVIER, 2016. p. 1-257.

VAUGHAN, J. A.; TKACH, V.V.; GREIMAN, S. E. Neorickettsial endosymbionts of the digenea: diversity, transmission and distribution. **Advances in Parasitology**, v. 79, p. 253-297, 2012.

Anexos

Anexo A - Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais

Certificamos que a proposta intitulada “**Efeito da administração precoce de omeprazol associado a anti-inflamatório não esteroidal em equinos**”, registrada com o nº 23110.021700/2021-29, sob a responsabilidade de **Carlos Eduardo Wayne Nogueira** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética no Uso de Animais, em reunião de **15 de setembro de 2021**.

Finalidade	(x) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	Início = 01/ 10/ 2021 Término = 01/ 11/ 2023
Espécie/linhagem/raça	Equina / SRD
Nº de animais	24
Idade	1 - 4 anos
Sexo	12 machos 12 fêmeas
Origem	Centro de Ensino e Experimentação Animal da Palma - UFPel

Código para cadastro nº CEUA **021700/2021-29**

Anexo B - Sequências Genbank™

AMERICA DO SUL:

AF 380257 Ohio

AY 005439 Ohio

BRASIL:

AF 036653 Pennsylvania

RS:

OR 352967

OR 079487

OR 079489

OR 079491

OR 079493

OR 079495

OR 079497

OR 079499

CANADÁ:

NZ_CP047224 (*N. findlayensis* Fin17)

N. sennetsu:

M73219 Miyayama Japan

NR044746 Miyayama Japan

NR074386 Miyayama Japan

N. helminthoeca

KX462531 Georgia USA

NZ_CP00748.1 Oregon

RJ:

MK 760556

MK 760559

MK 760560

MK 760557

MK 760558

ARGENTINA:

JX 125043 (argentine *N. risticii*)

KX 001784 (Buenos Aires)

OK 041503 (Buenos Aires)

AMERICA DO NORTE:

EUA:

CP 001431 Illinois strain

NC_013009.1 Illinois

NR074389 Illinois

Anexo C - Sequências Genbank™ de Amostras Utilizadas na Construção da Árvore Filogenética

ID	bp	Definição	Autores	Título	Espécies	Data	Local
OR352967.1	529 bp	Uncultured Neorickettsia sp. clone Pampa1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Martins, K.R., Silva, J.G., Cunha, R.C., Schuch, L.F..	Detection and sequencing of Neorickettsia risticii16s rRNA isolated from horse blood in Rio Grande do Sul, Brazil	Equus caballus	01/08/2023	RS- Brasil
OR079487.2	527 bp	Neorickettsia risticii isolate Neorickettsia_risticii_ER2A_Milonga1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Martins, K.R., Silva, J.G., Cunha, R.C., Schuch, L.F..	Detection and sequencing of Neorickettsia risticii16s rRNA isolated from horse blood in Rio Grande do Sul, Brazil	Equus caballus	29/06/2023	RS- Brasil
OR079491.2	531 bp	Neorickettsia risticii isolate Neorickettsia_risticii_ER2A_Corsario 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Martins, K.R., Silva, J.G., Cunha, R.C., Schuch, L.F..	Detection and sequencing of Neorickettsia risticii16s rRNA isolated from horse blood in Rio Grande do Sul, Brazil	Equus caballus	29/06/2023	RS- Brasil
OR079497.2	529 bp	Neorickettsia risticii isolate Neorickettsia_risticii_ER2A_Raposa1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Martins, K.R., Silva, J.G., Cunha, R.C., Schuch, L.F..	Detection and sequencing of Neorickettsia risticii16s rRNA isolated from horse blood in Rio Grande do Sul, Brazil	Equus caballus	29/06/2023	RS- Brasil
OR079499.2	533 bp	Neorickettsia risticii isolate Neorickettsia_risticii_ER2A_Raposa2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Martins, K.R., Silva, J.G., Cunha, R.C., Schuch, L.F..	Detection and sequencing of Neorickettsia risticii16s rRNA isolated from horse blood in Rio Grande do Sul, Brazil	Equus caballus	29/06/2023	RS- Brasil
OR079493.2	527 bp	Neorickettsia risticii isolate Neorickettsia_risticii_ER2A_Corsario 2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Martins, K.R., Silva, J.G., Cunha, R.C., Schuch, L.F..	Detection and sequencing of Neorickettsia risticii16s rRNA isolated from horse blood in Rio Grande do Sul, Brazil	Equus caballus	29/06/2023	RS- Brasil
OR079489.2	531 bp	Neorickettsia risticii isolate Neorickettsia_risticii_ER2A_Milonga2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Martins, K.R., Silva, J.G., Cunha, R.C., Schuch, L.F..	Detection and sequencing of Neorickettsia risticii16s rRNA isolated from horse blood in Rio Grande do Sul, Brazil	Equus caballus	29/06/2023	RS- Brasil
OR079495.2	538 bp	Neorickettsia risticii isolate Neorickettsia_risticii_ER2A_Corsario 3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Martins, K.R., Silva, J.G., Cunha, R.C., Schuch, L.F..	Detection and sequencing of Neorickettsia risticii16s rRNA isolated from horse blood in Rio Grande do Sul, Brazil	Equus caballus	29/06/2023	RS- Brasil
MH476282.1	1405 bp	Neorickettsia findlayensis strain Fin17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Teymournejad, O., Lin, M., Bekebrede, H., Kamr, A., Toribio, R.E., Arroyo, L.G., Baird, J.D.; Rikihisa, Y.	Isolation and Molecular Analysis of a Novel Neorickettsia Species That Causes Potomac Horse Fever	horse blood	13/08/2020	Ohio – USA
MK760556.1	1322 bp	Neorickettsia risticii isolate 001 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Paulino, P.G., Santos, H.A., Baldani, C.D., Guimaraes, A, Massard, C.L., Oliveira, R.R., Almosny, N.R.	First molecular detection of Neorickettsia risticii in horses from the state of Rio de Janeiro, Brazil	Equus caballus	13/04/2019	RJ – Brasil

MK760559.1	1322 bp	Neorickettsia risticii isolate 004 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Paulino, P.G., Santos, H.A., Baldani, C.D., Guimaraes, A., Massard, C.L., Oliveira, R.R., Almosny, N.R.	First molecular detection of Neorickettsia risticii in horses from the state of Rio de Janeiro, Brazil	Equus caballus	13/04/2019	RJ – Brasil
MK760560.1	1328 bp	Neorickettsia risticii isolate 005 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Paulino, P.G., Santos, H.A., Baldani, C.D., Guimaraes, A., Massard, C.L., Oliveira, R.R., Almosny, N.R.	First molecular detection of Neorickettsia risticii in horses from the state of Rio de Janeiro, Brazil	Equus caballus	13/04/2019	RJ – Brasil
MK760557.1	1309 bp	Neorickettsia risticii isolate 002 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Paulino, P.G., Santos, H.A., Baldani, C.D., Guimaraes, A., Massard, C.L., Oliveira, R.R., Almosny, N.R.	First molecular detection of Neorickettsia risticii in horses from the state of Rio de Janeiro, Brazil	Equus caballus	13/04/2019	RJ – Brasil
MK760558.1	1301 bp	Neorickettsia risticii isolate 003 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Paulino, P.G., Santos, H.A., Baldani, C.D., Guimaraes, A., Massard, C.L., Oliveira, R.R., Almosny, N.R.	First molecular detection of Neorickettsia risticii in horses from the state of Rio de Janeiro, Brazil	Equus caballus	13/04/2019	RJ – Brasil
KX462531.1	1324 bp	Neorickettsia helminthoeca 16S ribosomal RNA gene, complete	Greiman, S.E., Kent, M.L., Betts, J., Cochell, D., Sigler, T., Tkach, V.V.	Nanophyetus salmincola, vector of the salmon poisoning disease Bacteria; Pseudomonadota; Alphaproteobacteria; Rickettsiales; Anaplasmataceae; Neorickettsia	Canis lupus familiaris	31/08/2017	USA
KX001784.1	1309 bp	Neorickettsia risticii strain 812 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Cicuttin, G.L., Greiman, S.E.	Phylogenetic characterization of Neorickettsia risticii detected in bats Tadarida brasiliensis, Buenos Aires	Tadarida brasiliensis	17/07/2016	Buenos Aires, Argentina
M73219.1	1377 bp	Neorickettsia sennetsu strain Miyayama 16S ribosomal RNA, partial sequence	Anderson, B.E., Dawson, J.E., Jones, D.C., Wilson, K.H.	Ehrlichia chaffeensis, a new species associated with human ehrlichiosis	type strain of Neorickettsia sennetsu	13/11/2013	USA
JX125043.1	305 bp	Uncultured Neorickettsia sp. clone M6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Cicuttin, G.L., Boeri, E.J., Beltran, F.J., Gury Dohmen, F.E.	Molecular detection of Neorickettsia risticii in Brazilian free-tailed bats (Tadarida brasiliensis) from Buenos Aires, Argentina	Tadarida brasiliensis	12/06/2013	Buenos Aires, Argentina
AF295572.1	527 bp	Neorickettsia risticii 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Chae, J.S., Pusterla, N., Johnson, E., Derock, E., Lawler, S.P., Madigan, J.E.	Infection of aquatic insects with trematode metacercariae carrying Ehrlichia risticii, the cause of Potomac horse fever	mayfly nymph (Ephemeroptera, Heptageniidae, Heptagenia)"	20/08/2010	California – USA
AF295566.1	527 bp	Neorickettsia risticii 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Chae, J.S., Pusterla, N., Johnson, E., Derock, E., Lawler, S.P., Madigan, J.E.	Infection of aquatic insects with trematode metacercariae carrying Ehrlichia risticii, the cause of Potomac horse fever	stonefly nymph (Plecoptera, Perlodidae, Skwala)	20/08/2010	California – USA
AF380257.1	1448 bp	Ehrlichia risticii from horse 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	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	horse 1	23/04/2002	Ohio – USA

AF206303.1	527 bp	Ehrlichia risticii from Caddisfly larvae 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Chae, J.S., Pusterla, N., Johnson, E., Derock, E., Lawler, S.P.; Madigan, J. E	Infection of aquatic insects with trematode metacercariae carrying Ehrlichia risticii, the cause of Potomac horse fever	Caddisfly larvae (Trichoptera; Limnephilidae; Dicosmoecus)"	03/09/2000	California – USA
AF206300.1	1495 bp	Ehrlichia risticii from Caddisfly larvae 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Chae, J.S., Pusterla, N., Johnson, E., Derock, E., Lawler, S.P., Madigan, J.E.	Infection of aquatic insects with trematode metacercariae carrying Ehrlichia risticii, the cause of Potomac horse fever	Caddisfly larvae	03/09/2000	California – USA
AY005439.1	1455 bp	Ehrlichia risticii isolate S22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Kanter, M., Mott, J., Ohashi, N., Fried, B., Reed, S., Lin, Y.C., Rikihisa, Y.	Analysis of the 16S rRNA and the 51-kDa antigen gene and transmission in mice of Ehrlichia risticii in Virgulate Trematodes from Elimia viviparans snails in Ohio	snail	01/09/2000	Ohio – USA
AF179351.1	527 bp	Ehrlichia risticii strain Shasta 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	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	cercariae infected snail	14/03/2000	California – USA
AF036654.1	1443 bp	Ehrlichia risticii 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	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	Juga/snail	15/12/1999	California – USA
AF036653.1	1410 bp	Ehrlichia risticii 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	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	Eclipse/horse/Pensylvania	15/12/1999	California – USA
OK035564.1	305 bp	Neorickettsia risticii isolate R153 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Cicuttin, G.L., Salvo, M.N., Herculini, C., Aristegui, E., Bruno, A., Brambati, D., Nava, S.	Detection of Neorickettsia sp. in Oligoryzomys flavescens rodent from a protected urban area in Buenos Aires City (Argentina)	Oligoryzomys flavescens	01-FEB-2022	Argentina
MH476283.1	1405	Neorickettsia findlayensis strain Tom16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Teymournejad, O., Lin, M., Bekebrede, H., Kamr, A., Toribio, R.E., Arroyo, L.G., Baird, J.D., Rikihisa, Y.	Isolation and Molecular Analysis of a Novel Neorickettsia Species That Causes Potomac Horse Fever	horse blood - "Tom16"	13/08/2020	Ohio - USA – Canada