

Ehrlichiose monocítica eqüina no Rio Grande do Sul: aspectos clínicos, anátomo-patológicos e epidemiológicos¹

Helen S. Coimbra², Cristina G. Fernandes³, Mauro P. Soares³, Mário Carlos A. Meireles², Roberto Radamés² e Luiz Filipe D. Schuch^{4*}

ABSTRACT.- Coimbra H.S., Fernandes C.G., Soares M.P., Meireles M.C.A., Radamés R. & Schuch L.F.D. 2006. [Equine monocytic Ehrlichiosis in Rio Grande do Sul: clinical, pathological and epidemiological aspects.] Ehrlichiose monocítica eqüina no Rio Grande do Sul: aspectos clínicos, anátomo-patológicos e epidemiológicos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 26(2):97-101. Laboratório de Doenças Infecciosas, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, Pelotas, RS 96010-900, Brazil. E-mail: bitoxu@ig.com.br

A spontaneous outbreak of equine monocytic Ehrlichiosis (EME) is described. The disease occurred from November 2001 to February 2002 on a farm in the municipality of Arroio Grande, located at the western edge of the Mirim Lake, state of Rio Grande do Sul. Out of 50 horses 13 were affected and 6 died. The morbidity was 26% and the mortality 46.1%. The affected horses were 1-5 years old. The most important clinical sign was a profuse acute diarrhea. At necropsy of a horse that died with clinical signs of the disease, the main alterations were characterized by hemorrhagic areas of the mucosa of the large intestine with liquid contents, and congested and hemorrhagic areas alternating with normal areas as well as nodules with purulent secretion in the mucosa of the small intestine. The histological changes were characterized by moderate mononuclear infiltration of the mucosa, characterizing a lympho-histiocytic enteritis with predominance of macrophages. In the jejunum and ileum, related to the invagination of crypts and villi, a granulomatous enteritis was observed. To confirm the diagnosis of infection by *Neorickettsia (Ehrlichia) risticii*, blood samples of seven affected horses were taken and a polymerase chain reaction (PCR) was performed. Three tested blood samples were positive (42.8%) with observation of a band of 529pb characteristic of *N. risticii*.

INDEX TERMS: *Neorickettsia (Ehrlichia) risticii*, equine monocytic Ehrlichiosis.

RESUMO.- Descreve-se um surto natural de Ehrlichiose monocítica eqüina (EME) ocorrido nos meses de novembro/2001 a fevereiro/2002, em uma propriedade no município de Arroio Grande, localizado à margem oeste da Lagoa Mirim, Rio Grande do Sul. De um total de 50 eqüinos, 13 foram afetados pela enfermidade e seis morreram. A morbidade foi de 26% e a letalidade 46,1%. Os animais acometidos tinham idades entre um e cinco anos e o quadro clínico mais evidente foi o desenvolvimento de diarréia aguda aquosa e profusa. Um dos animais que morreram

foi necropsiado e as lesões observadas localizavam-se principalmente no trato intestinal, caracterizando-se por intestino grosso com conteúdo líquido e áreas hemorrágicas difusas na mucosa. Em todo o segmento de intestino delgado observaram-se áreas com mucosa congesta e hemorrágica alternadas com áreas de mucosa normal. Na mucosa de jejuno e íleo observou-se a presença de nódulos contendo secreção purulenta. Os achados histológicos em todo trato intestinal caracterizaram-se pela presença de discreto infiltrado mononuclear restrito a mucosa do órgão, caracterizando uma enterite linfo-histiocitária com predominância de macrófagos. No jejuno e íleo também havia regiões com lesões granulomatosas na lâmina própria, relacionadas a invaginações das criptas das vilosidades intestinais. Para o diagnóstico da infecção por *Neorickettsia (Ehrlichia) risticii* amostras de sangue de sete eqüinos doentes foram testados pela reação em cadeia da polimerase (PCR), resultando em três amostras positivas (42,8%) com a formação de uma banda de 529pb, típica para *N. risticii*.

¹ Recebido em 23 de fevereiro de 2005.

Aceito para publicação em 6 de dezembro de 2005.

² Laboratório de Doenças Infecciosas, Depto Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

³ Laboratório Regional de Diagnóstico, Faculdade Veterinária, UFPel.

⁴ Laboratório de Doenças Infecciosas, Depto Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, UFPel, Campus Universitário s/n, Pelotas, RS 96010-900. *Autor para correspondência. E-mail: bitoxu@ig.com.br

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Neorickettsia (Ehrlichia) risticii*, Ehrlichiose monocítica equina.

INTRODUÇÃO

A Ehrlichiose monocítica equina (EME) é uma doença infecciosa não contagiosa causada pela *Neorickettsia (Ehrlichia) risticii*. Esta enfermidade foi evidenciada no Estado de Maryland, Estados Unidos, em 1979, em região próxima ao Rio Potomac, sendo conhecida como a febre do cavalo de Potomac (Potomac horse fever) (Rikihisa & Perry 1985). Em outros países, como Canadá, França, Itália, Venezuela, Índia e Austrália, a EME foi evidenciada através de testes sorológicos (Palmer et al. 1986, Breider & Henton 1987, Rikihisa 1998).

A Ehrlichiose monocítica equina tem caráter endêmico e sazonal, com a ocorrência dos casos em áreas alagadiças, às margens de rios e lagos, nos meses mais quentes do ano (Atwill et al. 1992). No litoral sul do Rio Grande do Sul e no Uruguai, casos compatíveis com EME foram identificados em propriedades localizadas próximo às Lagoas Mirim e Mangueira, principalmente nos municípios de Santa Vitória do Palmar, Rio Grande e Arroio Grande (Coimbra et al. 1999, Dutra et al. 2001).

Todos os equinos são suscetíveis à doença, sendo que animais transportados para áreas endêmicas parecem ser suscetíveis a infecções mais graves do que aqueles nascidos nestas áreas (Atwill et al. 1992, Dutra et al. 2001). A transmissão oral é a principal forma de transmissão da *N. risticii*.

Com base na seqüência do gene que codifica para a porção 16S do RNA-ribossômico verificou-se uma forte identidade genética entre *N. risticii* e outras riquetsias como a *Neorickettsia (Ehrlichia) sennetsu*, *Neorickettsia helminthoeca* e o agente do *Stellantchasmus falcatus* (Agente SF) que sabidamente apresentam um padrão de transmissão oral intermediado por trematódeos. Dessa forma, foi sugerido que *N. risticii* acompanha este mesmo padrão de transmissão envolvendo trematódeos aquáticos (Wen et al. 1996, Barlough et al. 1998, Rikihisa, 1998, Kanter et al. 2000, Pusterla et al. 2000, Dumler et al. 2001). Caramujos existentes em regiões de ocorrência de EME nos Estados Unidos foram identificados como portadores de *N. risticii*, assim como as cercárias albergadas por eles, sendo considerados vetores desta riquetsia (Barlough 1998, Kanter et al. 2000, Pusterla et al. 2000). No Rio Grande do Sul, foram identificados caramujos do gênero *Heleobia* que albergavam cercárias do tipo *Parapleurolophocercus cercariae* como portadores de *N. risticii* (Coimbra 2003).

Os animais com EME podem desenvolver diarreia, febre, desidratação e anorexia, com variação do quadro clínico de leve a severo terminando com a morte dos animais (Rikihisa & Perry 1985, Ziemer et al. 1987). As alterações patológicas mais consistentes de EME são a presença de conteúdo fluido no cólon maior e ceco, e áreas de hiperemia com extensão e distribuição variáveis na mucosa do órgão. O conteúdo presente no intestino delgado varia de consistência mucosa a aquosa, com áreas da mucosa apresentando hiperemia e congestão, podendo ocorrer áreas com lesões intercaladas por áreas sem lesão (Cordes et al. 1986). As alterações microscópicas revelam uma enterocolite linfocitocitária, caracterizada por congestão, necrose epitelial superficial e infiltrado inflamatório mononuclear na lâmina própria e submucosa do ceco e cólon maior (Dutra et al. 2001).

Os objetivos deste trabalho foram relatar um surto natural de EME em animais recém introduzidos em uma área endêmica e caracterizar aspectos epidemiológicos, clínicos e descrever a patologia, bem como confirmar o diagnóstico pela técnica de PCR.

MATERIAL E MÉTODOS

Epidemiologia e sinais clínicos

O surto foi estudado em uma propriedade localizada no município de Arroio Grande, margem oeste da Lagoa Mirim, Rio Grande do Sul. Através de visitas a propriedade, foram obtidos dados epidemiológicos. Exames clínicos foram realizados de animais apresentados pelo proprietário como enfermos. Coletou-se sangue em tubo estéril com anticoagulante (EDTA 10%) desses animais para a pesquisa de *N. risticii* pela técnica de PCR.

Patologia

Necropsia de um dos animais que morreram foi realizada, coletando-se os órgãos das cavidades abdominal e torácica que foram fixados em formol tamponado a 10%, processados pelas técnicas de rotina e corados pela hematoxilina-eosina para estudo histológico das lesões. Para identificar a presença de *N. risticii* nas células do intestino grosso, fragmentos de 0,5cm foram fixados em glutaraldeído, incluídos em resina e cortes semifinos foram submetidos à coloração de azul de metileno.

Diagnóstico - Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Extração do DNA. Para pesquisa de *N. risticii* por PCR, primeiramente foi realizada a extração do DNA. O sangue coletado foi centrifugado durante 10 minutos a 3000 rpm (micro-centrífuga NT 80, Nova Técnica) para promover a separação dos elementos do sangue. Após a centrifugação, o plasma foi descartado e a capa flogística foi coletada e acondicionada em um recipiente estéril, contendo 2ml de PBS (pH 7,2). Após, 300ml deste material, foram colocados em tubo tipo "Eppendorff" com 300µl de água ultrapura estéril, durante 10 minutos em temperatura ambiente com a finalidade de lisar as hemácias restantes no meio. O material foi centrifugado e o sedimento foi ressuspenso em tampão de extração SE (EDTA 0,1 M (pH 8,0), NaCl 0,15M), adicionado de proteinase K (50mg/ml). A digestão da proteína foi realizada durante 10 minutos a 56 °C. A extração do DNA foi realizada pelo método fenol-clorofórmio. Após, o sedimento obtido foi seco em temperatura ambiente e ressuspenso em 100ml do tampão TE (Tris HCl 10mM (pH 7,4), EDTA 1mM pH 8,0) e acondicionado a -20°C até ser utilizado.

Nested PCR. A PCR foi direcionada para amplificar uma porção de 529pb do gene que codifica para o fragmento 16S do RNA-ribossômico da *N. risticii*. Foi realizado em duas etapas (nested PCR), utilizando-se um par de oligonucleotídeos (ER3: ATTTGAGAGTTTGATCCTGG e ER2: GTTTTAAATGCAGTTCTTGG) na primeira etapa e, na segunda etapa, outros dois oligonucleotídeos (ER3A: CTAGCGGTAGCGTTAAC; ER2A: CACACCTA ACTTACGGG) que amplificavam um fragmento interno ao primeiro. Foram montadas reações com volume final de 50µl por amostra, tendo como DNA alvo na primeira etapa 3µl do DNA extraído de cada animal suspeito e, na segunda, 1µl do DNA amplificado na primeira etapa.

Os dois PCR foram realizados sob as mesmas condições de tempo e temperatura. Primeiramente, uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, após 35 ciclos de desnaturação à 94°C por um minuto, anelamento a 60°C por dois minutos e amplificação a 72°C por um minuto e meio, após uma extensão final a 72°C por sete minutos.

O resultado foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 2% impregnado com brometo de etídio e observado sob transluminador de fluorescência.

RESULTADOS

Epidemiologia e sinais clínicos

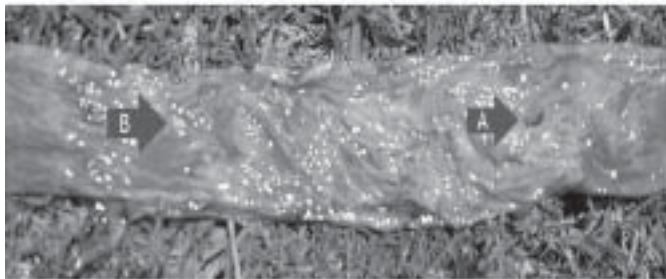
Nos meses de novembro/2001 a fevereiro/2002, treze eqüinos desenvolveram sinais clínicos compatíveis com EME, do total de cinquenta animais. Dos treze animais doentes seis morreram num período de 48h após o aparecimento dos sinais de diarréia. A morbidade foi de 26% e a letalidade de 46,1%. Os animais acometidos tinham idades entre um e cinco anos e apresentaram diarréia aquosa e profusa de forma aguda, demonstrando prostração e anorexia. Alguns animais ao locomoverem-se apresentaram a marcha rígida. Os animais doentes foram tratados com oxitetraciclina, administrada via endovenosa, a 6,6mg/kg/dia, até demonstrarem melhora dos sinais clínicos.

Patologia

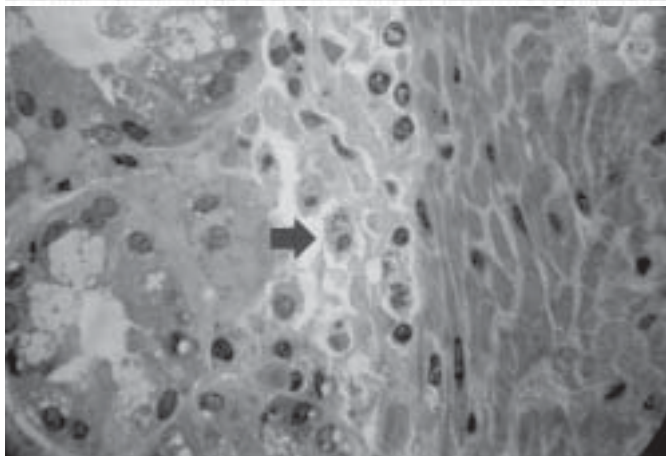
As alterações observadas à patologia do animal necropsiado são resumidas no Quadro 1.

Quadro 1. Alterações macroscópicas e microscópicas observadas em animal morto por Ehrlichiose monocítica eqüina

| Órgão/tecido | Alteração macroscópica | Alteração microscópica |
|-----------------------------|---|--|
| Duodeno | Mucosa com áreas hemorrágicas e congestas | Porção final com lesão granulomatosa |
| Jejuno | Presença de muco na luz intestinal e mucosa com áreas hemorrágicas, congestas e com focos de secreção purulenta | Lesões granulomatosa linfohistiocitária e discreto infiltrado de células mononucleares |
| Íleo | Luz intestinal com conteúdo mucoso. Mucosa com áreas hemorrágicas com focos de secreção purulenta | Lesões granulomatosa linfohistiocitária e discreto infiltrado de células mononucleares |
| Ceco | Hemorragia difusa; conteúdo fecal totalmente líquido | Discreto infiltrado mononuclear na mucosa e submucosa |
| Cólon maior/ cólon menor | Hemorragia difusa presença de conteúdo fecal mucóide e líquido | Discreto infiltrado mononuclear na mucosa e submucosa |
| Linfonodos mesentéricos | Aumentados de volume e edemaciados | - |
| Baço | Sem alteração evidente | Depleção grave de tecido linfóide, hemossiderose acentuada |
| Fígado | Sem alteração evidente | Degeneração centro lobular |
| Pulmão | Sem alteração evidente | Pneumonia intersticial subaguda linfohistiocitária multifocal com hemossiderose discreta |



1



3



2

Fig. 1. Porção do íleo de um caso natural de Ehrlichiose monocítica eqüina demonstrando áreas hemorrágicas (A) e pontos com conteúdo de aspecto viscoso-amarelado (B).

Fig. 2. Cólon maior de caso natural de Ehrlichiose monocítica eqüina com conteúdo fecal líquido.

Fig. 3. Cólon maior de eqüino com caso espontâneo de Ehrlichiose monocítica eqüina apresentando estruturas granulares compatível com *Neorickettsia risticii* no citoplasma de macrófago (seta). Azul de metileno, obj.40.

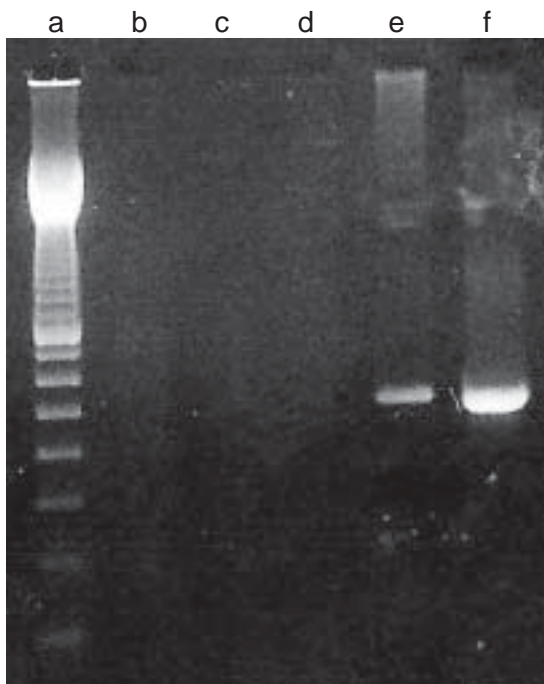


Fig.4. Eletroforese em agarose indicando o produto do PCR de 529pb do DNA da *Neorickettsia risticii*: (a) marcador de peso molecular de 100 pares de bases; (b) controle negativo; (c,d) cavalos negativos; (e) cavalo positivo; (f) controle positivo. (Amostras coletadas de animais suspeitos de Ehrlichiose monocítica equina, em dezembro de 2001).

no jejuno e íleo foram observados pontos com lesões granulomatosas na lâmina própria, relacionadas com invaginação das criptas das vilosidades intestinais. Essas lesões continham restos celulares e calcificação discreta com numerosas colônias bacterianas. No jejuno foi evidenciado ainda um infiltrado inflamatório mononuclear discreto restrito à lâmina própria da mucosa. No cólon e ceco, observou-se a presença de infiltrado inflamatório mononuclear discreto na mucosa e submucosa, caracterizando um processo inflamatório mais intenso com dilatação e congestão dos capilares sanguíneos e edema da submucosa.

Alterações histológicas foram evidenciadas, também, no baço, fígado e pulmão. No baço, foram constatadas depleção grave de tecido linfóide e hemossiderose acentuada. No fígado foi evidenciada degeneração centrolobular e no pulmão foi observada pneumonia intersticial subaguda linfo-histiocitária multifocal com hemossiderose discreta.

Nos cortes histológicos do intestino grosso (ceco e cólon maior) corado com azul de metileno, foram observadas várias estruturas granulares compatíveis com *N. risticii* no interior do citoplasma de macrófagos (Fig.3).

Nested PCR

Três das sete amostras de sangue coletadas animais doentes resultaram positivas pela técnica de PCR (42,8%) (Fig.4).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Neste estudo, foram observadas as características endêmica e sazonal, descritas para erliquiose monocítica equina. A proprie-

dade estudada localiza-se no município de Arroio Grande, situado ao Sul do Rio Grande do Sul, uma região de baixa altitude e com campos predominantemente alagadiços, em decorrência da proximidade com a Lagoa Mirim. Os casos de EME ocorreram no verão, nos meses de novembro/2001 a fevereiro/2002.

De acordo com Atwill et al. (1994), a EME ocorre de forma endêmica e sazonal, sendo evidenciada em estados americanos localizados adjacentes a rios, vales ou pântanos, como nos Estados de Maryland e Virginia, localizados próximos ao rio Potomac. A tendência sazonal da EME implica em uma ocorrência maior nos meses mais quentes, junho a setembro no hemisfério norte. A prevalência e incidência acompanham a sazonalidade, ou seja, nos meses de fevereiro a maio a prevalência pode variar de 0% a 10%, enquanto que nos meses de julho e agosto apresentam picos de até 75% (Goetz et al. 1989, Olchoway et al. 1990, Atwill et al. 1992).

A taxa de letalidade observada neste estudo (46,1%) foi superior ao citado na literatura a qual varia entre 5% a 30% em cavalos expostos naturalmente, podendo atingir até 36% (Rikihisa 1998). Deve ser ressaltado que os animais eram criados a campo e a identificação de casos era feita pelos peões. É possível que casos leves não tenham sido percebidos, fato que elevaria a morbidade e reduziria a letalidade do surto. Além disso, existia uma maior suscetibilidade de todo o lote de animais por não apresentarem imunidade prévia à enfermidade uma vez que os animais eram oriundos de uma região livre, sem relato de casos de EME. A região de origem desses animais apresenta característica geográfica diferente, com maior altitude, campos levemente ondulados, típicos da área sul da encosta do Sudeste gaúcho, sem a presença de grandes mananciais de água, embora localizado no mesmo Município. Tem sido demonstrado que animais transportados e introduzidos em áreas endêmicas são mais suscetíveis à doença devido a falta de contato com o agente. (Dutra et al.2001).

No presente trabalho, a maior parte dos equinos doentes apresentou idades =3 anos, com exceção de um animal que tinha cinco anos. Nos Estados Unidos, a maior incidência de EME ocorre em animais com idade acima de quatro anos, não havendo descrição de casos em potros com menos de um ano (Atwill et al. 1992).

Os achados clínicos foram compatíveis com a enfermidade conforme descrito por outros autores. Os animais com EME podem desenvolver desde a forma subclínica até a forma clínica que varia de leve a severa com a morte de animais, sendo que a diarreia ocorre em cerca de 70% dos casos (Ziemer et al. 1987).

Com o tratamento com oxitetraciclina utilizado neste estudo, sete animais (53,8%) recuperaram-se. Em um estudo experimental 70% dos cavalos se recuperam em cinco a sete dias após o tratamento com oxitetraciclina quando administrada durante o pico febril, antes do aparecimento da diarreia. Nos casos em que a diarreia já esta presente, o tratamento pode ser mais prolongado e menos eficiente, devido ao estado de debilidade que a doença provoca nos animais (Rikihisa 1998).

Os achados macroscópicos encontrados no equino necropsiado neste estudo foram similares ao descrito para EME (Cordes et al. 1986). Estes autores relatam como achados mais evidentes o distendimento do colón maior e ceco que se encontram reple-

tos de conteúdo líquido. As alterações microscópicas observadas nesse estudo apresentaram características semelhantes às relatadas por Cordes et al. (1986) e Dutra et al. (2001). No entanto, na porção final do duodeno, no jejuno e íleo foram observadas lesões granulomatosas na lâmina própria relacionadas com invaginação das vilosidades intestinais, com presença de calcificação e numerosas colônias bacterianas. A ocorrência dessas lesões, em geral, é induzida por alguns tipos de microrganismos ou agentes não infecciosos que são persistentes no tecido (Slauson & Cooper 1990).

Nos cortes histológicos do trato intestinal corados com azul de metileno, as estruturas intracitoplasmáticas encontradas no interior dos macrófagos são semelhantes com as descritas por Rikihisa et al. (1985) e compatíveis com mórulas de *N. risticii*.

No baço, a depleção linfóide e hemossiderose intensa encontradas, são alterações ainda não relatadas em equinos com EME. Segundo John et al. (1989) em animais jovens a depleção linfóide pode ser observada, mas localizada aos nódulos linfóides do segmento intestinal acometido. Entretanto, cães infectados por *Neorickettsia helminthoeca* desenvolvem depleção linfóide com degeneração do centro germinativo, devido a grande mobilização de macrófagos que a infecção induz (Rikihisa et al. 1991). As alterações histológicas encontradas no fígado e pulmão podem ter sido em parte, devido a choque endotoxêmico que pode ocorrer pela penetração de bactérias gram negativas na mucosa intestinal lesada ou por outra causa concomitante não determinada.

A Nested PCR identificou 42,8% das amostras como positivas, embora todos os cavalos testados neste estudo apresentassem sinais clínicos. Alguns animais já haviam sido tratados com antibiótico antes da coleta das amostras de sangue, o que pode ter influenciado na sensibilidade da técnica. Segundo Barlough et al. (1997) e Mott et al. (1997), a PCR é capaz de detectar 81% das amostras clínicas.

Pode-se concluir que a EME ocorre no Rio Grande do Sul, em regiões com características geográficas específicas e em épocas quentes, podendo ocasionar alta taxa de letalidade quando animais são introduzidos em área endêmica. A enfermidade produz, clinicamente, diarreia aquosa que pode ser de forma aguda e grave levando a morte dos animais em até 48h após o início dos sinais clínicos. As alterações patológicas do trato intestinal caracterizam-se como enterite linfo-histiocitária segmentar.

REFERÊNCIAS

- Atwill E.R., Mohammed H.O. & Rua-Domenech R. 1994. Geographical variation of seropositivity to *Ehrlichia risticii* (Equine monocytic ehrlichiosis) of horses in New York State. *Equine Vet. J.* 26 (2):143-147.
- Atwill E.R., Mohammed H.O., Dubovi E. & Lopes J. 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 J.E., Rikihisa Y. & Madigan J.E. 1997. Nested polymerase chain reaction for detection of *Ehrlichia risticii* genomic DNA in infected horses. *Vet. Parasitol.* 68:367-373.
- Barlough J.E., Reubel G.H., Madigan J.E., Vredevoe L.K., Miller P.E. & Rikihisa Y. 1998. Detection of *Ehrlichia risticii*, the agent of Potomac horse fever, in freshwater stream snails (Pleuroceridae: Juga spp.) from Northern California. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (4):2888-2893.
- Breider M.A. & Henton J.E. 1987. Equine monocytic ehrlichiosis (Potomac Horse Fever). *Equine Practice* 9:20-24.
- Coimbra H.S., Schuch L.F., Riet-Correa F., Curcio B.R., Raffi M.B., Dellagostin O., Mello D.F.M. & Haag R. 1999. Diarréia em equinos causada por *Ehrlichia risticii* no Sul do Brasil. *Anais XIV Congresso Estadual de Medicina Veterinária, II Congresso de Medicina Veterinária do Cone Sul, Gramado, RS, vol.1, p.200.*
- Coimbra H.S. 2003. Erliquiose monocítica equina no Rio Grande do Sul: aspectos clínicos, anatomo-patológicos e epidemiológicos. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas. 49p.
- Cordes D.O., Perry B.D., Rikihisa Y. & Chickering W.R. 1986. Enterocolitis caused by *Ehrlichia* sp. in the horse (Potomac horse fever). *Vet. Pathol.* 23:471-477.
- Dumler J.S., Barbet A.F., Bekker C.P.J., Dasch G.A., Palmer G.H., Ray S.C., Rikihisa Y. & Rurangirwa F.R. 2001. Reorganization of in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in order Rickettsiales: Unification of some species of *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. Syst. and Evolut. Microbiol.* 51:2145-2165.
- Dutra F., Schuch L.F.D., Delucchi E., Curcio B. R., Coimbra H.S., Raffi M. B. Dellagostin O. & Riet-Correa F. 2001. Equine monocytic ehrlichiosis (Potomac horse fever) in horses in Uruguay and southern Brazil. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13:433-437.
- Goetz T.E., Holland J.C., Dawson J.E., Ristic M., Skibbe K., Keegan K.G., Johnson P.J., Schaeffer D.J. & Baker G.J. 1989. Monthly prevalence (in 1986) of antibody titers against equine monocytic ehrlichiosis in apparently healthy horses in Illinois. *Am. J. Vet. Res.* 50 (11):1936-1939.
- Jonh G.A., Van Kruiningen H.J., Reim D. & Wachtel A.W. 1989. Fatal Potomac horse fever (Ehrlichial colitis) in foal: A case report from Connecticut. *J. Equine Vet. Sci.* 9 (5):250-252.
- Kanter M., Mott J., Ohashi N., Fried B., Reed S., Lin Y.C. & Rikihisa Y. 2000. Analysis of 16S rRNA and 51-Kilodalton antigen gene and transmission in mice of *Ehrlichia risticii* in virgulate trematodes from *Elmilia livescens* snails in Ohio. *J. Clin. Microbiol.* 38 (9):3349-3358.
- Mott J., Rikihisa Y., Zhang Y., Reed S.M. & Yu C.Y. 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.
- Olchoway T.W.J., James T.R. & Molitor T.W. 1990. Serodiagnosis of equine monocytic ehrlichiosis in selected groups of horses in Minnesota. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196(12):1967-1970.
- Palmer J.E., Whitlock R.H. & Benson C.E. 1986. Equine ehrlichial colitis (Potomac horse fever): Recognition of the disease in Pennsylvania, New Jersey, New York, Ohio, Idaho and Connecticut. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 189:197-199.
- Pusterla N., Madigan J.E., Chae J.-S., DeRock E., Johnson E. & Pusterla J.B. 2000. Helminthic transmission and isolation of *Ehrlichia risticii*, the causative agent of Potomac horse fever, by using trematode stages from freshwater stream snails. *J. Clin. Microbiol.* 38(3):1293-1297.
- Rikihisa Y. & Perry B.D. 1985. Causative Ehrlichial organisms in Potomac horse fever. *Infect. Immun.* 49 (3):513-517.
- Rikihisa Y. 1998. Rickettsial diseases, p.112-123. In: *Ibid.* (ed.) *Equine Internal Medicine*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA.
- Rikihisa Y., Stills H. & Zimmerman G. 1991. Isolation and continuous culture of *Neorickettsia helminthoeca* in macrophage cell line. *J. Clin. Microbiol.* 29(9):1928-1933.
- Slauson D.O. & Cooper B.J. 1990. *Mechanisms of Diseases*. 2nd edition. Williams & Wilkins, Baltimore, USA. 540p.
- Wen B., Rikihisa Y., Yamamoto S., Kawabata N. & Furest P.A. 1996. Characterization of the SF agent, an *Ehrlichia* sp isolated from the fluke *Stellantchasmus falcatus* by 16S rRNA base sequence serological and morphological analyses. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:149-154.
- Ziemer L.E., Whitlock R.H., Palmer J.E. & Spencer P.A. 1987. Clinical and hematological variables in ponies with experimental induced equine ehrlichial colitis (Potomac horse fever). *Am. J. Vet. Res.* 48:63-67.