

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

TESE

Estudo epidemiológico de rickettsias do grupo da febre maculosa em caninos, equinos e seus carrapatos no Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, Brasil

Nathalie Costa da Cunha

2009



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

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DE RICKETTSIAS DO GRUPO DA FEBRE
MACULOSA EM CANINOS, EQUINOS E SEUS CARRAPATOS NO
MUNICÍPIO DE RESENDE, ESTADO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL**

NATHALIE COSTA DA CUNHA

Sob a Orientação do Professor

Adivaldo Henrique da Fonseca

e Co-orientação da Doutora

Elba Regina Sampaio de Lemos

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

Seropédica, RJ

Fevereiro de 2009

UFRRJ / Biblioteca Central / Divisão de Processamentos Técnicos

636.08969223

C972e

T

Cunha, Nathalie Costa da, 1977-

Estudo epidemiológico de rickettsias do grupo da febre maculosa em caninos, equinos e seus carrapatos no Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, Brasil / Nathalie Costa da Cunha - 2009.

100 f. : il.

Orientador: **Adivaldo Henrique da Fonseca.**

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 58-68

1. Febre das Montanhas Rochosas - Resende (RJ) - Teses. 2. *Rickettsia rickettsii* - Teses. 3. *Rhipicephalus sanguineus* - Teses. 4. Carrapatos como transmissor de doenças - Teses. I. Fonseca, Adivaldo Henrique da Fonseca, 1953-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

Bibliotecário: _____

Data: ___/___/___

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

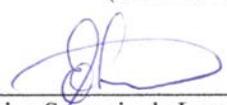
NATHALIE COSTA DA CUNHA

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

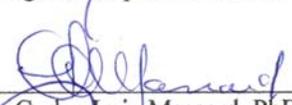
TESE APROVADA EM 19/02/2009



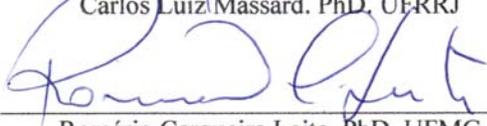
Adivaldo Henrique da Fonseca. PhD. UFRRJ
(Orientador)



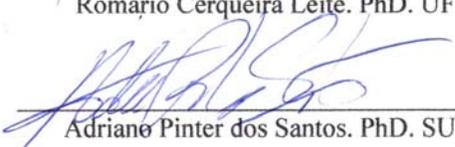
Elba Regina Sampaio de Lemos. PhD. FIOCRUZ



Carlos Luiz Massard. PhD. UFRRJ



Romário Cerqueira Leite. PhD. UFMG



Adriano Pinter dos Santos. PhD. SUCEN

Não imagineis, portanto, que, para viverdes em comunicação constante conosco, para viverdes sob as vistas do Senhor, seja preciso vos cilicieis e cubrais de cinzas. - *Um Espírito Protetor. (Bordéus, 1863).*
O Evangelho Segundo o Espiritismo. Capítulo XVII. Item 10.

Dai-nos força, Senhor, para aceitar com serenidade tudo o que não possa ser mudado. Dai-nos coragem para mudar o que pode e deve ser mudado. E dai-nos sabedoria para distinguir uma coisa da outra.

*Dedico aos meus pais Jorge e Regina, irmãs Vivian e Aline e sobrinho Felipe.
Pelo amor, compreensão e paciência.
Vocês são o meu Porto Seguro. Obrigada por tudo!*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Adivaldo Henrique da Fonseca pela orientação, amizade, confiança e paciência.

À Dra. Elba Regina Sampaio de Lemos pela co-orientação e pela oportunidade de trabalho no Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses da FIOCRUZ.

Ao Professor Dr. Carlos Luiz Massard pela orientação informal e pelo entusiasmo contagiante.

À Prefeitura Municipal de Resende pela infraestrutura e boa vontade. Em especial ao Médico Veterinário Fabiano Pimentel dos Santos, Coordenador do Centro de Controle de Zoonoses Itamar da Costa e todos os funcionários do Centro de Controle de Zoonoses que auxiliaram nas coletas.

Aos amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Doenças Parasitárias da UFRRJ Bruna Baeta, Charles Passos Rangel, Daniel Guedes-Junior, Fábio Jorge Silva, Fabíola do Nascimento Corrêa, Jania de Rezende, Jenevaldo Silva Barbosa, Matheus Cordeiro, Rafael Ferreira de Araújo, Rafaella Câmara Teixeira, Raquel Silva Lisboa pela amizade, convivência e ajuda no trabalho de campo e laboratorial.

Aos membros da equipe do Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses pela ajuda em algumas etapas do trabalho laboratorial, Alexsandra Mendonça Favacho, Alexsandro Gutteres, Camila Bragagnolo, Cristiane Silva, Daniele Pereira Nunes Almeida, Raphael Gomes da Silva e Tatiana Rozental.

Aos amigos que sempre ajudaram mesmo mais distante Ana Paula Gárate, Dra. Cátia Marques, Mestre Erich Telleria, Dr. Jadier Cunha, e Dra. Luciana Rodrigues e Dra. Renata Cunha Madureira,

Aos orientados do Professor Carlos Luiz Massard: Bruno Campos, Fernanda Nathalia Evangelista, Huarrisson Azevedo Santos, Marcos Pinheiro Franque, Tiago Marques dos Santos, e colegas do Curso de Pós-Graduação Janaina da Soledad Rodrigues, Joice Aparecida Rezende Vilela e Marcos Sandez pela grande ajuda no trabalho de campo.

Ao Dr. José Eduardo Dias, Professor José Miguel Peters Garcia e Mestre Daniel Calheiros do Instituto de Geologia da UFRRJ pelos mapas geográficos.

Ao Dr. Fábio Silva de Souza pela ajuda nos mapas geográficos.

Aos proprietários dos animais que permitiram a coleta de material em suas propriedades.

Aos animais, indispensáveis, que mesmo sem entenderem o motivo daquela movimentação em torno deles, permitiram que coletássemos o material para o trabalho.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação pela convivência.

Aos membros do Laboratório de Coccídeos e Coccidioses da UFRRJ pela ajuda sempre que solicitada.

Aos funcionários do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

À CAPES e à FAPERJ pelo auxílio financeiro.

À todos aqueles que ajudaram direta ou indiretamente no meu trabalho.

Meu muito obrigada!

Biografia

Nathalie Costa da Cunha, filha de Jorge Horacio da Cunha e Regina Celia Costa da Cunha, nasceu em 28 de abril de 1977, na cidade do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro (RJ), onde cursou o ensino fundamental e médio no Colégio Bahiense, concluindo em 1994.

No ano de 1995, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), colando grau e obtendo o título de Médica Veterinária em 25 de novembro de 2000.

Durante a graduação, foi bolsista de Iniciação Científica pelo PIBIC no período de julho de 1999 a agosto de 2000, junto a projetos de pesquisa na área de hemoparasitologia. No período de janeiro de 2001 a agosto de 2002 atuou na área de clínica médica de pequenos animais. Foi bolsista de Aperfeiçoamento Científico do CNPq de setembro de 2002 a fevereiro de 2003. Durante o período acadêmico participou de projetos de pesquisa no Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública e no Departamento de Parasitologia Animal da UFRRJ. Colaborou no desenvolvimento de projetos de pesquisa em conjunto com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Embrapa Gado de Corte e Fundação Oswaldo Cruz.

Em março de 2003 ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (CPGCV) – Área de Concentração Sanidade Animal, em nível de Mestrado, da UFRRJ, onde foi bolsista CAPES. Em março de 2005 ingressou no PPGCV – Área de Concentração Sanidade Animal, em nível de Doutorado, da UFRRJ, onde foi bolsista da CAPES nos dois primeiros anos e posteriormente ingressou no programa de bolsas de aluno nota 10 da FAPERJ onde permanece até o momento. E nesta data, apresenta e defende esta tese como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

RESUMO

CUNHA, Nathalie Costa. **Estudo epidemiológico de rickettsias do grupo da febre maculosa em caninos, equinos e seus carrapatos no Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, Brasil.** 2009. 100p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

As enfermidades causadas por rickettsias são amplamente distribuídas no mundo e estão associadas a artrópodes hematófagos. A bactéria *Rickettsia rickettsii* é a mais patogênica das rickettsias do grupo da febre maculosa (RGFM). No Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, cinco casos de febre maculosa (FM) ocorreram em uma mesma família. Com intuito de conhecer os fatores que levaram à ocorrência da doença nesta localidade e adquirir mais conhecimentos na epidemiologia da FM no Brasil, o presente estudo teve os seguintes objetivos: verificar a ocorrência de caninos e equinos reativos sorologicamente à *R. rickettsii*, utilizando a técnica de reação de imunofluorescência indireta (RIFI); avaliar o potencial dos caninos e equinos como sentinelas para a ocorrência de FM; conhecer a fauna de ixodídeos dos cães e equinos e avaliar por meio de ferramentas moleculares a presença de RGFM em carrapatos. Verificou-se que 29 (27,62%) dos soros caninos foram reativos, com títulos variando de 1:64 a 1:4096 e 76 (72,38%) soros foram não reativos. Na análise soroepidemiológica dos equinos observou-se um total de 9 (9,4%) animais reativos e 87 (90,6%) não reativos à RIFI. Coletou-se um total de 470 carrapatos dos caninos, que apresentaram um percentual de infestação de 44%. Foram identificadas as espécies *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma cajennense*, *A. aureolatum*, *A. ovale* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e ninfas de *Amblyomma* sp., *R. sanguineus* e *R.(B.) microplus* e 33 larvas. Coletou-se um total de 975 carrapatos dos equinos, que apresentaram um percentual de infestação de 71%, pertencentes às seguintes espécies: *A. cajennense*, *R.(B.) microplus* e *Dermacentor (Anocentor) nitens*. Também foram coletadas ninfas de *Amblyomma* sp., *R.(B.) microplus* e *D.(A.) nitens* e 15 larvas. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em amostras de carrapatos dos caninos que apresentaram sorologia positiva, sendo submetidos à técnica 82 carrapatos. Apenas um carrapato da espécie *R. sanguineus* apresentou-se positivo na PCR, tendo amplificado para os quatro marcadores estudados (*ompA*, *ompB*, *gltA* e *htrA*). Este carrapato infestava canino procedente da propriedade onde ocorreram os casos de FM. A taxa de infecção nos carrapatos foi de 1,22%. A sequência teve similaridade de 99,3% com depósitos no GenBank de *R. rickettsii*. Com base nos resultados observados na região estudada, pode-se concluir que os cães foram importantes sentinelas para o agente da febre maculosa; o hábito de caninos frequentarem matas e pastos influenciou positivamente na presença de anticorpos séricos anti-RGFM; os caninos provenientes de propriedades a pelo menos seis quilômetros de distância a partir do local de ocorrência dos casos foram reativos a RGFM, confirmando o conceito de área endêmica; caninos permaneceram reativos para RGFM pelo menos um ano após a ocorrência dos cinco casos de FM brasileira diagnosticados em 2006; a fauna de ixodídeos encontrada corrobora com dados de outros estudos em regiões endêmicas para FM; a presença, em condições naturais, de *Rickettsia rickettsii* no carrapato *Rhipicephalus sanguineus* indica uma possível participação deste vetor na transmissão de *R. rickettsii* para humanos na área estudada.

Palavras chave: *Rickettsia rickettsii*, *Rhipicephalus sanguineus*, soroepidemiologia

ABSTRACT

CUNHA, Nathalie Costa. **Epidemiological study of infection by spotted fever group rickettsiae in dogs, horses and its ticks in the city of Resende, Rio de Janeiro state, Brazil.** 2009. 100p. Thesis (Doctor Science in Veterinary Sciences, Animal Health). Instituto Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

Diseases caused by rickettsiae are widely distributed worldwide and are associated with hematophagous arthropods. The bacteria *Rickettsia rickettsii* is the most pathogenic of the spotted fever group (SFG). In order to know the factors that led to the occurrence of the disease in this area and acquire more knowledge in the epidemiology of SF in Brazil, as their vectors and the sentinel animals, this study have had the following objectives: verify the occurrence of dogs and horses serological reactive to *R. rickettsii*, using the technique of indirect immunofluorescence assay (IFA); evaluate the potential of dogs and horses as sentinels for the occurrence SF; better understand the population of ixodidae in dogs and horses and evaluate by molecular tools the presence of the spotted fever group rickettsiae (SFGR) in ticks. It was found that 29 (27.62%) sera of dogs were reactive, with titles ranging from 1:64 to 1:4096 and 76 sera (72.38%) were not reactive. In the analysis of horses there was a total of 9 (9.4%) animals reactive and 87 (90.6%) not reactive to the IFA. It was collected a total of 470 ticks of dogs, which showed a percentage of infestation of 44%. It was identified the species *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma cajennense*, *A. aureolatum*, *A. ovale* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and nymphs of *Amblyomma* sp., *R. sanguineus* and *R. (B.) microplus*, and 33 larvae. A total of 975 ticks were collected from horses, the species: *A. cajennense*, *R. (B.) microplus* and *Dermacentor (Anocentor) nitens*. It was also collected nymphs of *Amblyomma* sp., *R. (B.) microplus* and *D. (A.) nitens*, and 15 larvae. Considering the total number of horses observed, 71% were parasitized by ticks. The polymerase chain reaction (PCR) was performed on samples of blood and ticks of dogs that had positive serology. Thus, it was submitted to the technique 82 ticks. Only one tick of the species *R. sanguineus* showed PCR positive, and amplified for the four primers studied (*ompA*, *ompB*, *gltA* and *htrA*). This tick infested canine founded the property where there were the cases of SF. The rate of infection in ticks was 1.22%. The sequence had similarity of 99,3% with deposits in GenBank of *R. rickettsii*. Based on the results observed in the studied region, it can be concluded that dogs were important sentinels for the agent of SF; canines' regular contact with forests and pastures positively influenced the reactive infection by *R. rickettsii*; dogs coming from properties at least six kilometers away from the outbreak were reactive to SFGR, confirming the concept of endemic area; canine remained reactive to the SFGR to at least one year after the occurrence of five cases of Brazilian spotted fever diagnosed in 2006; the population of ixodidae found corroborates with other studies in areas endemic for SF. The presence of the bacteria *R. rickettsii* in the tick *R. sanguineus* in natural conditions have demonstrated a likely chance of participation of the transmission vector of *R. rickettsii* to humans in the area of study.

Key words: *Rickettsia rickettsii*, *Rhipicephalus sanguineus*, seroepidemiology

LISTA DE TABELAS

CONTEÚDO	Página
MATERIAL E MÉTODOS	17
Tabela 1: Descrição das 19 propriedades onde foram coletados sangue e carrapatos de caninos e equinos, localizadas no Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, no período de junho de 2006 a julho de 2007.....	21
Tabela 2: Marcadores para amplificação dos genes <i>ompA</i> ; <i>ompB</i> ; <i>gltA</i> e <i>htrA</i> utilizados na reação em cadeia da polimerase	29
Tabela 3: Volume das soluções usadas na reação em cadeia da polimerase a partir de amostras de carrapatos.....	29
RESULTADOS	31
Tabela 4: Resultados da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos da classe IgG anti- <i>Rickettsia rickettsii</i> de caninos, procedentes do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, de acordo com as propriedades de procedência. Coleta de sangue realizada no período de junho de 2006 a julho de 2007.....	32
Tabela 5: Resultados das amostras de soros reativos na reação de imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos da classe IgG anti- <i>Rickettsia rickettsii</i> em caninos procedentes do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, de acordo com o mês de coleta. Coleta de sangue realizada no período de junho de 2006 a julho de 2007.....	33
Tabela 6: Resultados da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos da classe IgG-anti <i>Rickettsia rickettsii</i> de caninos procedentes do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, de acordo com a titulação máxima de cada animal. Coleta de sangue realizada no período de junho de 2006 a julho de 2007.....	34
Tabela 7: Resultados da técnica de imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos da classe IgG anti- <i>Rickettsia rickettsii</i> de caninos com amostras seriadas, de acordo com a titulação máxima de cada animal. Coleta de sangue realizada no período de junho de 2006 a julho de 2007 de caninos provenientes do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro.....	35
Tabela 8: Resultados, quanto ao sexo, da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos da classe IgG anti- <i>Rickettsia rickettsii</i> em caninos. Soros provenientes de cães do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, coletados no período de junho de 2006 a julho de 2007.....	36
Tabela 9: Resultados, quanto à idade, da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos da classe IgG anti- <i>Rickettsia rickettsii</i> em	36

caninos. Soros provenientes de cães do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, coletados no período de junho de 2006 a julho de 2007.....

Tabela 10: Resultados, quanto ao tipo de habitat, da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos da classe IgG anti-*Rickettsia rickettsii* em caninos. Soros provenientes de cães do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, coletados no período de junho de 2006 a julho de 2007..... 37

Tabela 11: Resultados, quanto ao hábito de frequentar pastos, da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos da classe IgG anti-*Rickettsia rickettsii* de caninos. Soros provenientes de cães do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, coletados no período de junho de 2006 a julho de 2007..... 37

Tabela 12: Resultados, quanto ao hábito de frequentar matas, da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos da classe IgG anti-*Rickettsia rickettsii* de caninos. Soros provenientes de cães do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, coletados no período de junho de 2006 a julho de 2007..... 38

Tabela 13: Resultados da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos da classe IgG anti-*Rickettsia rickettsii* em equinos, de acordo com as propriedades de procedência. Soros provenientes de equinos do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, coletados no período de junho de 2006 a julho de 2007..... 39

Tabela 14: Resultados das amostras de soros reativos (título 1:64) de equinos, de acordo com o mês de coleta. Soros provenientes de equinos do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, coletados no período de junho de 2006 a julho de 2007..... 40

Tabela 15: Resultados, quanto ao sexo, da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos da classe IgG anti-*Rickettsia rickettsii* em equinos. Soros provenientes de animais do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, coletados no período de junho de 2006 a julho de 2007..... 41

Tabela 16: Resultados, quanto à idade, da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos da classe IgG anti-*Rickettsia rickettsii* em equinos. Soros provenientes de animais do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, coletados no período de junho de 2006 a julho de 2007..... 41

Tabela 17: Resultados, quanto ao tipo de habitat, da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos da classe IgG anti-*Rickettsia rickettsii* em equinos. Soros provenientes de animais do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, coletados no período de junho de 2006 a julho de 2007..... 42

Tabela 18: Espécimes de carrapatos adultos coletados de caninos procedentes do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro. 43

A coleta foi realizada no período de junho de 2006 a julho de 2007.....	
Tabela 19: Intensidade de carrapatos coletados de caninos provenientes de 19 propriedades do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro. A coleta foi realizada no período de junho de 2006 a julho de 2007.....	44
Tabela 20: Carrapatos coletados de caninos ao longo dos meses de visitas às 19 propriedades do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro. Período de coleta de junho de 2006 a julho de 2007.....	45
Tabela 21: Espécimes de carrapatos em estágios imaturos coletados de caninos procedentes do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro. Período de coleta de junho de 2006 a julho de 2007.....	46
Tabela 22: Espécimes de carrapatos adultos coletados de equinos procedentes do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro. Período de coleta de junho de 2006 a julho de 2007.....	46
Tabela 23: Espécimes de carrapatos em estágios imaturos coletados de equinos procedentes do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro. Período de coleta de junho de 2006 a julho de 2007.....	47
Tabela 24: Intensidade de carrapatos coletados de equinos provenientes de 15 propriedades do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro. Período de coleta de junho de 2006 a julho de 2007.....	47
Tabela 25: Carrapatos coletados de equinos ao longo dos meses de visitas às 15 propriedades do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro. Período de coleta de junho de 2006 a julho de 2007.....	48
Tabela 26: Carrapatos submetidos à técnica de reação em cadeia da polimerase provenientes de caninos reativos na imunofluorescência indireta para <i>Rickettsia rickettsii</i> . Período de coleta ocorrido em junho de 2006 a julho de 2007, no Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro..	49

LISTA DE FIGURAS

CONTEÚDO	Página
REVISÃO DE LITERATURA	3
Figura 1: Representação da classificação sistemática de rickettsias. Adaptado de Manual Bergey's, 2004 (GARRITY et al., 2004).....	3
MATERIAL E MÉTODOS	17
Figura 2: Mapas geográficos para localização do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro. Fonte: Instituto Brasileiro de Estatística e Geografia (IBGE).....	18
Figura 3: Localização das 19 propriedades de onde foram coletados sangue e carrapatos de caninos e equinos procedentes do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, no período de junho de 2006 a julho de 2007. Utilização da ferramenta “Google Earth”.....	20
Figura 4: Temperatura em graus Celsius (0C) e umidade relativa (%) ocorridas no Distrito Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, nos meses de junho de 2006 a julho de 2007. Fonte: Instituto de Meteorologia.....	23
Figura 5: Fotografias da localidade de casos de febre maculosa (FM), no Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, no período de junho de 2006 a julho de 2007. A- Residência onde moravam as pessoas que adoeceram por FM, com ênfase na plantação de eucaliptos em torno do local. B-Vista lateral do foco, presença de córrego bem próximo ao local. C-Criação de bovinos, típico em toda a região. D-Crianças que adoeceram por FM no local de estudo. E-Aspecto geral da região estudada, caracterizada por áreas desmatadas, vegetação secundária de mata atlântica e plantação de eucaliptos.....	24
Figura 6: Aspecto geral dos caninos e equinos procedentes do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, dos quais foram coletados sangue e carrapatos, no período de junho de 2006 a julho de 2007.....	25
Figura 7: Técnica de Reação de imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos anti <i>Rickettsia rickettsii</i> . A - Resultado de soro reagente. B - Resultado de soro não reagente.....	26
RESULTADOS	31
Figura 8: Análise do produto da PCR. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. C(+)= controle positivo; A= amostra positiva. DNA de <i>Rickettsia rickettsii</i> em carrapato <i>Rhipicephalus sanguineus</i> infectado. 1- Gene <i>ompA</i> ; 2- Gene citrato sintase (<i>glcA</i>); 3- Gene que codifica a proteína de 17kDa (<i>htrA</i>); 4- Gene <i>ompB</i> .	50

Figura 9: Canino número “16” da propriedade “1”, localizada no Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, o qual estava parasitado pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* positivo para *Rickettsia rickettsii*. A coleta ocorreu em junho de 2006.....

LISTA DE QUADRO

CONTEÚDO	Página
REVISÃO DE LITERATURA	3
Quadro 1: Compilação de dados a partir de publicações indexadas (1996 a 2008) sobre a identificação de carrapatos infectados com rickettsias do grupo da febre maculosa (RGFM) no Brasil.....	13

SUMÁRIO

CONTEÚDO	Páginas
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Conceito e etiologia – breves considerações.....	3
2.2 Distribuição da febre maculosa.....	4
2.2.1 Nas Américas.....	4
2.2.2 No Brasil.....	4
2.3 Diagnóstico.....	5
2.4 Rickettsias do grupo da Febre Maculosa em animais vertebrados.....	6
2.5 Rickettsias do grupo da Febre Maculosa em carrapatos.....	9
2.5.1 Interação Rickettsia- carrapato.....	9
2.5.2 Estudo da fauna de ixodídeos em áreas endêmicas para febre maculosa no Brasil.....	10
2.5.3 Rickettsias em carrapatos no Brasil.....	11
2.6 Influência do tipo de vegetação na epidemiologia da febre maculosa: breves considerações.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	17

3.1. Justificativa da escolha da localidade estudada.....	17
3.2 Descrição geográfica do município de Resende.....	17
3.3 Delineamento do estudo.....	18
3.4 Atividades de trabalho de campo.....	22
3.4.1 Estudo epidemiológico de RGFM.....	22
3.4.2 Estudo da fauna de ixodídeos.....	22
3.5 Caracterização da área onde ocorreram os casos de febre maculosa.....	22
3.6 Caracterização das áreas estudadas.....	23
3.7 Caracterização dos caninos e equinos.....	25
3.8 Técnicas de diagnóstico laboratorial utilizadas.....	25
3.8.1 Reação de imunofluorescência indireta.....	25
3.8.2 Identificação taxonômica dos carrapatos.....	27

3.8.3	Técnicas	27
moleculares.....		
3.8.3.1	Reação em cadeia da	27
polimerase.....		
3.8.3.2	Sequenciamento de amostra	30
positiva.....		
3.9	Processamento e análise dos dados.....	30
4	RESULTADOS	31
4.1	Análise sorológica epidemiológica.....	31
4.1.1	Caninos.....	31
4.1.2	Equinos.....	38
4.2	Fauna de ixodídeos.....	42
4.2.1	Caninos.....	42
4.2.2	Equinos.....	46
4.3	Análise pela reação em cadeia da polimerase.....	49
4.4	Sequenciamento da amostra positiva e alinhamento.....	51
5	DISCUSSÃO	52
5.1	Análise soroepidemiológica em caninos e equinos.....	52
5.2	Estudo da fauna de ixodídeos.....	53
5.3	Análise molecular.....	55
6	CONCLUSÕES	57
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

ANEXOS.....	69
Anexo 1: Relatório elaborado pelo Serviço de Epidemiologia da Secretaria municipal de desenvolvimento sustentável, saúde e qualidade de vida da Prefeitura Municipal de Resende.....	69
Anexo 2: Questionários.....	73
Anexo 3: Termo de consentimento livre e esclarecido.....	75
Anexo 4: Protocolo para a extração do DNA utilizando-se o Mini Kit QIAamp DNA (QIAGEN ®). Protocolo para tecidos (com modificações).....	77
Anexo 5: Protocolo para a extração do DNA utilizando-se o Mini Kit QIAamp DNA (QIAGEN ®). Protocolo para sangue e fluidos corpóreos (com modificações)	78
Anexo 6: Protocolo para purificação de DNA a partir da extração em gel de agarose, com modificações, conforme Kit QIAquick ®.....	79
Anexo 7: Alinhamento de Rickettsia rickettsii identificada em Rhipicephalus sanguineus com sequências depositadas no GenBank.....	80
Anexo 8: Alinhamento de sequência protéica de Rickettsia rickettsii identificada em Rhipicephalus sanguineus com sequências protéicas depositadas no GenBank...	95

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Rickettsia* é constituído por diferentes espécies de bactérias Gram-negativas que são parasitas intracelulares obrigatórios, com curta viabilidade fora dos seus reservatórios e vetores que infectam, e difíceis de serem cultivadas em laboratório. A patogenia, comum a todas, consiste em infecção direta das células endoteliais, que determina o desenvolvimento de vasculites multisistêmicas. Seu ciclo vital é mantido ao infectar diferentes espécies de hospedeiros vertebrados e invertebrados.

A classificação mais utilizada divide as rickettsioses em três grupos: o grupo da febre maculosa, grupo tifo e o terceiro grupo que constitui as espécies *R. bellii* e *R. canadensis*. Dependendo da área geográfica, do tipo de hospedeiros e vetores, diferentes espécies de ambos os grupos têm se distribuído e ocupado os nichos ecológicos. Dentro do grupo tifo destacam-se as espécies *Rickettsia prowazekii* e *R. typhi*, agentes causais do tifo exantemático epidêmico e tifo murino, respectivamente. No grupo das febres maculosas destacam-se *R. rickettsii*, agente da febre maculosa brasileira (FMB) e Rocky Mountain spotted fever (RMSF) nos EUA e *R. conorii*, agente da febre maculosa do Mediterrâneo ou febre botonosa.

O número de casos reportados desta enfermidade em cada local pode oscilar devido: às mudanças no sistema de vigilância; mudanças cíclicas na transmissão causada pela competição ou interferência com outras rickettsias transmitidas por carrapatos; diminuição da população de carrapatos causada pela disseminação do uso de pesticidas; à expansão das cidades que pode levar à eliminação de vetores, através da limpeza da terra e extermínio de hospedeiros e; aumento das atividades recreativas e ocupacionais do homem em áreas infestadas por carrapatos (BURGDORFER, 1975; PAROLA et al., 2005).

A epidemiologia da febre maculosa (FM) está relacionada com o carrapato hospedeiro que constitui ao mesmo tempo o reservatório e o vetor. Diferentes espécies de carrapatos em distintas regiões geográficas transmitem a enfermidade. No Brasil, o carrapato *Amblyomma cajennense* é atualmente incriminado o principal vetor da FM no Brasil. Mas, *A. aureolatum* e *Rhipicephalus sanguineus* também têm sido incluídos como responsáveis na epidemiologia da doença. Como sentinelas para o agente da FM, os caninos e equinos têm sido caracterizados como os mais importantes.

Os primeiros relatos de FM no Brasil ocorreram na década de 30, quando ainda era tratada como “Tifo exantemático”, mas com o passar do tempo, observou-se que esta doença relatada no Brasil era muito similar a que ocorria nos EUA, chamada RMSF, e então passou a ser denominada FMB. Após alguns anos de ausência de relatos de casos, principalmente na década de 1980, a FMB passou a ser novamente identificada e, em 2001, já com o status de doença de notificação compulsória, foi possível identificar a ocorrência de novos casos assim como a existência desta zoonose em outras áreas até então sem relato da doença. A maioria dos casos notificados se encontra na região sudeste do País. No Rio de Janeiro, a doença foi notificada em diferentes Municípios, com a ocorrência de 55 casos com letalidade de 24% de 1995 a 2005, com a detecção de *R. rickettsii* a partir de amostra tecidual e de sangue total humano.

No ano de 2006, no mês de maio, foram diagnosticados pela primeira vez no Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, cinco casos de FM em uma mesma família, sendo dois adultos, que vieram a óbito e três crianças, tratadas e recuperadas. A família residia em propriedade rural, localizada no Distrito de Engenheiro Passos, região caracterizada por criações de gado e substituição de áreas de pastagens por plantações de eucalipto.

O diagnóstico dos casos foi baseado nos dados clínicos, epidemiológicos e por meio de sorologia, tendo sido realizado no Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses da Fundação Oswaldo Cruz. Com intuito de conhecer os fatores que levaram à ocorrência da doença nesta localidade e adquirir mais conhecimentos na epidemiologia da FM no Brasil, como seus vetores e os animais sentinelas, realizou-se uma parceria entre a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Fundação Oswaldo Cruz e com a Prefeitura Municipal de Resende.

Desta forma, o presente estudo teve os seguintes objetivos:

- Verificar a ocorrência de caninos e equinos reativos sorologicamente a rickettsias do grupo da febre maculosa (RGFM), utilizando a técnica de reação de imunofluorescência indireta;
- Avaliar o potencial dos caninos e equinos como sentinelas para a ocorrência de FM;
- Conhecer a fauna de ixodídeos dos cães e equinos e;
- Avaliar por meio de ferramentas moleculares a presença de RGFM em carrapatos de caninos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Conceito e etiologia – breves considerações

As enfermidades causadas pelo gênero *Rickettsia* (ROCHA LIMA, 1916) são amplamente distribuídas no mundo na forma de focos endêmicos e, ocasionalmente determinam surtos sazonais ou esporádicos (AZAD; BEARD, 1998). Geralmente, espécies de rickettsias estão associadas a artrópodes hematófagos, como os carrapatos, ácaros, piolhos e pulgas (LEMOS, 2002a). Mas, frequentemente são capazes de infectar vertebrados, inclusive humanos, que comumente são hospedeiros acidentais (LA SCOLA; RAOULT, 1997). A espécie *R. rickettsii* é a mais patogênica das rickettsias do grupo da FM (PAROLA et al., 2005).

Os organismos do gênero *Rickettsia* são classificados como bactérias Gram-negativas e intracelulares obrigatórios (LA SCOLA; RAOULT, 1997). São microorganismos pequenos, cocóides, cocobacilares ou pleomórficos, medindo 0,3 a 0,6 µm de largura, que retém fucsina quando coradas pelo método de Giménez (GIMÉNEZ, 1964).

A FM, zoonose causada pela bactéria *R. rickettsii* foi primeiramente descrita no EUA, onde recebeu o nome de RMSF. O pesquisador Howard Taylor Ricketts efetuou o primeiro isolamento de *R. rickettsii* no início do século XX, quando também estabeleceu o papel do carrapato *Dermacentor andersoni* na transmissão da doença (RICKETTS, 1909).

A taxonomia das rickettsias passou por muitas modificações. Na figura 1 a classificação taxonômica atualmente utilizada é apresentada.

Domínio: Bactéria

Filo: Proteobacteria

Classe: Alphaproteobacteria

Ordem: Rickettsiales

Família: Anaplasmataceae

Holosporaceae

Rickettsiaceae { *Rickettsia*
Orientia

Figura 1. Representação da classificação sistemática de rickettsias. Adaptado de Berg's Manual of Systematic Bacteriology, 2004 (GARRITY et al., 2004).

As espécies do gênero *Rickettsia* compreendem em: *R. prowazekii*, *R. aeschlimannii*, *R. africae*, *R. akari*, *R. australis*, *R. bellii*, *R. canadensis*, *R. conorii*, *R. felis*, *R. helvetica*, *R. honei*, *R. japonica*, *R. massiliae*, *R. montanensis*, *R. parkeri*, *R. peacockii*, *R. rhipicephali*, *R. rickettsii*, *R. sennetsu*, *R. sibirica*, *R. slovacica*, *R. tsutsugamushi* e *R. typhi*.

2.2 Distribuição da febre maculosa

2.2.1 Nas Américas

A distribuição de RGFM é limitada à distribuição dos seus vetores (AZAD; BEARD, 1998). Sonenshine (1972a) comparou a distribuição de casos de FM em áreas rurais e suburbanas e verificou que 95% dos casos ocorreram em regiões atualmente ou potencialmente dominadas por florestas, mas casos autóctones foram descritos em grandes centros urbanos (PAROLA et al., 2005).

Nas Américas, a FM foi descrita no Canadá, México, Panamá, Costa Rica, Colômbia, Peru, Brasil, Uruguai, Argentina e Estados Unidos da América (EUA) (LEMONS, 2002a; GALVÃO et al., 2003; PAROLA et al., 2005). As espécies de rickettsias causadoras de FM em humanos no continente americano são *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. africae* (importada), *R. akari* e *R. felis* (LABRUNA, 2006a) e, mais recentemente a espécie *R. conorii* (comunicação pessoal Lemos, 2009).

Rhipicephalus sanguineus e *A. cajennense* são incriminados como transmissores no México e Colômbia (PATINO-CAMARGO, 1941; BUSTAMANTE; VARELA, 1947; LABRUNA, 2006a); *A. cajennense* no Panamá (RODANICHE, 1953); na Costa Rica *R. rickettsii* foi isolada em carrapato *Haemaphysalis leporispalustris* (FUENTES et al., 1985). Na Argentina, por biologia molecular, foram identificadas *R. amblyommii* e *R. bellii* no carrapato *A. neumanni* (LABRUNA et al., 2007a), *Rickettsia* sp. em *A. parvum* (PACHECO et al., 2007a), *R. rickettsii* e *R. bellii* no carrapato *A. cajennense* (PADDOCK et al., 2008). A espécie *R. parkeri* foi identificada em *A. triste* no Uruguai e na Argentina (VENZAL et al., 2004; NAVA et al., 2008).

Nos EUA, embora muitos gêneros e espécies de ixodídeos sejam infectados naturalmente com rickettsias, *D. andersoni* e *D. variabilis* são os principais vetores de *R. rickettsii* (AZAD; BEARD, 1998). *Dermacentor andersoni* é o principal vetor de FM da parte oeste dos EUA, enquanto que *D. variabilis* transmite a bactéria no leste dos EUA (BURGDORFER, 1975; BURGDORFER, 1988). *Rhipicephalus sanguineus* tem sido recentemente caracterizado como o vetor de RGFM, tendo sido relatado em locais onde não foram encontrados os dois principais carrapatos responsáveis pela enfermidade no país (DEMMA et al., 2005; WIKSWO et al., 2007).

2.2.2 No Brasil

A FM no Brasil foi descrita pela primeira vez por Piza em 1932. Nessa descrição foi relatada a ocorrência de “Tifo exantemático” no estado de São Paulo. Na década de 30, a epidemiologia desta enfermidade foi caracterizada como endemia rural, de extensão variável, ocorrida nos meses mais frios do ano e com diagnóstico baseado na reação de Weil-Felix (MOREIRA; MAGALHÃES, 1934; MOREIRA; MAGALHÃES, 1935; DIAS; MARTINS, 1939). Moreira; Magalhães (1934) verificaram a relação entre os agentes de Minas Gerais, São Paulo (“Tifo exantemático”) e a “Rocky Mountain spotted fever”.

Na década de 50, a FM, na época ainda denominada como “Tifo exantemático neotrópico”, foi caracterizada desta forma “... aparece subitamente, devasta a população, não raro numa só casa ou com um único caso em uma mesma região, em pouco tempo, torna a desaparecer, não dando, muita vez, ocasião, para pesquisas mais pormenorizadas...” (MAGALHÃES, 1957).

Desde a sua primeira descrição em 1929 a FMB tem sido associada a alta letalidade. Nos seus primeiros relatos, a taxa de casos fatais foi de 75 a 80%. Entre 1985 e 2004 a média de

letalidade foi de 41,9% , mais especificamente na região de Campinas (ANGERAMI et al., 2006).

A doença passou um período, a partir da década de 40, com poucas notificações, provavelmente devido à introdução do uso de antibióticos de forma indiscriminada (LEMOS et al., 2001; GALVÃO, 2004).

A partir da década de 80, a FM novamente foi descrita sob a forma aguda e em “clusters”, além de ocorrer de forma isolada. Do ponto de vista epidemiológico, foram levantadas várias hipóteses como determinantes para o retorno da doença, entre elas a invasão de focos naturais, a disseminação da doença a partir da ação do homem nesses focos levando à formação de focos modificados, a disponibilidade diagnóstica e o interesse pela classe médica. Além disso, com a utilização de ferramentas moleculares, ocorreu a descrição de outras espécies envolvidas, além de *R. rickettsii*, como *R. felis*, *R. bellii* e *R. parkeri*, estas duas últimas espécies ainda sem associação com doença humana no Brasil (LEMOS et al., 2001; GALVÃO, 2004; SILVA; GALVÃO, 2004; HORTA et al., 2007; PINTER et al., 2008).

A idade média de ocorrência da doença pode variar bastante, tendo sido relatados pessoas doentes na faixa etária de 3 a 59 anos em casos ocorridos no Município de Pedreira, Estado de São Paulo. Ainda sobre os referidos casos, observou-se que ocorreram no período de junho a outubro (LEMOS et al., 2001).

No Brasil, desde o ano de 2001 a doença é de notificação obrigatória, através da Portaria nº 1943/GM e assim o aumento da notificação de doenças rickettsiais pode ser resultado, além de outros fatores, do maior interesse da classe médica pela doença, da disponibilidade de testes diagnósticos e da implementação de vigilância epidemiológica. No período de 1995 a 2005 foram registrados 386 casos de FM no Brasil, limitados a alguns Municípios dos estados de São Paulo (139 casos com letalidade de 42%), Minas Gerais (136 casos com letalidade de 22%), Espírito Santo (30 casos com letalidade de 23%), Rio de Janeiro (55 casos com letalidade de 24%) e Santa Catarina (26 casos sem registro de óbitos) (BRASIL, 2008).

No Estado do Rio de Janeiro há relato de ocorrência de casos de FM em diversos Municípios, com descrição de casos fatais e caracterização molecular de *R. rickettsii* (LEMOS et al., 2002b; ROZENTAL et al., 2006; LAMAS et al., 2008).

2.3 Diagnóstico

O diagnóstico da doença rickettsial é quase sempre confirmado por sorologia. Existem muitas possibilidades de métodos de diagnóstico sorológico para rickettsias, dentre eles o teste Weil-Felix, imunofluorescência, fixação de complemento, testes de aglutinação, ELISA e imunoblot (LA SCOLA; RAOULT, 1997). A evidência sorológica da infecção ocorre a partir da segunda semana da doença para qualquer doença rickettsial, quando são analisados em amostras pareadas. Desta forma, frequentemente o diagnóstico específico se encontra disponível após a recuperação ou óbito do paciente (LA SCOLA; RAOULT, 1997; DASH; EREMEEVA, 2006). Uma das maiores limitações na sorologia é a reação cruzada que quase sempre existe entre os antígenos dos patógenos dentro de um mesmo gênero e, ocasionalmente em diferentes gêneros (PAROLA; RAOULT, 2001).

O teste Weil-Felix é baseado na detecção de anticorpos, utilizando como antígeno várias espécies de *Proteus* que fazem reação cruzada com organismos do gênero *Rickettsia*, apresentando assim, baixa sensibilidade e especificidade (LA SCOLA; RAOULT, 1997; ISAAC et al., 2004).

O teste considerado padrão-ouro para diagnóstico é a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), sendo a técnica mais usada em laboratórios de referência para diagnóstico de casos agudos, estudos soropidemiológicos e testes de triagem. Este teste é muito sensível e relativamente rápido, mas tem as desvantagens de ser uma técnica subjetiva, sujeita a erros de leitura por parte do observador. A utilização de reagentes de boa qualidade e detalhes nos protocolos e equipamentos entre diferentes laboratórios e operadores pode acarretar em discrepâncias de resultados (LA SCOLA; RAOULT, 1997; DASH; EREMEEVA, 2006).

Outros métodos laboratoriais têm sido desenvolvidos, como imunohistoquímica, isolamento em cultivo de células e reação em cadeia da polimerase (PCR) (LA SCOLA; RAOULT, 1997). O isolamento a partir do cultivo é o mais confiável teste diagnóstico, mas exige laboratórios com estrutura de biossegurança para serem capazes de manter o material biológico, como os animais e linhagens de células (PAROLA et al., 2005).

O uso de cultivo de células para diagnóstico de rickettsioses foi descrito desde a década de 30 e é um método amplamente utilizado. Possibilita que o número de espécies de rickettsias tenha um aumento substancial e proporciona a obtenção de grandes quantidades das bactérias, promovendo seu uso para outras técnicas laboratoriais, como a confecção de antígenos para utilização em métodos de diagnóstico indireto (NIGG; LANDSTEINER, 1932; LABRUNA, 2006b). A metodologia de “shell vial” possibilita a identificação de rickettsias antes da soroconversão e pode ser utilizada para o diagnóstico de casos agudos (KELLY et al., 1991; MARRERO; RAOULT, 1989).

O método de imunohistoquímica proporciona uma melhor visualização de RGM, quando comparada com métodos diretos. Mas, esta técnica não é capaz de determinar a espécie de rickettsia. A técnica é realizada a partir de tecidos obtidos de necropsias ou biópsias (PADDOCK et al., 1999; PAROLA et al., 2005; ROZENTAL, 2006).

A técnica de PCR e o sequenciamento são atualmente considerados métodos mais rápidos e sensíveis para detectar e identificar rickettsia em sangue, biópsia de pele e artrópodes. Os principais marcadores utilizados são para os genes *ompA*, *ompB*, os quais codificam proteínas de membrana externa; para o gene que codifica a proteína de 17kDa (*htrA*); para o fragmento que amplifica o gene citrato sintase (*gltA*) e para o gene D (SCA4) (TZIANABOS et al., 1989; REGNERY et al., 1991; EREMEEVA et al., 1994; PAROLA, RAOULT, 2001; PAROLA et al., 2005).

Os artrópodes podem auxiliar em estudos epidemiológicos da FM, como na detecção de determinado patógeno numa área específica (PAROLA, RAOULT, 2001). Para a identificação de rickettsias em artrópodes são usadas técnicas de diagnóstico direto, como teste de hemolinfa, imunofluorescência direta para triagem, seguida de técnicas de análise genética (LA SCOLA; RAOULT, 1997).

2.4 Rickettsias do grupo da Febre Maculosa em animais vertebrados

A infecção nos mamíferos ocorre quando carrapatos infectados alimentam-se em hospedeiros susceptíveis (BURGDORFER, 1988). Para que uma espécie de vertebrado seja considerada um bom hospedeiro amplificador de *R. rickettsii* na natureza, ela deve preencher basicamente cinco quesitos: 1) ser abundante na área endêmica para a FM; 2) ser um bom hospedeiro do carrapato vetor em condições naturais; 3) ser susceptível à infecção por *R. rickettsii*; 4) manter *R. rickettsii* circulante em níveis plasmáticos suficientes para infectar carrapatos que nele se alimentam; 5) ter uma alta taxa de renovação populacional, ou seja, quanto

maior a renovação, maior será a introdução de animais susceptíveis na população (SPIELMAN; HODGSON, 2000).

Animais silvestres e domésticos estão envolvidos na cadeia epidemiológica da FM. A função dos caninos na epidemiologia da FM tem sido sugerida desde os primeiros relatos no Brasil. Dias; Martins (1939) sugeriram que o cão era um importante reservatório natural do agente da FM e responsável pela disseminação de vetores ao redor das habitações. Magalhães (1957) relatou a ocorrência de um cão positivo na reação de Weil-Felix que residia em local onde houve caso de FM. Sexton et al. (1993) relataram dois caninos positivos à microimunofluorescência onde ocorreram casos no Espírito Santo.

Nos EUA é reconhecida a doença causada por *R. rickettsii* (“Rocky Mountain spotted fever”- RMSF) em caninos, com os sintomas caracterizados por necrose dos tecidos da pele, andar cambaleante, febre, mal estar, vômito com sangue e diarreia (NICHOLSON et al., 2006). As manifestações clínicas em caninos e no homem são similares e a doença em cães pode preceder a doença em pessoas. E ainda, verificou-se no âmbito molecular que a espécie *R. rickettsii* de caninos foi altamente homóloga àquela que causou doença em pessoas de uma mesma região (KIDD et al., 2006).

No Brasil, casos naturais de FM nunca foram descritos em caninos, mas, experimentalmente foi visto que a doença pode ocorrer com sintomas muito parecidos com os relatados nos EUA, com período de rickettsemia entre 3 a 8 dias após a inoculação ou infestação por carrapatos que se manteve por 3 a 13 dias. Provavelmente, a doença é confundida com ehrlichiose, enfermidade que tem os sintomas clínicos e hematológicos bastante similares com os da FM (PIRANDA et al., 2008).

Em um estudo em área endêmica e área não endêmica de São Paulo, verificou-se que 12 (36,4%) dos 33 caninos da área endêmica foram positivos na RIFI e apenas 4 (12,9%) dos 31 caninos de área não endêmica foram positivos na RIFI para RGFM. Dos equinos, sete (77,8%) dos nove em uma área endêmica e 3 (27,3%) dos 11 de área não endêmica foram soro reativos. Os resultados mostraram que a prevalência de anticorpos anti-RGFM foi significativamente maior em caninos e equinos de áreas endêmicas quando comparados com os de área não endêmica. Este trabalho reforça que a epidemiologia da FM está intimamente associada com as espécies de carrapatos e seus hospedeiros vertebrados (LEMOS et al., 1996a).

Horta et al. (2004) detectaram anticorpos contra *R. rickettsii* em 17 (77,3%) equinos e em 5 (31,3%) dos caninos em área endêmica de São Paulo. Destes, dois caninos e sete equinos apresentaram anticorpos específicos contra *R. rickettsii*, pois apresentaram títulos pelo menos quatro vezes maior que contra as outras rickettsias testadas. Além de *R. rickettsii* também foram detectados anticorpos contra *R. felis*, *R. bellii* e anticorpos altamente relacionados contra *R. africae* e *R. parkeri*, mostrando a evidência de que outras espécies de rickettsias podem infectar animais domésticos. Tais resultados sugerem que equinos podem ser sentinelas de FM mesmo antes da ocorrência de casos humanos. É sugerido modelo para áreas endêmicas caracterizado por alta frequência de equinos sorologicamente positivos, seguido de uma menor frequência em caninos e, ainda menor ou ausente frequência de humanos positivos.

Ao comparar duas áreas em São Paulo, uma endêmica e outra não endêmica para FM, verificou-se que a maioria dos equinos e poucos caninos foram soropositivos e, em contrapartida, na área considerada não-endêmica nenhum cão ou equino apresentaram reatividade contra *R. rickettsii*, embora estivessem expostos a carrapatos da espécie *A. cajennense*. Os resultados deste trabalho indicam que a pesquisa na sorologia de equinos é um útil método para a vigilância de FM em áreas onde os humanos estão expostos ao carrapato *A. cajennense* (SANGIONI et al., 2005).

Em estudo com objetivo de verificar a infecção em animais por rickettsias em cinco áreas do estado de São Paulo foram encontrados soros positivos tanto para *R. rickettsii* como para *R. parkeri*. Foi considerado que alguns cães e equinos produziram anticorpos contra *R. rickettsii* por terem apresentado título pelo menos quatro vezes maior. Ainda existe a possibilidade de que além de *R. rickettsii*, outras rickettsias podem estar envolvidas na FM, como *R. parkeri* e *R. felis*. Foram positivos sorologicamente, pela RIFI, 60% de cães, 72,9% de equinos e 68,1% de marsupiais com título a 1:64 para pelo menos um dos antígenos testados (*R. parkeri*, *R. rickettsii*, *R. felis* e *R. bellii*). Neste trabalho sugere-se que alguns casos de FM diagnosticados no estado de São Paulo possam ter sido causadas por outras RGFM como *R. parkeri* ou *R. felis* (HORTA et al., 2007).

Em Rondônia foi verificado que 11,6% e 3,9% de caninos de região rural e urbana respectivamente foram positivos sorologicamente a pelo menos uma das seis espécies de *Rickettsia* testadas (*R. bellii*, *R. amblyommii*, *R. rhipicephali*, *R. rickettsii*, *R. parkeri* e *R. felis*). Na área rural, três soros mostraram títulos para *R. parkeri* pelo menos quatro vezes mais alto que para qualquer dos outros antígenos, sendo considerados homólogos para *R. parkeri* ou de genótipo altamente relacionado. Também seguindo o mesmo critério, dois soros de caninos de região rural foram considerados homólogos para *R. amblyommii*, dois outros para *R. rhipicephali* e um de cão urbano para *R. parkeri* (LABRUNA et al., 2007b).

Em estudo verificou-se que sete dos 25 soros de cães mostraram títulos para *R. rickettsii* pelo menos quatro vezes maior que qualquer dos outros antígenos testados (*R. felis*, *R. parkeri* e *R. bellii*), sendo os títulos de anticorpos atribuídos ao estímulo de infecção por *R. rickettsii*. De acordo com os resultados, foi mostrado que cães foram importantes sentinelas para a presença de *R. rickettsii* onde o carrapato *A. aureolatum* é considerado o principal vetor de FM na região estudada (PINTER et al., 2008).

Moraes-Filho et al. (2008) realizaram estudo em cães de uma localidade onde foi identificada *R. rickettsii* no carrapato *R. sanguineus*. Foram selecionados 23 caninos, destes 16 (69,6%) foram reativos à RIFI, com título variando de 1:256 a 1:32.768. Dos três animais que eram da propriedade onde tinham os carrapatos infectados tiveram o título de 1:8.192 e 1:32.768 e, o terceiro canino foi negativo.

No Rio Grande do Sul foi realizado estudo epidemiológico em caninos para verificação de anticorpos anti-*R. rickettsii* e outras RGFM e observou-se um frequência de 33,7% soros reativos, tendo verificado que os caninos que tinham contato com pastos e matas tiveram 2,138 vezes mais chance de serem sororeativos em comparação aos que não frequentaram estes ambientes (SAITO et al., 2008).

Em estudo para determinar as espécies de mamíferos silvestres e espécies de aves como hospedeiros naturais de *R. rickettsii* foi relatado que 15 diferentes espécies de mamíferos das Ordens Rodentia, Lagomorpha, Marsupialia, Carnivora e Artiodactyla e, 18 espécies de aves das Ordens Passeriformes, Ciconiiformes e Piceiformes apresentaram anticorpos contra RGFM. Foram detectadas sete cepas de RGFM, sendo uma em coelhos (*Oryctolagus* sp.), uma em gambás (Opossum) e cinco em roedores silvestres. Esses achados indicam a complexidade do ecossistema em que *R. rickettsii* é mantida e também identifica algumas das comunidades dentro do ecossistema envolvidas na rickettsioses transmitidas por carrapatos (BOZEMAN et al., 1967).

Horta et al. (2007) atentam para a importância de gatos domésticos e marsupiais como bons sentinelas devido seus hábitos silvestres, enquanto que os equinos ficam somente a pasto e caninos podem ter ou não hábitos silvestres. Experimentalmente, *Didelphis aurita* apresentaram infecção por *R. rickettsii*, mas não apresentaram sintomatologia clínica. O período de rickettsemia foi longo (30 dias). A taxa de infecção de carrapatos não infectados alimentados em animais com

rickettsemia foi baixa (5% e 18%), levando a considerar que outros hospedeiros amplificadores, como por exemplo capivaras, tenham uma maior significância ecológica para a história natural de *R. rickettsii* no Brasil (HORTA et al., 2008).

Há relatos de capivaras sororreativas para *R. rickettsii*, *R. parkeri* e *R. bellii*, demonstrando o seu envolvimento na FM (LEMOS et al., 1996b; PACHECO et al., 2007b).

2.5 Rickettsias do grupo da Febre Maculosa em carrapatos

2.5.1 Interação Rickettsia-carrapato

Os carrapatos ixodídeos podem atuar como vetores, reservatórios ou amplificadores de RGFM (PAROLA et al., 2005). Geralmente, adquirem a bactéria durante o repasto sanguíneo no período de rickettsemia dos hospedeiros vertebrados ou através da transmissão transovariana (BURGDORFER; BRINTON, 1975, NIEBYLSKI et al., 1999). Transmissão venérea, quando o carrapato macho transmite a bactéria durante a cópula para uma fêmea não infectada ou pela co-alimentação, quando muitos carrapatos se alimentam em sítios muito próximos em um mesmo hospedeiro são outras formas menos frequentes de transmissão de infecção rickettsiana identificadas nos carrapatos (PAROLA et al., 2005).

Os carrapatos *A. aureolatum* e *R. sanguineus* mostraram-se altamente susceptíveis à infecção por *R. rickettsii* pois foi verificado experimentalmente que 80-100 % de suas ninfas estavam infectadas após alimentação como larvas em hospedeiro infectado, enquanto que, nas mesmas condições, apenas 10-60% das ninfas de *A. cajennense* apresentaram-se infectadas (LABRUNA et al., 2008).

Haemaphysalis leporispalustris pode suportar infecção por *R. rickettsii* por pelo menos duas gerações, indicando a possível função deste ixodídeo na manutenção enzoótica de *R. rickettsii* na América Latina (FREITAS et al., 2008).

A transmissão transovariana serve como um mecanismo primário para a manutenção das rickettsias de baixa ou nenhuma patogenicidade (NIEBYLSKI et al., 1999). A partir de um exemplar de *Ixodes loricatus* infectado com *R. bellii*, obteve-se com sucesso sua transmissão transestadial e transovariana, sugerindo que esta espécie pode ser mantida na natureza em carrapatos sem a necessidade de hospedeiros vertebrados, pois não houve evidência direta ou indireta de infecção em hospedeiros vertebrados (HORTA et al., 2006).

Tem sido observado que a presença de rickettsias não patogênicas dentro de uma população de carrapatos pode minimizar a transmissão de *Rickettsia* patogênica (MACALUSO et al., 2002; BURGDORFER, 1988). *Dermacentor variabilis* desafiados com *R. montana* e posteriormente com *R. rhipicephali* e vice-versa, não foram capazes de manter as duas espécies de *Rickettsia*, sendo sugerido que a infecção nos ovários dos carrapatos pode alterar a expressão molecular dos oócitos bem como impossibilitar uma infecção secundária por outra rickettsia (MACALUSO et al., 2002).

A espécie *R. rickettsii* é capaz de produzir efeito letal no seu vetor. Desta forma, qualquer flutuação desta condição pode levar à emergência de FM ou então ao seu desaparecimento em certas áreas (NIEBYLSKI et al., 1999). Burgdorfer; Brinton (1975) relataram que todas as cepas de *R. rickettsii* estudadas afetaram de forma negativa o ingurgitamento das fêmeas ou na oviposição e conseqüente desenvolvimento dos ovos. Estes autores observaram que a partir da quinta geração filial de *D. andersoni* infectada, ocorreu um aumento na mortalidade de fêmeas ingurgitadas e as fêmeas sobreviventes tiveram sua postura reduzida em um terço ou até a metade. Observaram ainda que os carrapatos infectados na fase de larva sofrem infecção massiva

nos ovários quando na fase adulta, mas se a infecção ocorresse na fase adulta, esta infecção era limitada.

Foi observado experimentalmente que *D. andersoni* infectados foram capazes de fazer a transmissão transovariana de *R. rickettsii*, porém 97,5% dos carrapatos não chegaram a fase adulta. Estes fatos podem explicar a baixa prevalência de carrapatos infectados e sua manutenção na natureza (NIEBYLSKI et al., 1999).

Observou-se, experimentalmente, que o estágio de larva é menos susceptível ao efeito letal da bactéria *R. rickettsii* quando comparado com os estágios de adulto e ninfas, como verificado nos carrapatos *A. aureolatum*, *R. sanguineus* e *D. andersoni* (NIEBYLSKI et al., 1999; LABRUNA et al., 2008).

Os mecanismos deletérios aos carrapatos provocados por *R. rickettsii* associado ao fato de que a presença de uma rickettsia não patogênica dentro de uma população de carrapatos pode minimizar a transmissão de uma rickettsia patogênica (MACALUSO et al., 2002) caracterizam fortemente a epidemiologia da doença, conhecida como uma enfermidade que ocorre em “clusters” familiares e de caráter agudo.

2.5.2 Estudo da fauna de ixodídeos em áreas endêmicas para febre maculosa no Brasil

A presença de *A. cajennense* em diferentes hospedeiros, inclusive o homem, demonstra seu comportamento eclético, sua abundância na área endêmica e a presença de RGFM em nesta espécie, levam a uma interpretação de este ser o principal vetor de FM no Brasil (MOREIRA, MAGALHÃES, 1935; DIAS et al., 1937; MOREIRA, MAGALHÃES, 1937; DIAS; MARTINS, 1939; LEMOS et al., 1997a; HORTA et al., 2004; GUEDES et al., 2005).

A identificação de espécies de carrapatos em áreas consideradas endêmicas para FM tornou-se alvo de muitos estudos com o intuito de expandir o conhecimento da dinâmica desta doença. A seguir, serão descritas pesquisas da fauna de ixodídeos em locais onde ocorreram casos de FM no Brasil.

Em São Paulo, foram coletados durante um ano carrapatos da vegetação e de hospedeiros vertebrados (caninos, equinos, bovinos, capivaras, roedores e gambás). Tal área era usada para pastagens, sendo caracterizada por gramíneas, forragem e vegetação secundária de pinheiros. As espécies encontradas foram: *A. cajennense*, *A. dubitatum* (= *A. cooperi*), *A. triste*, *Dermacentor (Anocentor) nitens*, *R. sanguineus* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Observou-se que os adultos de *A. cajennense* foram encontrados ao longo de todo ano, com grande quantidade durante o verão, apresentando pico durante fevereiro e março. Larvas tiveram seu pico de atividade entre março e agosto e as ninfas entre junho e setembro, com pico em agosto (LEMOS et al., 1997a).

Em Minas Gerais o carrapato *A. cajennense* foi predominantemente encontrado em áreas com diferentes características geográficas e com diferenças no tipo de solo e na densidade populacional (LEMOS et al., 1997b).

No Município de Barra do Piraí, Estado do Rio de Janeiro, dos 474 ixodídeos coletados e identificados, foram relatados 103 da espécie *A. cajennense*, sete *A. aureolatum*, 209 *R. sanguineus* e 155 *Amblyomma* sp. (ROZENTAL et al., 2002).

Em Coronel Pacheco (MG), local onde ocorreram casos fatais, foram encontradas as espécies *A. cajennense* e *A. dubitatum* (GUEDES et al., 2005).

Souza et al. (2006) com o objetivo de determinar o comportamento populacional de larvas, ninfas e adultos de *Amblyomma* sp. no habitat de mata ciliar em área endêmica para FM,

observaram que os picos populacionais de larvas e ninfas deste gênero se estenderam praticamente todos os meses do ano. As ninfas foram mais abundantes de julho a dezembro. Os adultos de *A. cajennense* foram mais abundantes na estação da primavera e verão (outubro a abril). Os adultos de *A. dubitatum* tiveram seu pico populacional de agosto a fevereiro, tendo um padrão sazonal diferenciado de *A. cajennense*.

No Município de Campinas, carrapatos foram coletados da vegetação e das capivaras do parque urbano da cidade. Dos 1708 exemplares coletados sobre a vegetação foram identificados carrapatos da espécie *A. cajennense* (236 machos e 276 fêmeas), *A. dubitatum* (56 machos) e 1140 ninfas de *Amblyomma* sp.. Das capivaras foram coletados 75 machos de *A. dubitatum* (ESTRADA et al., 2006).

Em estudo realizado em várias localidades endêmicas e não endêmicas para FM de São Paulo, os carrapatos encontrados nos cães e gatos foram *R. sanguineus*, *A. aureolatum* e *A. cajennense*. Os equinos estavam parasitados por *D. (A.) nitens* e *A. cajennense* (HORTA et al., 2007).

Em área endêmica para FM no Espírito Santo houve relato dos carrapatos *A. cajennense*, *A. dubitatum*, *D. (A.) nitens* e *R. sanguineus* circulante na região (OLIVEIRA et al., 2008).

Dentre os carrapatos coletados do Município de Santo André foram encontradas três espécies: *R. sanguineus* (316), *A. aureolatum* (135) e *A. longirostre* (2) e ninfas de *Amblyomma* sp. (27). No total, *A. aureolatum* e *R. sanguineus* estavam presentes em 52,4% e 43,2% das residências, respectivamente (MORAES-FILHO et al., 2008).

2.5.3 Rickettsias em carrapatos no Brasil

É difícil determinar quantas espécies de carrapatos estão associadas à rickettsias. *Rickettsia rickettsii*, considerada altamente patogênica ao homem, pode estar associada a diferentes ixodídeos (PAROLA et al., 2005). Nos últimos anos têm sido detectadas diferentes espécies de carrapato infectadas com rickettsias no Brasil.

Pesquisas da décadas de 30 e 40 relataram o encontro de carrapatos *A. cajennense* e *A. aureolatum* infectados com *Rickettsia*, com diagnóstico baseado na inoculação em cobaias, levando a considerar o papel preponderante do gênero *Amblyomma* na disseminação de FM (GOMES, 1933; MOREIRA; MAGALHÃES, 1935; DIAS et al., 1937; VALLEJO-FREIRE, 1946).

A partir de *A. dubitatum* coletado de capivaras do Município de Pedreira, região endêmica para FM, foi feito isolamento primário de RGFM, em células Vero e identificada em imunofluorescência. Ao considerar que esta espécie de carrapato parasita geralmente capivaras, é sugerido que este hospedeiro seja importante na perpetuação de rickettsias na região (LEMOS et al., 1996b).

Ixodídeos coletados no estado de Minas Gerais foram submetidos a testes de hemolinfa e teste de imunofluorescência direta. Dos 514 carrapatos das espécies *A. cajennense*, *D. (A.) nitens*, *R. (B.) microplus*, *R. sanguineus* e *A. ovale* submetidos ao teste de hemolinfa, 24 apresentaram estruturas intracelulares semelhantes à rickettsia nos hemócitos, sugerindo ser RGFM. A prevalência da infecção em carrapatos foi de 8,1%. Apenas três (1%) espécimes de *A. cajennense* reagiram para *R. rickettsii* no teste de imunofluorescência direta (LEMOS et al., 1997b).

Utilizando-se como diagnóstico cultivo celular e imunofluorescência foi diagnosticada RGFM em *A. dubitatum* coletado em São Paulo (MELLES et al., 1999).

No Município de Barra do Piraí, Rio de Janeiro, dos 153 carrapatos submetidos ao teste de hemolinfa, 1,3% foram positivos. Uma ninfa de *Amblyomma* sp. e um (1) macho de *R.*

sanguineus apresentaram organismos intracelulares com morfologia semelhante à RGFM. No teste de hemolinfa associado à imunofluorescência direta a prevalência foi de 0,6%, onde uma ninfa de *R. sanguineus* foi positiva a ambos os testes (ROZENTAL et al., 2002).

Em estudo em área endêmica de São Paulo, foi observada taxa de infecção de um total de 40 carrapatos da espécie *A. dubitatum* de 40% para a presença de *R. bellii* e 7,5% para RGFM. Dois isolados de *R. bellii* foram estabelecidos em cultivo celular e posteriormente confirmado por análise molecular como *R. bellii*, enquanto que do isolado de RGFM foi possível observar que estava altamente relacionada com *R. parkeri*, *R. africae* e *R. sibirica*. Tais resultados forneceram algumas considerações na função de *A. dubitatum* na ecologia de *R. rickettsii*, porém não foram suficientes para afirmar a participação deste carrapato na epidemiologia da FM da área estudada (LABRUNA et al., 2004a).

Dos ixodídeos coletados em Monte Negro, Rondônia, foi identificada *R. bellii* em *A. ovale*, *A. scalpturatum*, *A. oblongoguttatum*, *A. rotundatum* e *A. humerale*. Nos carrapatos *A. cajennense* e *A. coelebs* foi identificada *R. amblyommi*. A espécie *R. bellii* foi isolada em células VERO a partir dos carrapatos *A. scalpturatum*, *A. ovale*, *A. rotundatum* e *A. oblongoguttatum*, mas somente de um dos isolados, cultivado a partir de *A. scalpturatum*, foram estabelecidas sucessivas passagens (LABRUNA et al., 2004b).

A partir de carrapatos coletados em Coronel Pacheco, Minas Gerais, foi detectado DNA de microrganismos com 100% de similaridade com *R. rickettsii* em um *pool* de três carrapatos *A. cajennense*. A sequência foi 100% similar à encontrada em *A. aureolatum* coletado no estado de São Paulo. Neste estudo, a espécie *R. rickettsii* detectada em *A. cajennense* possivelmente foi responsável pelos casos fatais ocorridos neste local (GUEDES et al., 2005).

Rickettsias caracterizadas como *R. bellii* e *R. rhipicephali* foram isoladas a partir de carrapatos *H. juxtakochi* coletados de São Paulo (LABRUNA et al., 2007c). Na mesma espécie de carrapato, coletada em Rondônia, também foi identificada *R. rhipicephali* (LABRUNA et al., 2005a).

No Município de Campinas, localidade considerada endêmica para FM, cinco fêmeas de *A. cajennense* (da vegetação) e quatro machos de *A. dubitatum* (das capivaras) apresentaram DNA rickettsial com amplificação do gene *gltA*. Todos os fragmentos amplificados foram sequenciados e apresentaram similaridade entre 96 e 99% com *R. bellii*. No teste de hemolinfa, 36% dos carrapatos *A. dubitatum* apresentaram elementos com morfologia e coloração semelhantes à RGFM, dois dos quais, confirmados por PCR (ESTRADA et al., 2006).

De 669 carrapatos da espécie *A. aureolatum* coletados de área onde ocorreram casos de FM, verificou-se que 11 (1,64%) apresentaram organismos semelhantes à rickettsias nos hemócitos. Através do cultivo celular e análise molecular, observou-se que seis (0,89%) carrapatos estavam infectados com *R. rickettsii* e dez (1,49%) estavam infectados com *R. bellii*. Os autores sugerem que o carrapato *A. aureolatum* seja um importante vetor de FM no Brasil (PINTER; LABRUNA, 2006).

Em estudo realizado em várias localidades de São Paulo, não foram detectados DNA de rickettsias nos carrapatos testados de cães e gatos, porém foi detectado *R. bellii* em carrapatos (*I. loricatus*, *A. dubitatum* e *Amblyomma* sp.) de marsupiais. As razões para estes resultados negativos são possivelmente o pequeno número de carrapatos testados e a baixa taxa de infecção de *R. parkeri* e *R. rickettsii* em carrapatos na natureza (HORTA et al., 2007).

Em área endêmica para FM no Espírito Santo foi observado que houve amplificação do gene rickettsial que codifica a proteína de 17kDa nos carrapatos *A. cajennense*, *A. dubitatum*, *R. sanguineus* e *D. (A.) nitens*, e pulgas *Ctenocephalides felis*, mostrando que *Rickettsia* sp. circula entre todas as espécies de carrapatos coletados na área e confirmando a função de diferentes

ectoparasitas na manutenção desses organismos. Além disso, foi verificada a presença de *R. felis* em *R. sanguineus* e *Ctenocephalides felis* (OLIVEIRA et al., 2008).

Dos carrapatos de residências do Município de Santo André, localidade endêmica, foi verificado que dentre os carrapatos *A. aureolatum*, quatro espécimes estavam infectados por *R. bellii* e dois carrapatos da espécie *R. sanguineus* estavam infectados com *R. rickettsii* (MORAES-FILHO et al., 2008).

No quadro 1 está contida a compilação de dados a partir de publicações (do ano de 1996 a 2008) sobre a identificação de carrapatos infectados por RGFM no Brasil.

Quadro 1: Compilação de dados a partir de publicações indexadas (1996 a 2008) sobre a identificação de carrapatos infectados com rickettsias do grupo da febre maculosa (RGFM) no Brasil.

ESPÉCIE DE CARRAPATO DE ORIGEM	RICKETTSIA(S) IDENTIFICADA(S)	LOCAL DE ORIGEM	MÉTODO(S) DE DIAGNÓSTICO	REFERÊNCIA
<i>Amblyomma dubitatum</i>	RGFM	São Paulo	Cultivo celular e imunofluorescência	Lemos et al. (1996b)
<i>Amblyomma cajennense</i>	RGFM	Minas Gerais	Teste de hemolinfa e imunofluorescência	Lemos et al. (1997b)
<i>Dermacentor (Anocentor) nitens</i> <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> , <i>Rhipicephalus sanguineus</i> e <i>Amblyomma ovale</i>			Teste de hemolinfa	
<i>Amblyomma dubitatum</i>	RGFM	São Paulo	Cultivo celular e imunofluorescência	Melles et al. (1999)
Ninfa de <i>Amblyomma</i> sp. <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	RGFM	Rio de Janeiro	Teste de hemolinfa	Rozenal et al. (2002)
Ninfa de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>			Teste de hemolinfa e Imunofluorescência	
<i>Amblyomma dubitatum</i>	<i>Rickettsia bellii</i>	São Paulo	Cultivo celular e molecular	Labruna et al. (2004a)
<i>Amblyomma ovale</i> <i>Amblyomma scalpturatum</i> <i>Amblyomma oblongoguttatum</i> <i>Amblyomma rotundatum</i> <i>Amblyomma humerale</i>	<i>R. bellii</i>	Rondônia	Cultivo celular e molecular	Labruna et al. (2004b)
<i>Amblyomma cajennense</i> <i>Amblyomma coelebs</i>	<i>R. amblyommii</i>			
<i>Amblyomma cajennense</i>	<i>R. rickettsii</i>	Minas Gerais	Molecular	Guedes et al. (2005)
<i>Haemaphysalis juxtakochi</i>	<i>R. rhipicephali</i>	Rondônia	Molecular	Labruna et al. (2005)
<i>Haemaphysalis juxtakochi</i>	<i>R. bellii</i> e <i>R. rhipicephali</i>	São Paulo	Cultivo celular e molecular	Labruna et al. (2007c)
<i>Amblyomma cajennense</i> <i>Amblyomma dubitatum</i>	<i>R. bellii</i>	São Paulo	Teste de hemolinfa e Molecular	Estrada et al. (2006)
<i>Amblyomma aureolatum</i>	<i>R. rickettsii</i> e <i>R. bellii</i>	São Paulo	Teste de hemolinfa, cultivo celular e molecular	Pinter; Labruna (2006)
<i>Ixodes loricatus</i> <i>Amblyomma dubitatum</i> <i>Amblyomma</i> sp.	<i>R. bellii</i>	São Paulo	Molecular	Horta et al. (2007)
<i>Amblyomma cajennense</i> <i>Amblyomma dubitatum</i> <i>Rhipicephalus sanguineus</i> <i>Dermacentor (Anocentor) nitens</i>	RGFM	Espírito Santo	Molecular	Oliveira et al. (2008)
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	<i>R. felis</i>			
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	<i>R. rickettsii</i>	São Paulo	Molecular	Moraes-Filho et al. (2008)
<i>Amblyomma aureolatum</i>	<i>R. bellii</i>			

2.6 Influência do tipo de vegetação na epidemiologia da febre maculosa: breves considerações

Sonenshine et al. (1972b) sugeriram que o tipo de vegetação poderia ser um dos principais fatores ecológicos para a distribuição da RMSF, pois a distribuição dos vetores está associada com características da vegetação. Os resultados de seu estudo demonstraram associação entre a distribuição de casos com as características fisiográficas das áreas. Após a comparação entre diferentes áreas de ocorrência de RMSF foi sugerido que a incidência de casos relatados estava nitidamente relacionada a áreas de florestas tipicamente decíduas predominantemente, em particular com a presença de pinheiros e pinos.

As florestas homogêneas tropicais de *Eucalyptus* e *Pinus* trouxeram no início do século XX uma nova oferta de recurso madeireiro para a indústria e o comércio brasileiros (LIMA, 1996; QUAGLIA, 1999). Em muitas áreas rurais do Sudeste, principalmente Rio de Janeiro e São Paulo, as áreas de pastagens foram substituídas por plantações de *Eucalyptus* e *Pinus* devido a maior rentabilidade financeira neste setor em comparação com a pecuária leiteira. Mas deve-se levar em consideração que qualquer cultura que seja feita sem critérios ambientais é extremamente prejudicial ao meio ambiente e ao homem. No caso de *Eucalyptus*, vários são os meios adotados para integrar as plantações ao ambiente natural (CENIBRA, 2008).

A fauna sobrevivente a esse processo de substituição massiva das florestas originais pelas homogêneas, isolada em minúsculos fragmentos florestais nativos remanescentes, viu-se obrigada a explorar esses novos ambientes florestais, seja por eles oferecerem abrigo, proteção, alguns recursos alimentares, ou mesmo conectividade entre os fragmentos florestais nativos remanescentes (SILVEIRA, 2005).

Esses novos florestamentos, embora não possam substituir o papel ecológico das florestas nativas em todas as suas complexidades estruturais, morfológicas e funcionais, fornecem, em muitos casos, uma alternativa de sobrevivência a algumas espécies animais (MOREIRA; BERNDT, 1994).

Porém, somente a presença das espécies vegetais plantadas nessas florestas, não é o suficiente para garantir a sobrevivência da fauna. A presença de um sub-bosque desenvolvido aumenta em muito a ocupação desses ambientes homogêneos por diversos grupos animais, quando comparados a reflorestamentos homogêneos sem a presença de nenhum sub-bosque, pois podem fornecer ofertas de alimentos, abrigo, proteção e o estabelecimento de um ambiente favorável à movimentação dos animais (ALMEIDA, 1996; SILVEIRA, 2005; STALLINGS, 1989; STALLINGS, 1991). Estudo de Fonseca (1997) constatou que plantações de *Eucalyptus* podem servir como expansão de habitat para algumas espécies quando há proximidade entre ambientes de mata nativa e talhão de *Eucalyptus* próximos ao Parque Estadual do Rio Doce.

A cultura de *Eucalyptus* pode atuar como um novo ambiente para a flora e fauna locais (MOREIRA; BERNDT, 1994), porém, como qualquer monocultura, quando comparada às florestas naturais, revela menor biodiversidade animal e vegetal (QUAGLIA, 1999). Espécies de hábitos mais generalistas conseguem se manter com maior facilidade em ambientes sujeitos à modificações (DOTTA, 2005; SILVEIRA, 2005). Em estudo, foram encontrados mamíferos não-voadores pouco exigentes em área rodeada por *Eucalyptus* (GHELER-COSTA, 2002). Silva (2001) observou que o plantio de *Eucalyptus* pode ser localmente importante na conservação de mamíferos não-voadores, visto que este ambiente é utilizado como habitat ou mesmo para deslocamento por muitas espécies que circulam na área.

Em ambiente caracterizado por mosaico de pequenas áreas florestais envolvidos por áreas de pastagens, agricultura e reflorestamento com espécies exóticas foi constatada a presença de

mamíferos de pequeno a grande porte, sendo capivaras e coatis as espécies mais abundantes (GUELER-COSTA, 2002). Dentre as espécies registradas no levantamento geral em áreas de florestas de *Eucalyptus* foram encontrados representantes de quase todas as ordens de mamíferos terrestres, com exceção de primatas e perissodáctilos. Os animais frugívoros/onívoros representaram a categoria trófica mais abundante. Neste grupo estão *Didelphis albiventris*, *D. aurita*, *Chrysocyon brachyurus*, *Cerdocyon thous*, *Nasua nasua* e *Procyon cancrivorus* (SILVEIRA, 2005).

Aproximadamente 255 espécies de aves foram registradas em áreas de plantações de eucaliptos e sub-bosque nativo com um lago, em São Paulo, tendo sido verificado valor próximo ao registro de 263 espécies registradas em mata natural. Verificou-se que houve oscilação do número e riqueza de espécies quando havia a retirada da madeira (WILLIS, 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Justificativa da escolha da localidade estudada

O estudo foi desenvolvido no Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro devido à ocorrência de cinco casos de FM. Os casos ocorreram no mês de maio de 2006. As cinco pessoas infectadas eram membros de uma mesma família e moravam em residência arrendada dentro de uma propriedade rural. Dois adultos vieram a óbito. E as três crianças foram tratadas e tiveram recuperação total da doença. Em anexo apresenta-se relatório sobre a descrição dos casos elaborado pelo Serviço de Epidemiologia da Secretaria Municipal de Desenvolvimento Sustentável, Saúde e Qualidade de Vida da Prefeitura Municipal de Resende (Anexo 1).

O diagnóstico dos referidos casos foi realizado no Laboratório de Hantavirose e Rickettsioses da Fundação Oswaldo Cruz, baseado na técnica de imunofluorescência indireta e nos dados clínico-epidemiológicos.

No Município de Resende nunca havia sido diagnosticados casos de FM apesar de em Municípios adjacentes, como Barra do Piraí e Barra Mansa, terem sido confirmados casos da doença.

A prefeitura de Resende se mostrou totalmente disponível para o apoio do presente estudo, tendo fornecido a infraestrutura para as atividades de coleta do material biológico.

3.2 Descrição geográfica do Município de Resende

O Município de Resende está localizado na região do Vale do Médio Paraíba Sul Fluminense, de clima classificado como tropical de altitude. Seus limites geográficos são ao norte: Estado de Minas Gerais; ao sul e a oeste: Estado de São Paulo e a leste: Estado do Rio de Janeiro (Figura 2).

O Distrito de Engenheiro Passos, situado no Município de Resende, é caracterizado como uma área rural, com fazendas de atividade pecuária, principalmente de gado leiteiro. Devido à produção de leite não ter sido rentável, muitas propriedades rurais da região foram arrendadas para o plantio de *Eucalyptus* e *Pinus*.

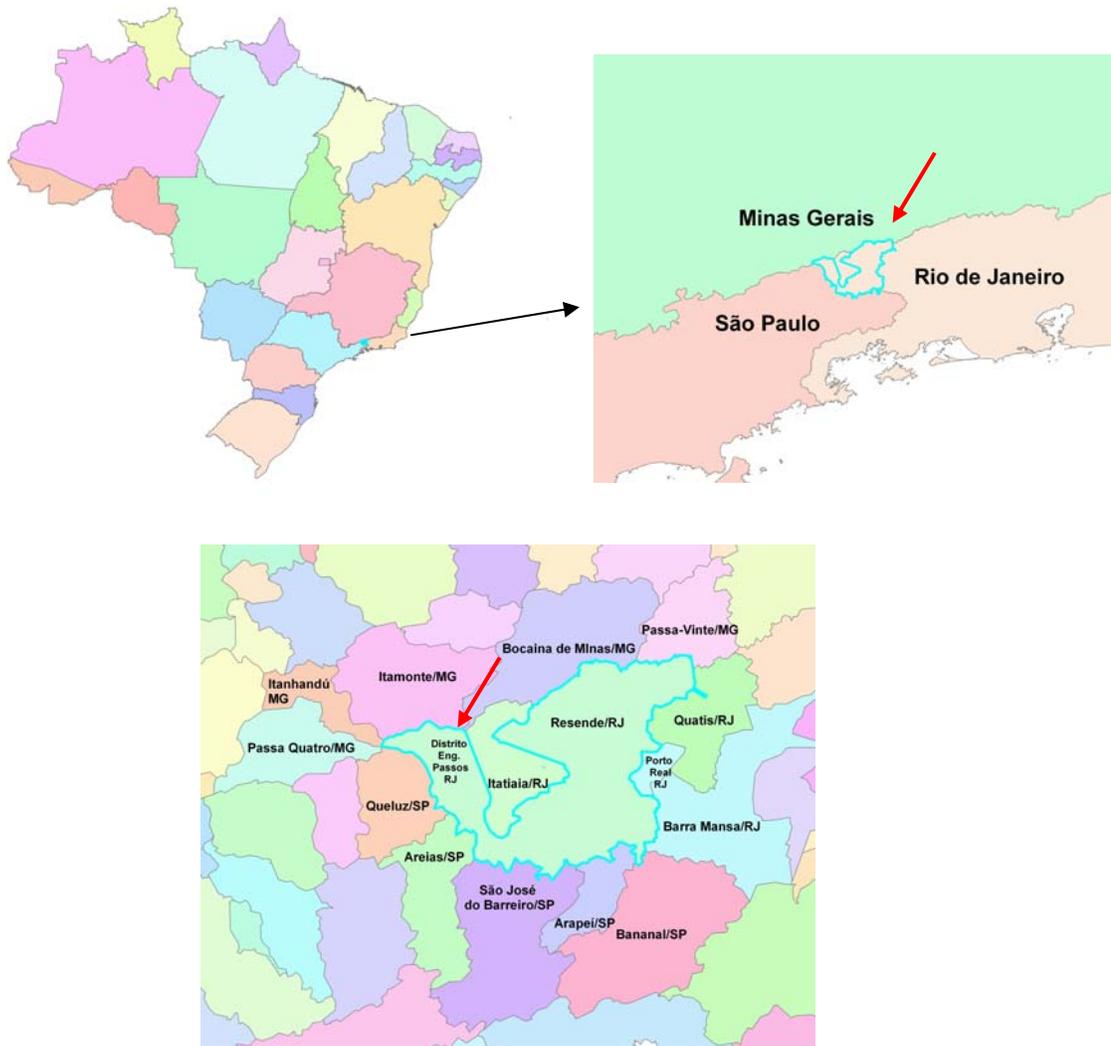


Figura 2: Mapas geográficos para localização do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro. Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

3.3 Delineamento do estudo

As coletas de sangue canino, equino e seus carrapatos foram realizadas em propriedades rurais e domicílios que estivessem no máximo a seis quilômetros da propriedade rural onde ocorreram os casos humanos, caracterizada como foco (=propriedade 1). Cada propriedade foi marcada com Sistema de Posicionamento Global (GPS), tendo sido verificada a distância que havia até o foco.

A seleção das propriedades foi de acordo com a distância até o foco e com o consentimento dos proprietários.

As coletas ocorreram em 19 diferentes localidades. As propriedades “1” a “14” e “19” eram rurais (4 haras e 6 fazendas) e, “16” a “18” foram caracterizadas como domicílios peri-

urbanos. A propriedade “15” foi caracterizada como domicílio peri-urbano onde ficavam os caninos e, como propriedade rural onde os equinos frequentavam (Figura 3 e Tabela 1).

Durante o período de trabalho a campo, houve uma coleta realizada durante a campanha de vacinação anti-rábica do Município. Como esses animais tinham o mesmo tipo de manejo, foram incluídos como pertencentes a apenas um domicílio.

Em doze propriedades visitadas havia a presença de caninos e equinos e em sete havia a presença apenas de caninos.

Utilizou-se a técnica de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para o estudo de ocorrência de RGFM no Município de Resende/RJ, tendo sido conduzido conforme dois delineamentos: um estudo transversal para os caninos e equinos, e um estudo longitudinal descritivo apenas para os caninos.

Para o estudo transversal, foi considerada apenas uma amostra de soro canino, tendo sido realizada a RIFI em 100% dos caninos que tiveram sangue coletado. Dos equinos, como critério de seleção testou-se 40% dos soros, escolhidos aleatoriamente, de cada propriedade. Em caso de positividade em pelo menos um soro de determinada propriedade, todas as outras amostras de soros desta propriedade eram testadas.

No estudo longitudinal foram utilizados os soros dos caninos que tiveram mais de uma amostra coletada. Primeiramente foram testadas duas amostras de diferentes datas de cada animal. Em caso de reatividade em ao menos uma delas, todas as outras foram testadas. Em caso de não reatividade, não se testou mais soros desses animais. Receberam mais de uma visita sete propriedades para a coleta seriada dos soros dos caninos. Destas, seis consideradas rurais e um domicílio periurbano.

Após a obtenção dos resultados na RIFI, os caninos que foram reativos à RIFI, tiveram seus carrapatos submetidos à técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).



Figura 3: Localização das 19 propriedades de onde foram coletados sangue e carrapatos de caninos e equinos procedentes do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, no período de junho de 2006 a julho de 2007. Utilização da ferramenta “Google Earth”.

Tabela 1: Descrição das 19 propriedades onde foram coletados sangue e carrapatos de caninos e equinos, localizadas no Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, no período de junho de 2006 a julho de 2007.

Propriedade	Localização GPS	Altitude (m)	Distância até o foco (m)
1* (foco)	22°30'9.46"S 44°42'44.29"O	512	--
2*	22°30'42.32"S 44°42'56.82"O	491	1.116,64
3*	22°28'24.52"S 44°41'30.40"O	514	3.795,88
4*	22°29'51.20"S 44°42'44.29"O	517	576,02
5*	22°29'30.59"S 44°43'9.41"O	531	1.463,47
6*	22°27'7.38"S 44°42'0.43"O	705	5.707,26
7*	22°29'10.40"S 44°42'29.31"O	559	1.837,48
8*	22°27'10.30"S 44°42'22.20"O	694	5.527,80
9*	22°27'15.70"S 44°42'1.39"O	677	5.451,60
10*	22°27'7.59"S 44°41'46.88"O	753	5.790,13
11*	22°29'26.93"S 44°40'16.96"O	480	4.289,74
12*	S22°29'18.33"S 44°40'19.31"O	485	4.319,21
13*	22°30'16.70"S 44°41'0.25"O	503	2.847,34
14*	22°31'11.36"S 44°43'7.98"O	511	2.064,64
15*/**	22°30'26.66"S 44°40'17.58"O	480	4.094,82
16**	22°30'2.83"S 44°40'23.92"O	472	3.884,80
17**	22°30'11.47"S 44°40'30.86"O	475	3.749,02
18**	22°30'1.18"S 44°40'27.95"O	472	3.767,93
19*	22°29'52.84"S 44°41'53.80"O	511	1.412,06

*Propriedade rural

**Casas do peridomicílio

3.4 Atividades de trabalho de campo

3.4.1 Estudo epidemiológico de RGFM

Para a realização do trabalho de campo, fizeram parte da equipe alunos de graduação e pós-graduação da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e funcionários do Centro de Controle de Zoonoses do Município de Resende.

As coletas ocorreram mensalmente no período de junho de 2006 a julho de 2007. Algumas propriedades receberam mais de uma visita e outras foram visitadas apenas uma vez. As propriedades que tiveram coletas sistemáticas foram separadas em dois grupos e, as visitas ocorreram a cada dois meses de forma intercalada. Desta forma, alguns animais tiveram material coletado mais de uma vez, variando de duas a sete coletas. Os proprietários permitiram a coleta em seus animais e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2).

A coleta do sangue dos caninos foi realizada por venopunção radial ou jugular e dos equinos por venopunção jugular. O sangue ficou acondicionado em tubo com vácuo com capacidade para 10mL sem anticoagulante e permaneceu resfriado até a obtenção do soro. Posteriormente, os soros ficaram acondicionados à -20⁰C até o momento da análise. Os frascos contendo sangue dos caninos e equinos foram identificados com o nome do animal, propriedade de procedência e data da coleta.

Durante a coleta foram utilizados pela equipe de coleta equipamentos de proteção individual e os animais foram contidos com finalidade de fornecer segurança a todos os membros da equipe.

No momento da coleta, realizou-se questionário aos proprietários para a obtenção da resenha dos animais e informações sobre o manejo (Anexo 3). Os questionários foram direcionados individualmente para cada animal e continham perguntas para respostas abertas e fechadas.

3.4.2 Estudo da fauna de ixodídeos

Os carrapatos dos animais foram coletados no momento da coleta de sangue dos animais. Os carrapatos foram retirados com auxílio de pinça oftálmica ou por torção manual, acondicionados em frascos de plástico contendo pequenos furos e grama fresca, identificados com a data da coleta, o nome do animal e da fazenda ou domicílio.

3.5 Caracterização da área onde ocorreram os casos de febre maculosa

A residência onde ocorreram os casos de FM fazia parte de uma propriedade, onde as pessoas que residiam neste local haviam arrendado espaço de terra de uma grande propriedade. Nesta residência moravam sete pessoas, membros de uma mesma família. Logo após terem ocorrido os casos, a residência foi abandonada pelos moradores que foram residir em propriedade rural vizinha. Em volta da casa havia uma pequena horta e pastagem para animais composta por *Brachiaria brizantha* (“brachiarão”) em abundância e *Cynodon dactylon* (L.) (“grama de burro”). Ao redor de toda a propriedade, aproximadamente a 50 metros, havia plantação de *Eucalyptus* com idade de aproximadamente 1 ano, e, em outra área na mesma distância havia vegetação secundária de mata atlântica. E, a aproximadamente 300 metros havia outra plantação de *Eucalyptus* de aproximadamente 3 anos. Toda a propriedade rural era cortada por afluentes do Rio Paraíba do Sul com presença de mata nativa nas margens (Figura 4).

3.6 Caracterização das áreas estudadas

As propriedades rurais visitadas foram caracterizadas como pequenas a médias propriedades, com criações de bovinos, equinos, ovinos e agricultura para subsistência. Havia em algumas propriedades a presença de outros animais de produção para a própria subsistência, como suínos e galinhas (Figura 5).

As casas do peridomicílio ficavam concentradas em determinadas áreas dentro do Distrito. Ao redor havia a presença de propriedades rurais e vegetação secundária da mata atlântica. Na maioria das casas havia a presença de mais de um canino, sendo em média três animais por domicílio.

Uma forte característica na região estudada foi a substituição de grandes áreas de pastagens por plantações de *Eucalyptus*. Esses florestamentos eram de diferentes idades e em todos havia a presença de sub-bosques.

Através do questionário foram obtidas informações sobre os animais silvestres que viviam na área de estudo. Os animais mais mencionados foram pequenos roedores e gambás, tendo sido também relatada a presença de capivaras e antas na região.

Durante os meses da coleta a temperatura média foi de 21^oC, umidade relativa média de 77% e índice de precipitação total de 1727 mm (média de 123mm ao mês) (Figura 4) (INSTITUTO DE METEOROLOGIA, 2007).

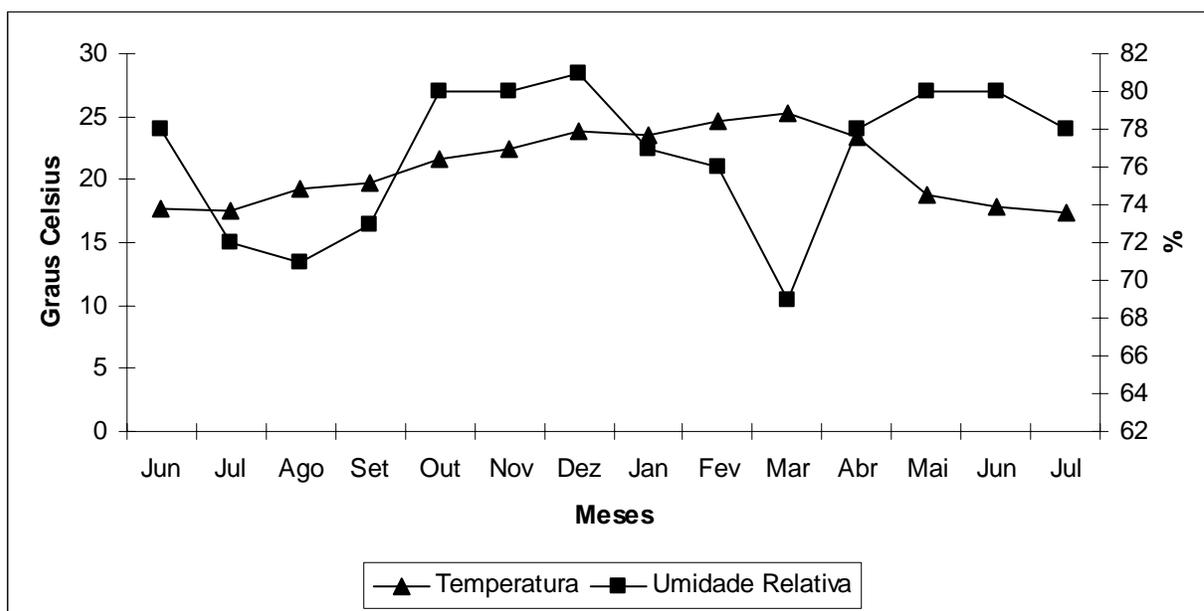


Figura 4: Temperatura em graus Celsius (°C) e umidade relativa (%) ocorridas no Distrito Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, nos meses de junho de 2006 a julho de 2007. Fonte: Instituto de Meteorologia.



Figura 5: Fotografias da localidade de casos de febre maculosa (FM), no Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, no período de junho de 2006 a julho de 2007. A-Residência onde moravam as pessoas que adoeceram por FM, com ênfase na plantação de *Eucalyptus* em torno do local. B-Vista lateral do foco, presença de córrego bem próximo ao local. C-Criação de bovinos, típico em toda a região. D-Crianças que adoeceram por FM no local de estudo. E-Aspecto geral da região estudada, caracterizada por áreas desmatadas, vegetação secundária de mata atlântica e plantação de *Eucalyptus*.

3.7 Caracterização dos caninos e eqüinos

De uma forma geral, os caninos das propriedades visitadas recebiam como alimentação comida caseira e ração comercial de baixa qualidade. Não tinham assistência veterinária, apenas quando ocorriam casos graves de doença. Mas, os proprietários faziam uso indiscriminado de produtos veterinários como larvicidas e parasiticidas de uso parenteral, como avermectinas (Figura 6).

Os caninos das propriedades rurais eram em sua maioria sem raça definida, criados soltos e/ou presos em correntes, estas geralmente postas em locais bem próximos às casas de seus proprietários. A função dentro da propriedade variava entre animais de companhia, para guarda e com finalidade de caça. O estado de geral de saúde para estes animais foi caracterizado como razoável a ruim, com raras exceções em que os animais apresentavam bom estado de saúde.

Os caninos das casas do peri-domicílio eram criados soltos pela casa ou presos em canis, com finalidade de animais de companhia e/ou guarda. O estado geral desses animais foi caracterizado como bom.

A criação dos equinos tinha como finalidade o manejo da fazenda ou para comercialização e exposição. Os animais de uma forma geral apresentavam bom estado de saúde, sendo que os animais criados em haras recebiam assistência veterinária contínua. Os proprietários dos animais das fazendas faziam uso de produtos anti-parasitários e outros produtos, sem a orientação de profissional capacitado (Figura 6).



Figura 6: Aspecto geral dos caninos e equinos procedentes do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, dos quais foram coletados sangue e carrapatos, no período de junho de 2006 a julho de 2007.

3.8 Técnicas de diagnóstico laboratorial utilizadas

3.8.1 Reação de imunofluorescência indireta

A técnica foi executada no Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz e no Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Foram utilizados como controles positivos para amostras de caninos os soros LR1208/04 e LR 506/07 e como controle negativos os soros LR 486/07 e LR 489/07, registrados no Laboratório de Hantavirose e Rickettsioses. Na execução da técnica para o teste nos equinos, foram utilizados os soros de registro LR905/05 (controle positivo) e LR892/05 (controle negativo). Os referidos controles eram amostras de soro de animais naturalmente infectados.

Foi utilizado conjugado marcado com isotocianato de fluoresceína ligado ao soro anti-canino (KPL - lote 07456) e anti-equino (KPL - lote 060844 e Sigma – lote 036K4821). A titulação usada na sorologia dos caninos foi de 1:80 e dos equinos de 1:40, para o conjugado da marca KPL e 1:16 para o conjugado da marca Sigma.

Para proceder a técnica de RIFI, foram utilizadas lâminas de 12 orifícios da marca PANBIO® marcadas com *R. rickettsii*. A diluição dos soros-teste e controle foi de 1:64. Assim, 30µL dos soros-teste e dos controles diluídos em tampão salino fosfatado (PBS) foram dispostos em cada orifício das lâminas e armazenadas em câmara úmida em estufa bacteriológica a 37°C, durante meia hora. Após este tempo, as lâminas foram lavadas com solução salina de tampão fosfato (PBS), imersas por período de dez minutos no mesmo tampão e secas ao ar. Então, foi adicionado 30µL de conjugado diluído em PBS e as lâminas armazenadas sob as mesmas condições por mais trinta minutos. Posteriormente, foram lavadas conforme descrito anteriormente e montadas com pequena gota de glicerina tamponada e cobertas por lamínula. Realizou-se a leitura das lâminas em microscópio de fluorescência a luz ultra-violeta com aumento de 40 vezes. Foram considerados positivos todos os orifícios que apresentaram pontos fluorescentes mais ou menos uniformes com formas cocóides, bacilares ou cocobacilares (figura 7). Os soros-teste que apresentaram reatividade foram diluídos até chegarem a sua titulação máxima.

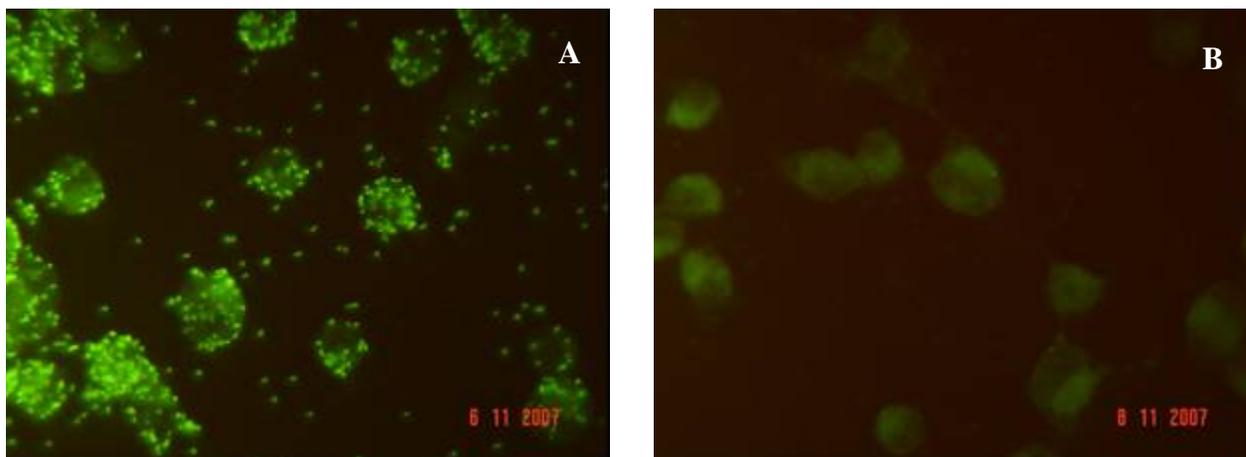


Figura 7: Técnica de Reação de imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos anti *Rickettsia rickettsii*. A - Resultado de soro reagente. B - Resultado de soro não reagente.

3.8.2 Identificação taxonômica dos carrapatos

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Após a coleta, os carrapatos coletados foram mantidos em estufa para demanda biológica de oxigênio (B.O.D.), em temperatura de 27 °C (± 1 °C) e umidade relativa acima de 80%, até o momento da identificação. Todas as identificações ocorreram em prazo máximo de 48 horas após a coleta. Os carrapatos que estavam no estágio de ninfas ingurgitadas foram identificados e permaneceram na B.O.D até a mudança para o estágio adulto, quando foi realizada a verificação da espécie e sexo. Após a identificação, todos os carrapatos permaneceram em freezer a -20°C até o momento da análise pela PCR.

Realizou-se a identificação das espécies e do sexo com base na chave dicotômica de Aragão e Fonseca (1961a) e Barros-Battesti et al. (2006), com auxílio de lupa estereoscópica. Devido à falta de chave para identificação de ninfas de *Amblyomma*, estas foram identificadas apenas em nível de gênero. Devido à necessidade de confecção de lâminas para a identificação das larvas, estas não foram identificadas em função da possibilidade de serem utilizadas posteriormente na PCR.

3.8.3 Técnicas moleculares

3.8.3.1 Reação em cadeia da polimerase

A técnica de PCR foi utilizada para os carrapatos dos caninos que foram reativos à RIFI. A etapa de preparação dos carrapatos para a PCR foi realizada no Laboratório de Doenças Parasitárias e a PCR foi executada no Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses.

Em uma etapa anterior à realização da PCR, os carrapatos foram separados de acordo com sua espécie, sexo, animal fonte, data da coleta e localidade de procedência. E, posteriormente foram submetidos à esterilização superficial com hipoclorito de sódio a 1% e álcool 70% e lavados em água destilada estéril e posteriormente foram totalmente triturados com auxílio de uma ponteira estéril de 1 mL com a ponta queimada, que serviu de pistilo. Antes da etapa de trituração, os tubos tipo *ependorf* estéril que continham os carrapatos ficaram imersos em nitrogênio líquido por dez segundos. Após esta etapa, o material ficou ressuspendido em 20 µL de meio BHI e estocado a -20°C até o momento da extração de DNA.

Para a extração do DNA dos carrapatos utilizou-se o Mini Kit QIAamp DNA (QIAGEN®). Para extração de DNA utilizou-se protocolo para tecidos (Anexo 4), seguindo as recomendações do fabricante, com modificações.

Pools formados por grupos de quatro a nove carrapatos, contendo 8µL de DNA de cada carrapato, foram submetidos à PCR utilizando quatro conjuntos de marcadores: Rr190.70p/Rr190.602n (*ompA*) (REGNERY et al., 1991), BG1-21/BG2-20 (*ompB*) (EREMEEVA et al., 1994), Tz15/Tz16 (*htrA*) (TZIANABOS et al., 1989) e RpCS.877p/RpCS.1258n (*gltA*) (REGNERY et al., 1991) (Tabela 2). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% e visualizados sob luz ultravioleta com brometo de etídio. No caso de amplificação do *pool*, cada DNA foi submetido individualmente para cada par de marcador descrito.

As reações foram realizadas em termociclador (Mastercycler personal-Eppendorf® ou Applied Biosystems®) programado para uma temperatura de desnaturação inicial das fitas de DNA a 95°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos consecutivos de 40 segundos a 95°C para desnaturação, para anelamento temperatura de 55°C por 1 min e extensão a 72°C por 1min e

10seg e um ciclo final de 7 min a 72°C. Para cada reação foi usado 8 µL de DNA adicionado a tampão para PCR (10X Invitrogen™), dois pares de marcadores (20mM), MgCl₂ (3mM), dNTPs (20mM), Platinum Taq DNA Polimerase (5 U/µL Invitrogen™) e água livre de nucleases em um volume final de 25µL (Tabela 3).

Para o controle positivo utilizou-se DNA de *R. rickettsii*. Este material foi submetido à extração de DNA usando o Mini Kit QIAamp DNA (QIAGEN®), seguindo as orientações do fabricante para extração de sangue e fluidos corpóreos, com modificações (Anexo 5). Como controle negativo foi usado água livre de nucleases.

Tabela 2: Marcadores para amplificação dos genes *ompA*; *ompB*; *gltA* e *htrA* utilizados na reação em cadeia da polimerase.

Genes	Marcadores	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Proteína	Fragmento esperado (pb)	Referência
<i>ompA</i>	Rr190.70p	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA	190-kDa		Regnery et al., 1991
	Rr190.602n	AGTGCAGCATTTCGCTCCCCCT	190-kDa	532	
<i>ompB</i>	BG 1-2	GGCAATTAATATCGCTGACGG	120-kDa		Eremeeva et al., 1994
	BG 2-20	GCATCTGCACTAGCACTTTC	120-kDa	650	
<i>gltA</i>	Rp877p	GGGGACCTGCTCACGGCGG	Citrato sintase		Regnery et al., 1991
	Rp1258n	ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA	Citrato sintase	381	
<i>htrA</i>	Tz-15	TTCTCAATTCGGTAAGGGC	17- kDa		Tzianabos et al., 1989
	Tz-16	ATATTGACCAGTGCTATTTTC	17- kDa	246	

Tabela 3: Volume das soluções usadas na reação em cadeia da polimerase a partir de amostras de carrapatos.

Soluções	Volume utilizado (μ L)
Água livre de nucleases	10,1
Tampão para PCR	2,5
MgCl ₂	1,5
dNTPs	0,25
Iniciador 1	1,2
Iniciador 2	1,2
Taq DNA polimerase	0,25
DNA	8
TOTAL	25

3.8.3.2 Sequenciamento de amostra positiva

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses.

Foi realizado o sequenciamento do material que apresentou amplificação na PCR. Foi preparado um *mix* para PCR em volume de 100µL e todo o conteúdo foi inserido em um único poço da cuba de eletroforese. Após a corrida do gel, este foi cortado onde estava a banda. A amostra foi purificada utilizando-se o Kit QIAquick®, de acordo com protocolo para extração de gel, com modificações (Anexo 6). Após a purificação da amostra, foi realizada a quantificação do DNA, utilizando-se o low DNA mass ladder.

No ciclo de sequenciamento foi usado kit com nucleotídeos marcados (Big Dye). Realizaram-se 25 ciclos a 96°C por 15 segundos para desnaturação, 50°C por 20 segundos para anelamento e 60°C por 31 min para extensão.

O material obtido foi sequenciado pelo ABI PRISM®. As sequências nucleotídicas foram editadas em software Bioedit® e comparadas com os correspondentes homólogos de acordo com as sequências disponíveis no GenBank. Utilizou-se o programa Discontiguous Mega Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A sequência de nucleotídeos obtida foi traduzida em sequência protéica através do programa Blastx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

3.9 Processamento e análise dos dados

Para caninos e equinos foi realizada a associação dos resultados da RIFI com as respostas obtidas do questionário, como o sexo; idade; tipo de propriedade que o animal vivia e locais que os animais tinham o hábito de frequentar.

Foi utilizado o teste de Fisher, com nível de significância de 95% de confiança, para observação de possíveis diferenças significativas entre as frequências encontradas nos resultados da sorologia e as respostas obtidas a partir do questionário. As análises foram realizadas com o auxílio do programa computacional Graph Pad InStat.

Para a análise epidemiológica dos dados, foram calculados risco relativo e risco atribuível, conforme Pereira (2002).

4 RESULTADOS

4.1 Análise soro epidemiológica

4.1.1 Caninos

Para análise soro epidemiológica dos caninos, estes animais foram separados em dois grupos. No primeiro grupo, considerou-se o estudo transversal, em que levou-se em consideração apenas uma amostra por animal. Para isso, foram analisados um total de 105 soros para detecção de anticorpos da classe IgG anti-*R. rickettsii* em cães. Verificou-se que 29 (27,62%) dos soros foram reativos, com títulos variando de 1:64 a 1:4096 e 76 (72,38%) soros foram não reativos. No segundo grupo foram considerados os caninos que fizeram parte do estudo longitudinal, nos quais tiveram mais de uma amostra coletada e foram ao menos uma vez reativos à RIFI.

Para estudo da distribuição de animais reativos e não reativos à RIFI nas diferentes localidades visitadas, os resultados dos animais foram separados por propriedade (Tabela 4).

Os resultados dos soros reativos foram avaliados em relação à titulação máxima e aos meses de coleta (Tabelas 5 e 6). A maioria dos animais apresentou titulação igual a 1:64. Foi observado que os animais que apresentaram titulação maior que 1:64 eram procedentes das propriedades “1” (foco), “4”, “5” e “10”. As propriedades “4” e 5 eram vizinhas à propriedade de ocorrência dos casos de FM e a propriedade “10” apresentava caninos que tinham hábitos constantes de caça e estava localizada em região de elevada altitude.

As amostras de soros caninos com titulações acima de 1:64 tiveram uma tendência em diminuir ao longo dos meses subsequentes. Os animais que mantiveram reatividade alta (animais número “16” e “19”) ao longo dos meses coletados eram procedentes da propriedade onde ocorreu o foco da doença (Tabela 5).

Tabela 4: Resultados da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos da classe IgG anti-*Rickettsia rickettsii* de caninos, procedentes do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, de acordo com as propriedades de procedência. Coleta de sangue realizada no período de junho de 2006 a julho de 2007.

RIFI anti <i>Rickettsia rickettsii</i> (N=105)		
Propriedade	Reativo (%)	Não reativo (%)
1	5 (45,45%)	6 (54,55%)
2	4 (33,33%)	8 (66,67%)
3	2 (66,67%)	1 (33,33%)
4	3 (75%)	1 (25%)
5	4 (66,7%)	2 (33,3%)
6	0	3 (100%)
7	0	3 (100%)
8	0	1 (100%)
9	2 (100%)	0
10	3 (42,9%)	4 (51,7%)
11	0	6 (100%)
12	0	4 (100%)
13	0	4 (100%)
14	0	1(100%)
15	3 (20%)	12 (80%)
16	0	1 (100%)
17	1 (33,3%)	2 (66,7%)
18	0	15 (100%)
19	2 (50%)	2 (50%)
TOTAL	29 (27,62%)	76 (72,38%)

Tabela 5: Resultados das amostras de soros reativos na reação de imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos da classe IgG anti-*Rickettsia rickettsii* em caninos procedentes do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, de acordo com o mês de coleta. Coleta de sangue realizada no período de junho de 2006 a julho de 2007.

Meses de coleta	Nº do canino	Propriedade procedente	Titulação Máxima	Total de caninos reativos em relação ao total de caninos testados
Junho/2006	20	1	1:128	3/3
	16	1	1:512	
	19	1	1:512	
Julho/2006	30	2	1:64	7/21
	20	1	1:64	
	16	1	1:4096	
	19	1	1:512	
	21	1	1:512	
	23	5	1:256	
	27	5	1:64	
Agosto/2006	16	1	1:2048	4/39
	30	2	1:64	
	35	2	1:64	
	27	2	1:64	
Setembro/2006	36	3	1:64	1/3
Outubro/2006	46	4	1:4096	2/12
	28	5	1:64	
Novembro/2006	36	3	1:64	2/10
	16	1	1:1024	
Dezembro/2006	19	1	1:256	2/3
	25	5	1:64	
Janeiro/2007	--	--	--	0/4
Fevereiro/2007	19	1	1:256	1/3
Março/2007	36	3	1:64	1/3
Abril/2007	19	1	1:128	6/6
	71	1	1:64	
	76	2	1:64	
	77	2	1:64	
	105	4	1:64	
	106	4	1:128	
Maio/2007	36	3	1:64	6/19
	65	19	1:64	
	68	19	1:64	
	80	9	1:64	
	81	9	1:64	
	83	17	1:64	
Junho/2007	92	15	1:64	4/16
	95	15	1:64	
	98	15	1:64	
	19	1	1:128	
Julho/2007	107	10	1:64	4/9
	108	10	1:128	
	113	10	1:64	
	37	3	1:64	

Tabela 6: Resultados da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos da classe IgG-anti *Rickettsia rickettsii* de caninos procedentes do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, de acordo com a titulação máxima de cada animal. Coleta de sangue realizada no período de junho de 2006 a julho de 2007.

Titulação	RIFI anti <i>Rickettsia rickettsii</i>
	Total de animais reativos (%)
1:64	22 (75,9)
1:128	2 (6,9)
1:256	1 (3,4)
1:512	2 (6,9)
1:1024	0
1:2048	0
1:4096	2 (6,9)
Total	29 (100)

Dos caninos que fizeram parte do estudo longitudinal foi realizada uma descrição dos resultados de acordo com os meses de coleta (Tabela 7). Foi possível verificar que alguns animais mantiveram reatividade durante todo o período de coleta e que outros não demonstraram resultados constantes com oscilação dos resultados entre reativos e não reativos.

Tabela 7: Resultados da técnica de imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos da classe IgG anti-*Rickettsia rickettsii* de caninos com amostras seriadas, de acordo com a titulação máxima de cada animal. Coleta de sangue realizada no período de junho de 2006 a julho de 2007 de caninos provenientes do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro.

Propriedade	Número de identificação do canino	Data da coleta	Resultado
1	16	Junho/2006	1:128
		Julho/2006	1:4096
		Agosto/2006	1:2048
		Novembro/2006	1:1024
1	19	Junho/2006	1:512
		Julho/2006	1:512
		Dezembro/2006	1:256
		Fevereiro/2007	1:256
		Abril/2007	1:128
1	20	Junho/2006	1:128
		Julho/2006	1:64
5	28	Julho/2006	NÃO REATIVO
		Agosto/2006	NÃO REATIVO
		Outubro/2006	1:64
		Janeiro/2006	NÃO REATIVO
5	25	Julho/2006	NÃO REATIVO
		Agosto/2006	NÃO REATIVO
		Outubro/2006	NÃO REATIVO
		Dezembro/2006	1:64
5	27	Julho/2006	1:64
		Agosto/2006	1:64
		Outubro/2006	NÃO REATIVO
		Dezembro/2006	NÃO REATIVO
		Março/2006	NÃO REATIVO
2	35	Julho/2006	NÃO REATIVO
		Agosto/2006	1:64
		Outubro/2006	NÃO REATIVO
2	30	Julho/2006	1:64
		Agosto/2006	1:64
3	36	Agosto/2006	NÃO REATIVO
		Setembro/2006	1:64
		Novembro/2006	1:64
		Janeiro/2007	NÃO REATIVO
		Março/2007	1:64
		Maior/2007	1:64
3	37	Julho/2007	NÃO REATIVO
		Agosto/2006	NÃO REATIVO
		Julho/2007	1:64

De acordo com as respostas obtidas nos questionários, foram realizadas análises da associação dos resultados obtidos na sorologia, em relação: ao sexo dos animais (Tabela 8); à idade dividida em duas categorias (até 5 anos e acima de 5 anos) (Tabela 9); ao tipo de habitat (domicílio ou fazenda) (Tabela 10); hábito dos caninos frequentarem pastos e matas (Tabelas 11 e 12). Observou-se que houve diferença significativa em relação à reatividade dos animais e o tipo de habitat e de seus hábitos de frequentarem pastos e matas. Em relação ao sexo e idade, não houve diferença significativa.

Em relação aos mesmos parâmetros foi realizado estudo de risco relativo e risco atribuível. Observou-se alto risco para a ocorrência de animais sorologicamente reativos quando apresentavam hábito de frequentarem pastos e matas (Tabelas 8, 9, 10, 11 e 12).

Tabela 8: Resultados, quanto ao sexo, da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos da classe IgG anti-*Rickettsia rickettsii* em caninos. Soros provenientes de cães do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, coletados no período de junho de 2006 a julho de 2007.

Sexo	RIFI anti <i>Rickettsia rickettsii</i>		Total
	Reativo	Não reativo	
Macho	13 (23%)	44 (77%)	57 (100%)
Fêmea	16 (33%)	32 (67%)	48 (100%)
TOTAL	29	76	105

p= 0,2760

Risco Relativo= 1,43

Risco atribuível= 10%

Tabela 9: Resultados, quanto à idade, da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos da classe IgG anti-*Rickettsia rickettsii* em caninos. Soros provenientes de cães do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, coletados no período de junho de 2006 a julho de 2007.

Idade Categórica	RIFI anti <i>Rickettsia rickettsii</i>		Total
	Reativo	Não reativo	
Até 5 anos	23 (26%)	67 (74%)	90 (100%)
6 anos ou mais	6 (40%)	9 (60%)	15 (100%)
TOTAL	29	76	105

p=0,3483

Risco Relativo= 1,54

Risco atribuível= 14%

Tabela 10: Resultados, quanto ao tipo de habitat, da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos da classe IgG anti-*Rickettsia rickettsii* em caninos. Soros provenientes de cães do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, coletados no período de junho de 2006 a julho de 2007.

Tipo de Habitat	RIFI anti <i>Rickettsia rickettsii</i>		
	Reativo	Não reativo	
Fazenda	25 (35%)	46 (65%)	71 (100%)
Domicílio	4 (12%)	30 (88%)	34 (100%)
TOTAL	29	76	105

p= 0,0185
 Risco Relativo= 2,92
 Risco atribuível= 23%

Tabela 11: Resultados, quanto ao hábito de frequentar pastos, da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos da classe IgG anti-*Rickettsia rickettsii* de caninos. Soros provenientes de cães do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, coletados no período de junho de 2006 a julho de 2007.

Pastos	RIFI anti <i>Rickettsia rickettsii</i>		
	Reativo	Não reativo	
SIM	28 (38%)	45 (62%)	73 (100%)
NÃO	1 (3%)	31 (97%)	32 (100%)
TOTAL	29	76	105

p < 0.0001
 Risco Relativo= 12,67
 Risco atribuível= 35%

Tabela 12: Resultados, quanto ao hábito de frequentar matas, da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos da classe IgG anti-*Rickettsia rickettsii* de caninos. Soros provenientes de cães do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, coletados no período de junho de 2006 a julho de 2007.

Matas	RIFI anti <i>Rickettsia rickettsii</i>		
	Reativo	Não reativo	
SIM	28 (37%)	48 (63%)	76 (100%)
NÃO	1 (3%)	28 (97%)	29 (100%)
TOTAL	29	76	105

p= 0,0004

Risco Relativo= 12,33

Risco atribuível= 34%

4.1.2 Equinos

Na análise soro epidemiológica dos equinos observou-se um total de 9 (9,4%) animais reativos e 87 (90,6%) não reativos à RIFI para detecção de anticorpos anti-*R. rickettsii*.

Na tabela 13 são mostrados os resultados da sorologia de acordo com as propriedades visitadas. As propriedades que apresentaram animais com resultados reativos foram “2”, “3”, “4”, “7” e “8”.

A partir do critério de seleção realizado em equinos para realização da sorologia (40% dos soros de cada propriedade testados), apenas duas propriedades tiveram animais reativos (propriedades “7” e “8”). Assim, foram testadas todas as amostras de soro destas propriedades. Como as coletas nas duas propriedades ocorreram em novembro de 2006, nota-se neste mês um maior número de animais testados.

Os resultados dos soros testados conforme os meses de coleta estão apresentados na tabela 14. Observou-se que todos os animais tiveram titulação máxima de 1:64.

Não houve diferença estatística entre os resultados da sorologia em relação: ao sexo (Tabela 15), à idade (Tabela 16) e à localidade onde os animais viviam (haras ou fazenda) (Tabela 17).

Nas análises de risco relativo e risco atribuível não foi possível perceber uma maior chance de ocorrência de animais reativos para *R. rickettsii* frente aos parâmetros analisados (Tabelas 15, 16 e 17).

Tabela 13: Resultados da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos da classe IgG anti-*Rickettsia rickettsii* em equinos, de acordo com as propriedades de procedência. Soros provenientes de equinos do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, coletados no período de junho de 2006 a julho de 2007.

RIFI anti <i>Rickettsia rickettsii</i> (N=96)		
Propriedade	Reativo (%)	Não reativo (%)
1	0	2 (100%)
2	1 (50%)	1 (50%)
3	1 (20%)	4 (80%)
4	2 (20%)	8 (80%)
5	0	2 (100%)
6	0	5 (100%)
7	2 (9,5%)	19 (90,5%)
8	3 (10,3%)	26 (89,7%)
9	0	5 (100%)
10	0	3 (100%)
12	0	7 (100%)
15	0	6 (100%)
TOTAL	9 (9,4%)	87 (90,6%)

Tabela 14: Resultados das amostras de soros reativos (título 1:64) de equinos, de acordo com o mês de coleta. Soros provenientes de equinos do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, coletados no período de junho de 2006 a julho de 2007.

Meses de coleta	Nº do equino	Propriedade procedente	Total de equinos reativos em relação ao total de equinos testados
Junho/2006	--	--	0/2
Julho/2006	12	4	1/17
Agosto/2006	12	4	1/10
Outubro/2006	12	4	1/7
Novembro/2006	51	8	5/55
	70	8	
	72	8	
	89	7	
	93	7	
Dezembro/2006	12	4	1/3
Janeiro/2007	1	3	¼
Fevereiro/2007	--	--	0/7
Abril/2007	19	4	½
Maió/2007	--	--	0/5
Junho/2007	24	2	1/8
Julho/2007	--	--	0/3

Tabela 15: Resultados, quanto ao sexo, da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos da classe IgG anti-*Rickettsia rickettsii* em equinos. Soros provenientes de animais do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, coletados no período de junho de 2006 a julho de 2007.

Sexo	RIFI anti <i>Rickettsia rickettsii</i>		Total
	Reativo	Não reativo	
Macho	2 (7%)	28 (93%)	30 (100%)
Fêmea	7 (11%)	59 (89%)	65 (100%)
TOTAL	9	87	96

p=0,7155

Risco relativo=0,61

Risco Atribuível= 4%

Tabela 16: Resultados, quanto à idade, da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos da classe IgG anti-*Rickettsia rickettsii* em equinos. Soros provenientes de animais do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, coletados no período de junho de 2006 a julho de 2007.

Idade Categórica	RIFI anti <i>Rickettsia rickettsii</i>		Total
	Reativo	Não reativo	
Até 10 anos	5 (7%)	69 (93%)	74 (100%)
11 anos ou mais	4(18%)	18 (82%)	22 (100%)
TOTAL	9	87	96

p= 0,2036

Risco relativo= 0,37

Risco atribuível= 11%

Tabela 17: Resultados, quanto ao tipo de habitat, da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos da classe IgG anti-*Rickettsia rickettsii* em equinos. Soros provenientes de animais do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, coletados no período de junho de 2006 a julho de 2007.

Tipo de Habitat	RIFI anti <i>Rickettsia rickettsii</i>		
	Reativo	Não reativo	
Fazenda	4 (12%)	30 (88%)	34 (100%)
Haras	5 (8%)	57 (92%)	62 (100%)
TOTAL	9	87	96

p= 0,7163

Risco relativo= 1,46

Risco atribuível= 4%

4.2 Fauna de ixodídeos

4.2.1 Caninos

No presente estudo observou-se que 44% dos 200 caninos observados estavam infestados por carrapatos, tendo sido coletado um total de 470 carrapatos. Foram identificadas as espécies *R. sanguineus*, *A. cajennense*, *A. aureolatum*, *A. ovale* e *R. (B.) microplus* (Tabelas 18 e 19) e ninfas de *Amblyomma* sp., *R. sanguineus* e *R. (B.) microplus*, além de 33 larvas sem identificação (Tabelas 19 e 21).

Das ninfas ingurgitadas coletadas, 29 passaram para o estágio adulto, sendo identificadas 25 da espécie *A. cajennense* (11 machos e 14 fêmeas) e quatro *R. sanguineus* (2 machos e 2 fêmeas).

Foi possível observar que o carrapato *R. sanguineus* ocorreu ao longo de todo o ano, sem qualquer pico em relação à época do ano. *Amblyomma aureolatum* esteve presente nos meses de abril a novembro. As ninfas de *Amblyomma* sp. ocorreram nos meses de abril a dezembro. Das demais espécies não foi possível realizar uma avaliação da dinâmica ao longo dos meses estudados devido a pouca quantidade de ixodídeos encontrados (Tabela 20).

Em agosto de 2006 notou-se um grande número de caninos e carrapatos porque houve neste mês uma coleta durante a campanha de vacinação anti-rábica do Município.

Tabela 18: Espécimes de carrapatos adultos coletados de caninos procedentes do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro. A coleta foi realizada no período de junho de 2006 a julho de 2007.

Espécie	M	Fêmeas		Total
		NI	PI	
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	87	72	38	197
<i>Rhipicephalus (B.) microplus</i>	2	1	9	12
<i>Amblyomma cajennense</i>	4	4	0	8
<i>Amblyomma aureolatum</i>	6	15	6	27
<i>Amblyomma ovale</i>	2	3	0	5
Total				249

M= machos; NI= não ingurgitadas; PI= parcialmente ingurgitadas

Tabela 19: Intensidade de carrapatos coletados de caninos provenientes de 19 propriedades do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro. A coleta foi realizada no período de junho de 2006 a julho de 2007.

	Ninfas								Larvas
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	<i>Amblyomma cajennense</i>	<i>Amblyomma aureolatum</i>	<i>Amblyomma ovale</i>	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	<i>Amblyomma</i> sp.	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	
Ocorrência de caninos parasitados	39	2	13	3	5	9	51	2	6
Intensidade de carrapatos por canino* N ^o de propriedades com infestação (n/N)	5,1±6,0 (1-26)	4,0±4,2 (1-7)	2,1±2,1 (1-8)	1,7±0,9 (1-3)	2,4±2,2 (1-6)	2,1±1,3 (1-4)	3,3±2,5 (1-9)	1 (1)	4,7±8,1 (1-23)
	10/19	1/19	6/19	2/19	3/19	5/19	11/19	2/19	5/19

*média± desvio padrão e amplitude

n= Número de propriedades com caninos parasitados

N= Total de propriedades visitadas

Tabela 20: Carrapatos coletados de caninos ao longo dos meses de visitas às 19 propriedades do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro. Período de coleta de junho de 2006 a julho de 2007.

Meses de coleta	Nº de caninos infestados por carrapatos (n/N)(%)	<i>Rhipicephalus Sanguineus</i>	<i>Amblyomma aureolatum</i>	<i>Amblyomma cajennense</i>	<i>Amblyomma Ovale</i>	<i>Rhipicephalus (Boophilus) Microplus</i>	Ninfa de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Ninfa de <i>Amblyomma</i> sp.	Ninfa de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Larvas	Total
Junho/2006	3/3(100%)	10	1	--	--	--	--	1	--	--	12
Julho/2006	9/21(42,86%)	4	1	7	--	2	2	27	--	1	44
Agosto/2006	23/41(57%)	60	2	--	--	4	5	39	--	2	112
Setembro/2006	5/12(41,67%)	37	--	--	--	--	--	10	--	--	47
Outubro/2006	6/16(37,6%)	1	2	--	2	--	--	24	1	--	30
Novembro/2006	5/18(27,78%)	21	2	1	--	--	2	9	1	--	36
Dezembro/2006	2/7(28,57%)	--	--	--	--	--	1	1	--	--	2
Janeiro/2007	1/7(14,29%)	15	--	--	--	--	--	--	--	--	15
Fevereiro/2007	--/4	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Março/2007	2/6(33,33%)	12	--	--	--	--	--	--	--	--	12
Abril/2007	5/13(38,46%)	1	12	--	3	6	--	1	--	--	23
Maió/2007	9/23(39,13%)	25	1	--	--	--	9	--	--	4	39
Junho/2007	12/20(60%)	7	5	--	--	--	--	31	--	25	68
Julho/2007	6/9(66,67%)	4	1	--	--	--	--	24	--	1	30
Total	88/200	197	27	8	5	12	19	167	2	33	470

n= caninos parasitados
N= caninos observados

Tabela 21: Espécimes de carrapatos em estágios imaturos coletados de caninos procedentes do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro. Período de coleta de junho de 2006 a julho de 2007.

ESTÁGIOS IMATUROS	Espécies	TOTAL
NINFAS	<i>Amblyomma</i> sp.	167
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	19
	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	2
LARVAS	NI	33
TOTAL		221

NI= não identificada

4.2.2 Equinos

Um total de 975 carrapatos provenientes de 200 equinos observados foram coletados, tendo sido identificados adultos das espécies: *A. cajennense*, *R.(B.) microplus* e *D. (A.) nitens* (Tabelas 22 e 24). Também foram coletadas ninfas de *Amblyomma* sp., *R.(B.) microplus* e *D.(A.) nitens*, além de 15 larvas sem identificação (Tabelas 23 e 24). Considerando-se o total de equinos ao longo de todos os meses de trabalho de campo, foi verificado que 71% desses animais estavam parasitados por carrapatos em pelo menos em uma das visitas.

Das ninfas que passaram para o estágio de adultos, foram identificadas como sendo da espécie *A. cajennense*, sendo 17 machos e 21 fêmeas, em um total de 38 carrapatos.

Observou-se que os ixodídeos adultos da espécie *A. cajennense* se distribuíram ao longo de todos os meses do ano, com a exceção apenas do mês de setembro. As ninfas de *Amblyomma* sp. estiveram presente dos meses de junho a novembro. As demais espécies não apresentaram distribuição constante ao longo dos meses das coletas (Tabela 25).

Tabela 22: Espécimes de carrapatos adultos coletados de equinos procedentes do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro. Período de coleta de junho de 2006 a julho de 2007.

Espécie	M	Fêmeas		Total
		NI	PI	
<i>Amblyomma cajennense</i>	403	286	51	740
<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	10	16	32	58
<i>Dermacentor (Anocentor) nitens</i>	12	12	32	56
Total				854

M= machos; NI= não ingurgitadas; PI= parcialmente ingurgitadas

Tabela 23: Espécimes de carrapatos em estágios imaturos coletados de equinos procedentes do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro. Período de coleta de junho de 2006 a julho de 2007.

ESTÁGIOS IMATUROS	Espécies	TOTAL
NINFAS	<i>Amblyomma</i> sp.	85
	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	15
	<i>Dermacentor (Anocentor) nitens</i>	5
LARVAS	NI	16
TOTAL		121

NI= não identificada

Tabela 24: Intensidade de carrapatos coletados de equinos provenientes de 15 propriedades do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro. Período de coleta de junho de 2006 a julho de 2007.

	Ninfas						Larvas
	<i>Amblyomma cajennense</i>	<i>Dermacentor (Anocentor) nitens</i>	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	<i>Amblyomma</i> sp.	<i>Dermacentor (Anocentor) nitens</i>	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	
Ocorrência de equinos parasitados	113	14	15	32	1	7	9
Intensidade de carrapatos por eqüino*	6,5±4,5(1-18)	3,9±2,8(1-10)	3,9±5,8(1-24)	2,7±2,1(1-10)	5	2,1±1,8(1-6)	1,8±1,2(1-4)
N ^o de propriedades com infestação (n/N)	10/12	5/12	6/12	9/12	1/12	4/12	5/12

*média± desvio padrão e amplitude

n= Número de propriedades com caninos parasitados

N= Total de propriedades visitadas

Tabela 25: Carrapatos coletados de equinos ao longo dos meses de visitas às 15 propriedades do Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro. Período de coleta de junho de 2006 a julho de 2007.

Meses de coleta	Nº de equinos infestados por carrapatos (n/N)(%)	<i>Amblyomma cajennense</i>	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	<i>Dermacentor (Anocentor) nitens</i>	Ninfa de <i>Amblyomma</i> sp.	Ninfa de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Ninfa de <i>Dermacentor (Anocentor) nitens</i>	Larvas	TOTAL
Junho/2006	2/2(100%)	2	--	--	1	--	--	--	3
Julho/2006	3/17(17,65%)	1	--	--	8	--	--	1	10
Agosto/2006	20/31(64,52%)	5	12	9	40	1	--	2	69
Setembro/2006	3/ 4(75%)	--	--	10	10	--	--	--	20
Outubro/2006	12/23(52,17%)	46	4	4	4	6	--	--	64
Novembro/2006	47/55(85,45%)	393	--	2	6	--	5	--	406
Dezembro/2006	8/8(100%)	54	2	3	--	1	--	--	60
Janeiro/2007	3/5(60%)	22	--	15	--	--	--	--	37
Fevereiro/2007	6/7(85,71%)	39	--	--	--	--	--	--	39
Março/2007	4/4(100%)	21	--	11	--	--	--	--	32
Abril/2007	5/7(71,42%)	22	1	--	--	--	--	--	23
Mai/2007	6/10(60%)	10	12	--	--	7	--	4	33
Junho/2007	20/20(100%)	125	25	--	9	--	--	9	168
Julho/2007	3/7(42,86%)	--	2	2	7	--	--	--	11
Total	142/200	740	58	56	85	15	5	16	975

n= equinos parasitados
N= equinos observados

4.3 Análise molecular pela reação em cadeia da polimerase

Considerando a disponibilidade de insumos, a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em amostras de carrapatos dos caninos que apresentaram sorologia reativa. Desta forma, foram submetidos à técnica de PCR 82 carrapatos (Tabela 26).

Tabela 26: Carrapatos submetidos à técnica de reação em cadeia da polimerase provenientes de caninos reativos na imunofluorescência indireta para *Rickettsia rickettsii*. Período de coleta ocorrido em junho de 2006 a julho de 2007, no Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro.

ESPÉCIES	SEXO		TOTAL
	Adultos		
	Macho	Fêmea	
<i>Amblyomma cajennense</i>	2	3	5/8(62,5%)
<i>Amblyomma aureolatum</i>	--	6	6/27(22,22%)
<i>Amblyomma ovale</i>	1	1	2/5(40%)
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	12	11	23/197(11,68%)
<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	2	1	3/12(%)
Total			39
Ninfas			
<i>Amblyomma</i> sp.	-	-	42
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	-	-	1
Total			43

Foi observado que apenas um *pool* contendo DNA de seis carrapatos foi positivo, tendo amplificado para os quatro marcadores. Deste *pool* o DNA de cada amostra de carrapato foi separado para ser analisado isoladamente.

Das amostras analisadas individualmente, apenas um carrapato da espécie *R. sanguineus* apresentou-se positivo na PCR, tendo amplificado para os quatro marcadores estudados (Figura 8). Este carrapato era uma fêmea adulta, ingurgitada. Desta forma, a taxa de infecção nos carrapatos foi de 1,22%.

O carrapato infectado foi coletado do canino de número “16” na visita ocorrida no mês de junho de 2006 à propriedade “1”, onde ocorreram os casos de febre maculosa. Este canino era um macho, mestiço da raça poodle e vivia livremente pela propriedade. O animal apresentava condição de saúde razoável, sem sintomatologia de qualquer doença, porém apresentava baixo peso e com características típicas de desnutrição. Durante o período do trabalho de campo este animal veio a óbito, tendo as coletas de sangue e carrapatos ocorridas

até o mês de novembro. Os proprietários não souberam relatar o motivo da morte do animal (Figura 9).

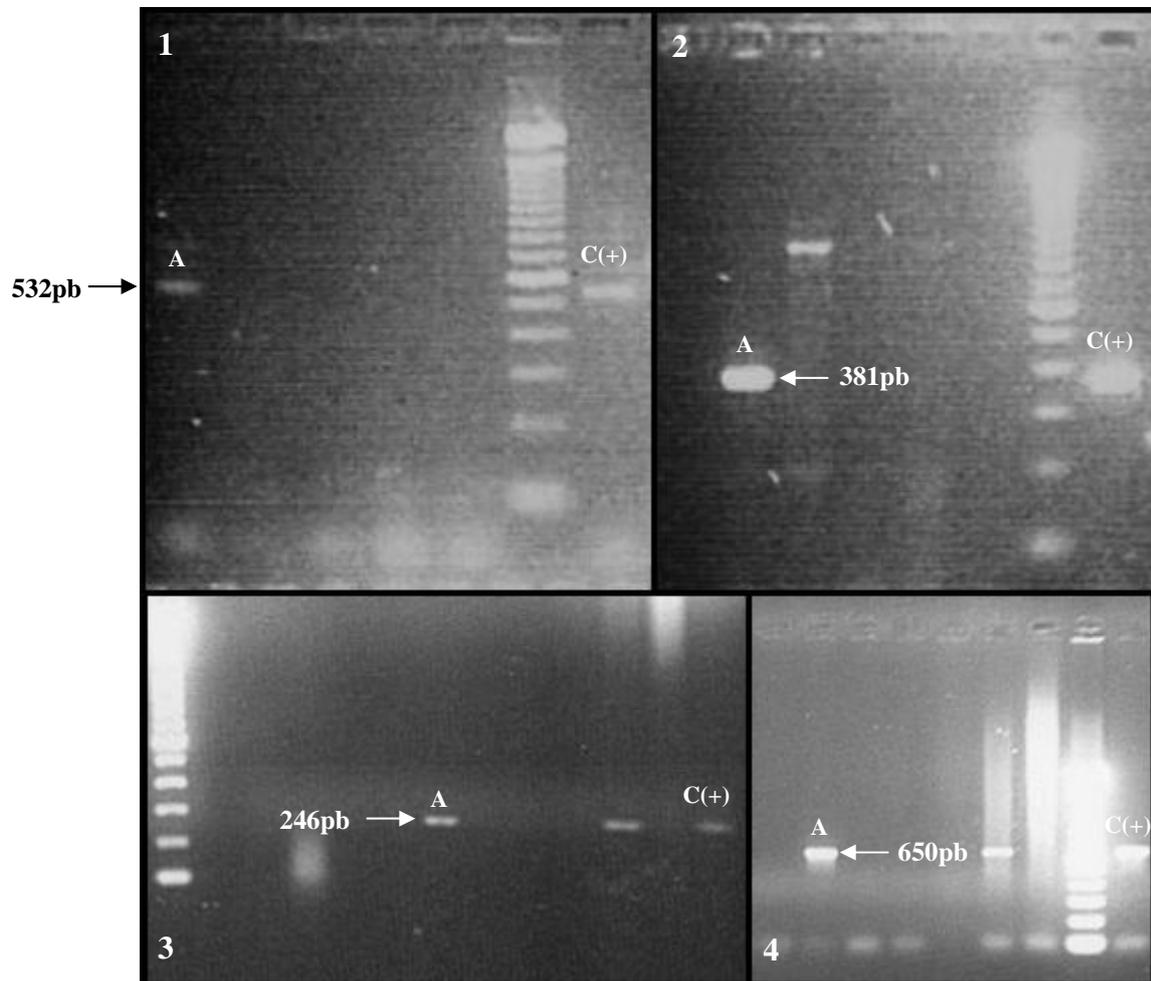


Figura 8: Análise do produto da PCR. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. C(+)= controle positivo; A= amostra positiva. DNA de *Rickettsia rickettsii* em carrapato *Rhipicephalus sanguineus* infectado. 1- Gene *ompA*; 2- Gene citrato sintase (*gltA*); 3- Gene que codifica a proteína de 17kDa (*htrA*); 4- Gene *ompB*.



Figura 9: Canino número “16” da propriedade “1”, localizada no Distrito de Engenheiro Passos, Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, o qual estava parasitado pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* positivo para *Rickettsia rickettsii*. A coleta ocorreu em junho de 2006.

4.4 Sequenciamento da amostra positiva e alinhamento

O sequenciamento da amostra positiva pela técnica de PCR foi realizado apenas com o marcador *ompA* devido à pouca quantidade de DNA da amostra. De acordo com o programa BLAST GenBank, a sequência (número de acesso FJ356230) teve similaridade de 99,3% com depósitos de sequências de *R. rickettsii*.

As sequências depositadas no GenBank que tiveram 99,3% de similaridade, cobertura de 100%, com a do presente estudo foram EU109179, CP000766, CP000848, DQ452933, DQ002504, DQ164838, DQ150693, DQ150687, DQ150684, DQ150681, AF045220, AY319293, U55822, U43804, M31227 (Anexo 7).

Ao analisar as sequências protéicas deduzidas dos genes mencionados, verificou-se que na sequência obtida no presente estudo ocorreu uma diferença no aminoácido de posição 8. Assim, a sequência do estudo apresenta um aminoácido prolina enquanto nas demais sequências está presente o aminoácido alanina (Anexo 8).

5 DISCUSSÃO

5.1 Análise soro epidemiológica em caninos e equinos

No presente estudo observou-se que 27,62% dos animais foram reativos à RIFI na pesquisas de anticorpos anti-*R. rickettsii*. Estes resultados foram próximos aos encontrados em outros estudos em áreas endêmicas quando as frequências foram de 36,4%, 31,25% e 31,3% (LEMOS et al., 1996a; SANGIONI et al., 2005; HORTA et al., 2004) em áreas onde o principal vetor incriminado foi o carrapato *A. cajennense*. Em estudos em que o principal vetor de FM incriminado foi o carrapato *A. aureolatum*, as frequências de caninos reativos encontradas foram de 64% e 69,6%, observando um maior percentual de animais soro reativos em relação ao encontrado no presente estudo (PINTER et al., 2008; MORAES-FILHO et al., 2008).

Foi observado no estudo que caninos com hábitos de frequentarem pastos e matas tiveram 12 vezes mais chance de serem reativos a RGFM. Caninos com tais hábitos têm uma maior chance de ter contato com carrapatos como *A. cajennense* e *A. aureolatum*, pois são carrapatos comuns neste tipo de ambiente devido a presença de seus hospedeiros, como equinos para *A. cajennense* e animais silvestres para *A. aureolatum*. Além disso, a substituição de pastos por florestas de *Eucalyptus* e *Pinus* no local de estudo pode ter influenciado de forma considerável para a vinda de animais silvestres e seus parasitas para ambientes peri-domiciliares. Saito et al. (2008) observaram, através de análise multivariada, que o contato com pastos ou matas foi estatisticamente associado com cães soro reativos contra RGFM.

Verificou-se a ocorrência de caninos reativos para RGFM a seis quilômetros de distância da área onde houveram os casos de FM em humano. Porém, as maiores titulações ocorreram nas proximidades do foco, sugerindo que o risco para a infecção em humanos é maior em uma área mais restrita. Em estudo onde o carrapato foi o vetor responsável pelos casos de FM nos EUA foi *R. sanguineus*, 70% dos caninos foram reativos ao antígeno *R. rickettsii* e 57% foram reativos em comunidade a uma distância de aproximadamente 97 quilômetros (DEMMA et al., 2006).

No presente estudo foi observada evidência sorológica de infecção por RGFM um ano após a ocorrência dos casos da doença em humanos. Keenan et al., 1977 detectaram anticorpos anti-*R. rickettsii* 12 meses após a infecção experimental por este bioagente. Em estudo retrospectivo, foi visto que a infecção pode se manter durante anos (NICHOLSON et al., 2006).

Estudos no Brasil confirmaram a evidência sorológica de outras RGFM em áreas endêmicas (HORTA et al., 2004; SANGIONI et al., 2005; HORTA et al., 2007; LABRUNA et al., 2007b; PINTER et al., 2008). Assim, a maioria dos resultados com titulação a 1:64 podem ser devido à reação cruzada com outras espécies de rickettsia que possivelmente ocorrerem na região.

Observou-se que, com exceção do canino “16”, não houve aumento de titulação nos meses subsequentes, indicando que não houve re-infecção. Pinter et al. (2008) observaram uma diferente dinâmica de anticorpos, tendo verificado titulações maiores ao longo do tempo.

Foi verificado que apesar de não ter ocorrido diferença significativa entre as faixas de idades, verificou-se uma maior tendência em animais mais velhos apresentarem uma maior proporção de positivos, podendo ser explicado pela chance maior de animais mais velhos

serem parasitados por carrapatos infectados por *R. rickettsii* (PINTER et al., 2008) ou devido à tendência em ter queda de imunidade devido à idade, e assim serem mais parasitados.

Caninos de áreas rurais geralmente se movimentam livremente pelos pastos e matas e são também animais de companhia, principalmente de crianças. Então, a presença desses animais em casas é um fator de risco para a ocorrência de FM em humanos, devido o carregamento de carrapatos do ambiente natural para dentro das residências e/ou áreas próximas.

A frequência de anticorpos anti-*R. rickettsii* em equinos foi de 9,4%, tendo sido diferente ao encontrado em outros estudos em áreas endêmicas para FM no Brasil, nos quais foram encontradas as frequências de 77,8%, 77,3% e 72,9% (LEMOS et al., 1996a; HORTA et al., 2004; HORTA et al., 2007). Nestes estudos referenciados, os autores indicaram uma forte evidência de que o principal vetor da FM tenha sido o carrapato *A. cajennense*. Porém, no presente estudo demonstrou-se um novo perfil para a caracterização epidemiológica da FM, quando a evidência sorológica para RGFm em equinos foi bem menor do que o esperado, o que reforça a possível função dos carrapatos *R. sanguineus* e *A. aureolatum* no ciclo enzoótico dos casos de FM ocorridos na região estudada.

Na maioria dos haras e fazenda havia a presença de *A. cajennense*, contribuindo para justificar ausência de associação estatística entre animais reativos procedentes de diferentes habitats. Mesmo os animais mais velhos que tiveram mais chance de serem parasitados por carrapatos não apresentaram maior positividade, sugerindo que bactérias do gênero *Rickettsia* tiveram circulação restrita dentro da população de equinos.

Relatos da literatura (LEMOS et al., 1996a; HORTA et al., 2004; SANGIONI et al., 2005; PINTER et al., 2008) mostram a eficiência tanto de equinos como de caninos como sentinelas para o agente da FM, porém no presente estudo foi mostrado que os equinos não foram bons indicadores da circulação do agente na região, devendo-se em pesquisas futuras, quando não se conhece os vetores responsáveis por casos de FM na região, utilizar as duas espécies de animais como potenciais sentinelas.

5.2 Estudo da fauna de ixodídeos

Ao total, foram coletados no presente estudo 1.445 carrapatos em caninos e equinos, nos estágios de larvas, ninfas e adultos. Dentre as espécies encontradas, verificou-se que foram similares às espécies de carrapatos apresentadas em outros estudos em áreas endêmicas para FM no Brasil (LEMOS et al., 1997a; LEMOS et al., 1997b; ROZENTAL et al., 2002; HORTA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008; MORAES-FILHO et al., 2008; SANGIONI et al., 2005).

Os principais vetores de FM no Brasil pertencem ao gênero *Amblyomma*, destacando-se *A. cajennense* (MOREIRA; MAGALHÃES, 1935; DIAS et al., 1937; VALLEJO-FREIRE, 1946; GUEDES et al., 2005) e *A. aureolatum* (GOMES, 1933; PINTER; LABRUNA, 2006), sendo em ambos detectada *R. rickettsii*. Mais recentemente, foram relatados *R. sanguineus* infectados por este agente, sugerindo o envolvimento deste vetor na epidemiologia de FM no Brasil (MORAES-FILHO et al., 2008) e nos EUA (DEMMA et al., 2005; WIKSWO et al., 2007).

O carrapato *A. cajennense* completa uma geração em um ano, caracterizado por picos de atividades sazonais distintos para cada estágio parasitário, com os períodos de abril a julho, principalmente com larvas, de agosto a setembro, ninfas e de novembro a março, com maior predominância de adultos (LEMOS et al., 1997b; OLIVEIRA et al., 2000; LABRUNA et al., 2002). No presente estudo, foram coletados 740 espécimes de *A. cajennense*, observando-se a sua ocorrência ao longo de todo o período de trabalho a campo, com exceção do mês de setembro, provavelmente devido ao baixo número de animais observados. Seguindo o padrão

de atividade sazonal esperado para a espécie, houve uma maior ocorrência dos adultos nos meses mais quentes e úmidos. Destaca-se apenas o mês de junho de 2007, quando o esperado seria a presença mais abundante de larvas e ninfas. Deve-se levar em consideração, que não houve coletas na vegetação, tendo somente ocorrido na fase parasitária dos carrapatos.

Considerado atualmente o principal vetor da FM no Brasil, o carrapato *A. cajennense* possui baixa especificidade para hospedeiros, em que estágios imaturos comumente parasitam humanos em áreas rurais ou onde seus hospedeiros primários são encontrados (MOREIRA, MAGALHÃES, 1935; DIAS et al., 1937; MOREIRA, MAGALHÃES, 1937; DIAS, MARTINS, 1939; LEMOS et al., 1997a; LEMOS et al., 1997b; OLIVEIRA et al. 2000; HORTA et al., 2004).

As ninfas de *Amblyomma* dos equinos e caninos ocorreram nos meses de junho a novembro, conforme esperado para *A. cajennense*, mostrando a evidência de que pertenciam a esta espécie e sendo reforçada após as identificações das ninfas ingurgitadas como *A. cajennense* quando em estágio adulto.

O carrapato *R. sanguineus* esteve presente em todos os meses de coleta, com exceção do mês de fevereiro, sendo a espécie de carrapato mais prevalente entre os caninos. Observou-se que os cães parasitados por este ixodídeo eram procedentes de habitats rural e urbano. Em ambientes urbanos esta é a espécie de carrapato mais comumente encontrada em caninos (MASSARD et al., 1981; RIBEIRO et al., 1997) e, em ambientes rurais que mimetizam as criações urbanas de cães, *R. sanguineus* também foi o mais prevalente (LABRUNA et al., 2001)

Durante a fase de vida livre, *R. sanguineus* tem por hábito penetrar em pequenos buracos ou frestas em superfícies de cimento ou madeira (DIPEOLU et al., 1982), ambiente este facilmente encontrado em criações urbanas de cães em que, geralmente são presos em canis ou em espaços pequenos dentro de domicílios. Porém, em ambientes rurais este tipo de habitat pode ser encontrado quando os cães são presos em coleiras, próximos a pequenos abrigos ou em canis. Desta forma, justifica-se o grande número destes ectoparasitas no presente estudo em ambos habitats. No mês de agosto foi observado o maior número desta espécie de carrapato, atribuída à coleta em muitos cães de domicílios devido à campanha de vacinação anti-rábica anual nesta área de estudo.

O relato de alta susceptibilidade de ninfas de *R. sanguineus* à bactéria *R. rickettsii* infectadas em fase de larva (LABRUNA et al., 2008), o parasitismo deste vetor em humanos (DANTAS-TORRES et al. 2006, LOULY et al. 2006), a detecção de *R. rickettsii* neste ixodídeo, conforme visto no presente estudo e em outros relatos (DEMMA et al., 2005; WIKSWO et al. 2007; MORAES, FILHO et al., 2008) associados à sua alta ocorrência tanto em ambientes rurais como urbanos contribuem para que este carrapato esteja fortemente associado à epidemiologia de FM no Brasil.

Vinte e sete carrapatos da espécie *A. aureolatum* foram coletados em caninos ao longo de todo o trabalho de campo, tendo sido observado que nos meses mais quentes, de dezembro a março, estes ixodídeos não foram encontrados. Pinter et al. (2004) mostraram que os adultos de *A. aureolatum* parasitaram cães durante todos os 24 meses de estudo, sem qualquer tendência de maior ou menor atividade dos carrapatos em qualquer período do ano. As prováveis diferenças podem ser devido às condições ecológicas de cada local ou ao período de duração do trabalho de campo.

Estágios adultos de *A. aureolatum* são encontrados parasitando principalmente cães domésticos e caninos silvestres (EVANS et al., 2000; ARAGÃO; FONSECA, 1961b; GUGLIELMONE et al., 2003; PINTER et al., 2004). Os estágios imaturos parasitam principalmente aves passeriformes (FONSECA, 1935; GUGLIELMONE et al., 2003; ARZUA et al., 2003). Para realizarem com sucesso seu ciclo biológico requerem temperaturas amenas, umidade alta e elevada altitude (RODRIGUES et al., 2002; GUGLIELMONE et al.,

2003; PINTER et al., 2004). A área estudada apresenta todas as condições necessárias para a manutenção deste carrapato na natureza. Existe a forte presença de caninos domésticos, a área geográfica caracterizada pela presença de vegetação de eucaliptos e proximidade ao parque Nacional de Itatiaia propicia condições para o habitat de caninos silvestres e aves (GUELER-COSTA, 2002; WILLIS, 2003). Além de ter condições climáticas que favorecem o desenvolvimento do seu ciclo biológico.

Relatos de parasitismo por *A. aureolatum* em humanos (GOMES, 1933; ARAGÃO; FONSECA, 1961b; GUGLIELMONE et al., 2003; PINTER et al., 2004) e a confirmação desta espécie infectada por *R. rickettsii* (PINTER et al., 2006) sugerem que este carrapato possa ter envolvimento nos casos de FM ocorridos no Município de Resende, apesar de não ter sido detectada a bactéria nessa espécie de ixodídeo.

Carrapatos como *R.(B.) microplus*, *A. ovale* e *D.(A.) nitens* são frequentemente encontrados em meios rurais e áreas endêmicas para FM (LEMOS et al., 1997a; GUGLIELMONE et al., 2003; FORLANO et al., 2005; HORTA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008), corroborando com os achados do presente estudo. Mas, a importância destas espécies na epidemiologia desta enfermidade no Brasil ainda não foi esclarecida.

5.3 Análise molecular

No presente estudo verificou-se infecção no carrapato *R. sanguineus* pela bactéria *R. rickettsii*, com taxa de infecção em carrapatos de 1,22%. Observou-se que o canino que estava parasitado pelo carrapato infectado apresentou altas titulações à sorologia, indicando que houve infecção recente.

A baixa taxa de infecção em carrapatos encontrada pode ser justificada, entre outros fatores, pelo efeito letal que a bactéria *R. rickettsii* provoca em ixodídeos (BURGDORFER; BRINTON, 1975; NIEBYLSKI et al., 1999). E corrobora com os resultados encontrados em outros estudos no Brasil (LEMOS et al., 1997a; ROZENTAL et al., 2002; GUEDES et al., 2005; PINTER; LABRUNA, 2006; MORAES, FILHO et al., 2008) e nos EUA (BURGDORFER, 1988).

A importância de *R. sanguineus* no ciclo de transmissão de rickettsia do grupo da FM para humanos tem sido demonstrada desde a década de 40 no México (BUSTAMANTE et al., 1946; BUSTAMANTE et al., 1947). Burdorfer et al. (1975) registraram a possibilidade de *R. sanguineus* no envolvimento na epidemiologia de RMSF, reportando que carrapatos dessa espécie coletados de cães infectados com *Rickettsia* spp. foram capazes de transmitir a bactéria e causar a doença, experimentalmente.

Algumas pesquisas mostraram a evidência do envolvimento de *R. sanguineus* em regiões endêmicas dos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro. Amostras de hemolinfa de espécimes coletados de *R. sanguineus* foram analisadas pelo método de Giemsa e por imunofluorescência e microrganismos com morfologia similar a rickettsia do grupo da FM foram identificados (LEMOS et al., 1997a, ROZENTAL et al. 2002). Em região endêmica de São Paulo foi detectado *R. sanguineus* infectado por *R. rickettsii* (MORAES, FILHO et al., 2008)

A ocorrência de cinco casos de FM confirmados na região e a confirmação do carrapato *R. sanguineus* infectado por *R. rickettsii*, é compatível com os dados mostrados por Demma et al. (2005) em que esta bactéria também foi detectada em *R. sanguineus* no Arizona quando os principais vetores de RMSF nos EUA, *D. variabilis* e *D. andersoni*, não foram identificados.

Recentes publicações têm demonstrado que *R. sanguineus* é o vetor de RMSF em algumas regiões dos EUA, nas quais uma estreita interação entre humanos e cães fortemente parasitados por esses carrapatos foi identificada. Na Califórnia, onde a importância de *R.*

sanguineus como potencial vetor dessa doença não está bem esclarecida, *R. rickettsii* foi detectada neste ixodídeo, mas algumas diferenças genotípicas foram evidenciadas entre cepas isoladas do Arizona, demonstrando uma significativa diversidade genética nas espécies de rickettsias do grupo da FM (WIKSWO et al. 2007).

A sequência de DNA gene rickettsial *ompA* do presente estudo apresentou 99,3% de similaridade em relação à sequência de *R. rickettsii*, sendo validado pelo referencial para este gene em que a similaridade deve ser maior ou igual a 98,8% (FOURNIER et al., 2003). A sequência de nucleotídeos do estudo apresentou similaridade com a encontrada em *R. sanguineus* do estudo na Califórnia (WIKSWO et al. 2007) e dos isolados em *R. sanguineus*, *A. cajennense*, e *A. aureolatum* (GUEDES et al., 2005; PINTER; LABRUNA, 2006) de regiões endêmicas do Brasil, o que mostra que são altamente relacionadas. Ainda, a sequência do estudo em pauta foi 100% similar, com 86% de cobertura, à sequência de amostra tecidual de humano que veio a óbito em Barra do Pirai (ROZENTAL et al., 2006), Município também localizado no Vale do Médio Paraíba Sul Fluminense.

Observou-se diferença entre o presente estudo e as demais submissões após a tradução da sequência de nucleotídeos em sequência protéica, no primeiro sendo encontrado o aminoácido prolina, e no segundo o aminoácido alanina. Esta modificação de um aminoácido hidrofóbico por um hidrofílico poderia interferir na distribuição de cargas da molécula, alterando sua conformação tridimensional. Análises mais detalhadas da estrutura desta molécula trariam um melhor entendimento dos possíveis efeitos biológicos causados por esta modificação.

A presença de *R. sanguineus* infectado por *R. rickettsii* em área endêmica para FM confirma que esta espécie de carrapato pode ter papel importante na transmissão de RGFM para humanos no Município de Resende, uma área onde cães, equinos, bovinos e gatos domésticos e seus carrapatos tem contínuo contato com animais silvestres, como capivaras, marsupiais e pequenos roedores.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados observados para a região estudada, pode-se concluir que:

- Caninos foram importantes sentinelas para o agente da febre maculosa (FM);
- O hábito de caninos frequentarem matas e pastos influenciou positivamente na presença de anticorpos séricos anti-rickettsia do grupo da febre maculosa (RGFM);
- Caninos provenientes de propriedades a pelo menos seis quilômetros de distância a partir do local de ocorrência dos casos foram reativos a RGFM, confirmando o conceito de área endêmica;
- Caninos permaneceram reativos para rickettsia do grupo da febre maculosa por pelo menos um ano após a ocorrência dos cinco casos de FM brasileira diagnosticados em 2006;
- A fauna de ixodídeos encontrada corrobora com dados de outros estudos em regiões endêmicas para FM;
- A presença, em condições naturais, de *Rickettsia rickettsii* em *Rhipicephalus sanguineus* indica uma possível participação deste carrapato na transmissão de *R. rickettsii* para humanos na área estudada.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGERAMI, R. N.; RESENDE, M. R.; FELTRIN, A. F. C.; KATZ, G.; NASCIMENTO, E. M.; STUCCHI, R. S. B.; SILVA, L. J. Brazilian Spotted Fever: A Case Series from an Endemic Area in Southeastern Brazil Clinical Aspects. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 252-254, 2006.

ALMEIDA, A. F. Interdependência das florestas plantadas com a fauna silvestre. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**, Piracicaba, SP. v.10, n.29, p.36-44, 1996.

ARAGÃO, H.; FONSECA, F. Notas de ixodologia. VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. v. 59, p. 115-129, 1961a.

ARAGÃO, H.; FONSECA, F. Notas de ixodologia. IX. O complexo *Ovale* do gênero *Amblyomma*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. v. 59, p. 131-148, 1961b.

AZAD, A. F.; BEARD, C. B. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 2, p. 179-186, 1998.

ARZUA, M.; NAVARRO DA SILVA, M. A.; FAMDAS, K. M.; BEATI, L.; BARROS-BATTESTI, D. M. *Amblyomma aureolatum* and *Ixodes auritulus* (Acari:Ixodidae) on birds in southern Brazil, with notes on their ecology. **Experimental and Applied Acarology**, v. 31, n. 3-4, p. 283-296, 2003.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M., BECHARA, G. H. **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical**: um guia ilustrado para identificação de espécies. 1.ed. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006, 223p.

BOZEMAN, F. M.; SHIRAI, A. HUMPHRIES, W.; FULLER, H. S. Ecology of Rocky Mountain Spotted Fever. II Natural infection of wild mammals and birds in Virginia and Maryland. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 16, n. 1, p. 48-59, 1967.

BRASIL. Ministério da saúde. Disponível em:< <http://www.saude.gov.br>> . Acesso em: 02 dez. 2008.

BURGDORFER, W. A review of Rocky Mountain Spotted Fever (tick-borne typhus), its agent, and its ticks vectors in the United States. **Journal of Medical Entomology**, v. 12, n. 3, p. 269-278, 1975.

BURGDORFER, W.; BRINTON, L. P. Mechanisms of transovarial infection of spotted fever rickettsiae in ticks. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 266, p. 61-72, 1975.

BURGDORFER, W.; SEXTON, D. J.; GERLOFF, R. K.; ANACKER, R. L.; PHILIP, R. N.; THOMAS, L. A. *Rhipicephalus sanguineus*: Vector of a new Spotted Fever Group Rickettsia in United States. **Infection and Immunity**, v. 12, n. 1, p. 205-210, 1975.

BURGDORFER, W. Ecological and epidemiological considerations of Rocky Mountain Spotted Fever and Scrub Typhus. In: Walker, D.H. **Biology of rickettsial diseases**, v.1 CRC Inc, Boca Raton, p.33-50, 1988.

BUSTAMANTE, M. E.; VARELA, G.; MARIOTTE, C. O. Estudos de febre manchada em México: febre manchada en la Laguna. **Revista del Instituto de Salubridade y Enfermedades Tropicales**, v. 7, p. 39-49, 1946.

BUSTAMANTE, M. E.; VARELA, G. Distribucion de las rickettsiasis en Mexico. **Revista del Instituto de Salubridade y Enfermedades Tropicales**, v.8, p.3-14, 1947.

CENIBRA – Celulose Nipo-Brasileira S/A Disponível em: <<http://www.showsite.com.br/silviminas/html/AnexoCampo/cartilha.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2008

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A.; BRANDÃO-FILHO, S. P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari:Ixodidae), the brown dog tick, parasiting humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 64-67, 2006.

DASH, G. A.; EREMEEVA, M. E. Laboratory diagnosis of rocky mountain spotted fever and other rickettsioses in the Americas: contemporary approaches and prospects for future improvements. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA E II SIMPÓSIO LATINOAMERICANO DE RICKETTSIOSE, 14., 2006, Ribeirão Preto-SP. **Anais...** Ribeirão Preto: 2006.

DEMMA, L. J.; TRAEGER, M. D.; NICHOLSON, W. L.; PADDOCK, C. D.; BLAU, D. M.; EREMEEVA, M. E.; DASCH, G. A.; LEVIN, M. L.; SINGLETON, J.; ZAKI, S. R.; CHEEK, J. E.; SWERDLOW, D. L.; MCQUISTON, J. H. Rocky Mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 6, p. 587-594, 2005.

DEMMA, L. J.; TRAEGER, M.; BLAU, D.; GORDON, R.; JOHNSON, B.; DICKSON, J.; ETHELBAH, R.; PIONTKOWSKI, S.; LEVY, C.; NICHOLSON, W. L.; DUNCAN, C.; HEATH, K.; CHEEK, J.; SWERDLOW, D.; McQUISTON, J. H. Serologic evidence for exposure to *Rickettsia rickettsii* in Eastern Arizona and recent emergence of Rocky Mountain spotted fever in this region. **Vector-borne and zoonotic diseases**, v. 6, n. 4, p. 423-429, 2006.

DIAS, E.; MARTINS, A.; RIBEIRO, D. J. Thypho exanthematico no oeste de Minas Gerais. **Brasil-Médico**, v. 51, n. 24, p. 651-655, 1937.

DIAS, E.; MARTINS, A. V. Spotted fever in Brazil. A summary. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 19, p. 103-108, 1939.

DIPEOLU, O. O.; AKINBOADE, O. A.; OGUNJI, F. O. Observations on the epidemiology of house infesting *Rhipicephalus sanguineus* in a household in Lagos, Nigeria. **The Bulletin of Animal Health and Production in África**, v. 30, p. 29-30, 1982.

DOTTA, G. **Diversidade de mamíferos de médio e grande porte em relação à paisagem da bacia do Rio Passa-cinco**. 2005, 116f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de

ecossistemas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, São Paulo.

EREMEEVA, M.; YU, X.; RAOULT, D. Differentiation among Spotted Fever Group Rickettsiae Species by Analysis of Restriction Fragment Length Polymorphism of PCR-Amplified DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 3.p. 803-810, 1994.

ESTRADA, D. A.; SHUMACKER, T. T. S.; SOUZA, C. E.; NETO, E. J. R.; LINHARES, A. X. Detecção de riquésias em carrapatos do gênero *Amblyomma* (Acari:Ixodidae) coletados em parque urbano do Município de Campinas, SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 68-71, 2006.

EVANS, D. E.; MARTINS, J. R.; GUGLIELMONE, A. A. A review of the ticks (Acari:Ixodida) of Brazil, their hosts and geographical distribution.1. The State of Rio Grande do sul, southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. v. 95, n. 4, p. 453-470, 2000.

FONSECA, F. Notas de acareologia. XI. Validade da especie e cyclo evolutivo de *Amblyomma striatum* Koch, 1844 (Acarina: Ixodidae). **Memórias do Instituto. Butantan**, v. 9, p. 43-51, 1935.

FONSECA, M. T. **A estrutura da comunidade de pequenos mamíferos em um fragmento de Mata Atlântica e monocultura de eucalipto: a importância da matriz de habitat**, Belo Horizonte, 1997. 52p. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

FORLANO, M.; SCOFIELD, A.; ELISEI, C.; FERNANDES, K. R.; EWING, S.A.; MASSARD, C.L. Diagnosis of *Hepatozoon* spp. in *Amblyomma ovale* and its experimental transmission in domestic dogs in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 134, p. 1-7, 2005.

FOURNIER, P. E.; DUMLER, J. S.; GREUB, G.; ZANG, J.; WU, Y.; RAOULT, D. Gene sequence-based criteria for identification of new *Rickettsia* isolates and description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp. nov. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5456-5465, 2003.

FREITAS, L. H. T.; FACCINI, J. L.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of the rabbit tick, *Haemaphysalis leporispalustris*, with the bacterium *Rickettsia rickettsii*, and comparative biology of the infected and uninfected ticks lineages. **Experimental and Applied Acarology** (no prelo), 2008.

FUENTES, L.; CALDERÓN, A.; HUN, L.; Isolation and identification of *Rickettsia rickettsii* from rabbit tick (*Haemaphysalis leporispalustris*) in the Atlantic Zone of Costa Rica. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 34, p. 464-567, 1985.

GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C. L.; MORON, C.; ANAYA, A.; WALKER, D. H. Rickettsiosis of the Genus *Rickettsia* in south America. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 990, p. 57-61, 2003.

GALVÃO, M. A. M. Diagnósticos e inquéritos sorológicos para riquetsioses do gênero *rickettsia* no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13; suplemento 1, p. 188-189, 2004.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. **Taxonomic outline of the prokaryotes**. Berg's Manual of systematic bacteriology. 2. ed., 2004. 401p.

GIMÉNEZ, D. F. Staining rickettsiae in yolk-sac cultures. **Stain Technology**, v. 39, p. 135-140, 1964.

GOMES, L. S. Typho exantemático de São Paulo. **Brasil-médico**, v. 17, n. 52, p. 919-922, 1933.

GUELER-COSTA, C. **Mamíferos não-voadores do campus "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, Piracicaba, Estado de São Paulo**. 2002. 72f. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, São Paulo.

GUEDES, E.; LEITE, R. C.; PRATA, M. C. A.; PACHECO, R. C.; WALKER, D. H.; LABRUNA, M. B. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian Spotted Fever-endemic area in the state of Minas Gerais. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 8, p. 841-845, 2005.

GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PEÑA, A.; MANGOLD, A. J.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; MARTINS, J. R.; VENZAL, J. M.; ARZUA, M.; KEIRANS, J. E. *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) and *Amblyomma ovale* Koch, 1844 (Acari:Ixodidae): hosts, distribution and 16S rDNA sequences. **Veterinary Parasitology**, v. 113, p. 273-288, 2003.

HORTA, M. C.; LABRUNA, M. B.; SANGIONI, L. A.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C. L.; VIDOTTO, O.; SCHUMAKER, T. T. S.; WALKER, D. H. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian Spotted Fever-endemic area in the state of São Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group rickettsia. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 1, p. 93-97, 2004.

HORTA, M. C.; PINTER, A.; SCHUMAKER, T. T. S.; LABRUNA, M. B. Natural infection, transovarial transmission and transstadial survival of *Rickettsia bellii* in the tick *Ixodes loricatus* (Acari:Ixodidae) from Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 285-290, 2006.

HORTA, M. C.; LABRUNA, M. B.; PINTER, A.; LINARDI, P. M.; SCHUMAKER, T. T. S. *Rickettsia* infection in five areas of the state of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 7, p. 793-801, 2007.

HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; CASAGRANDE, R. A.; SAITO, T. B.; ROSA, S. C.; OGRZEWALSKA, M.; MATUSHIMA, E. R., LABRUNA, M. B. Experimental Infection of Opossums *Didelphis aurita* by *Rickettsia rickettsii* and Evaluation of the Transmission of the

Infection to Ticks *Amblyomma cajennense*. **Vector-borne and zoonotic diseases**, (no prelo), 2008.

INSTITUTO DE METEOROLOGIA, 6^o Distrito Rio de Janeiro. Disponível em:< <http://www.inmet.gov.br> > Acesso em 10 jan 2007.

ISAAC, R.; VARGHESE, E.; MATHAI, J.; MANJULA, J.; JOSEPH, I. ISAAC, R. G. M. Scrub typhus: prevalence and diagnostic issues in rural Southern India. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, p. 1395–1396, 2004.

KEENAN, K. P.; BUHLES, W. C. Jr.; HUXSOLL, D. L. Pathogenesis of infection with *Rickettsia rickettsii* in the dog: a disease model for Rocky Mountain spotted fever. **Journal Infectious Diseases**, v. 135, p. 911-917, 1977.

KELLY, J. P.; RAOULT, D.; MASON, P. R. Isolation of spotted fever group rickettsial from triturated ticks using a modification of the centrifugation vial technique. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, p. 397-398, 1991.

KIDD, L.; HEGARTY, B.; SEXTON, D.; BREITSCHWERDT, E. Molecular characterization of *Rickettsia rickettsii* infecting dogs and people in North Carolina. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 400-409, 2006.

LABRUNA, M. B.; SOUZA, S. L. P.; GUIMARÃES JR., J. S.; PACHECO, R. C.; PINTER, A.; GENNARI, S. M. Prevalência de carrapatos em cães de áreas rurais da região norte do Estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**, v. 53, n. 5, comunicação, 2001.

LABRUNA, M. B.; KASAI, N.; FERREIRA, F.; FACCINI, J. L.; GENNARI, S. M. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brasil. **Veterinary Parasitology**, v. 105, n. 1, p. 65-77, 2002.

LABRUNA, M. B.; WHIWORTH, T.; HORTA, M. C.; BOUYER, D. H.; McBRIDE, J. W.; PINTER, A.; POPOV, V.; GENNARI, S. M.; WALKER, D. H. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of São Paulo, Brazil, where Brazilian Spotted Fever is endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 90-98, 2004a.

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; BOUYER, D. H.; McBRIDE, J.; CAMARGO, L. M. A.; CAMARGO, E. P.; POPOV, V.; WALKER, D. H. *Rickettsia belli* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the state of Rondônia, Western Amazon, Brazil. **Journal Medical Entomology**, v. 41, n. 6, p. 1073-1081, 2004b.

LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; CAMARGO, E. P.; WALKER, D. H. Detection of a spotted fever group *Rickettsia* in the tick *Haemaphysalis juxtakochi* in Rondônia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 127, n. 2, p. 169-174, 2005a.

LABRUNA, M. B. Epidemiologia da Febre Maculosa no Brasil e nas Américas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ACAROLOGIA, 1., 2006a, Viçosa-MG. **Anais...** Viçosa: 2006a.

LABRUNA, M. B. Cultivo celular de Riquetsias no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA E II SIMPÓSIO LATINOAMERICANO DE RICKETTSIOSE, 14., 2006b, Ribeirão Preto-SP. **Anais...** Ribeirão Preto: 2006b.

LABRUNA, M. B.; PACHECO, R. C.; NAVA, S.; BRANDÃO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J.; GUGLIELMONE, A. A. Infection by *Rickettsia bellii* and "*Rickettsia amblyommii*" in *Amblyomma neumanni* ticks from Argentina. **Microbial Ecology**, v.54, n.1, p.126-133, 2007a.

LABRUNA, M. B.; HORTA, M. C.; AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; PINTER, A.; GENNARI, S. M.; CAMARGO, L. M. A. Prevalence of *Rickettsia* infection in dogs from the urban and rural areas of Monte Negro municipality, western Amazon, Brazil. **Vector-borne and zoonotic diseases**, v. 7, n. 2, p. 249-255, 2007b.

LABRUNA, M. B.; PACHECO, R. C.; RICHTZENHAIN, L. J.; SZABÓ, M. P. J. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* from *Haemaphysalis juxtakochi* ticks in the state of São Paulo, Brazil. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 3, p. 869-873, 2007c.

LABRUNA, M. B.; OGRZEWALSKA, M.; MARTINS, T. F.; PINTER, A.; HORTA, M. C. Comparative susceptibility of larval stages of *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma cajennense*, and *Rhipicephalus sanguineus* to infection by *Rickettsia rickettsii*. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 6, p. 1156-1159, 2008.

LAMAS, C.; FAVACHO, A.; ROZENTAL, T.; KIRSTEN, A. H.; GUTERRES, A.; BARREIRA, J. LEMOS, E. R. Characterization of *Rickettsia rickettsii* in a case of fatal Brazilian spotted fever in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal Infection Disease**, v. 12, n. 2, p. 149-151, 2008.

LA SCOLA, B.; RAOULT, D. L. Laboratory diagnosis of Rickettsioses: Current approaches diagnosis of old and new Rickettsial Diseases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35; n. 11; p. 2715-2727, 1997.

LEMOS E. R. S.; MACHADO, R. D.; COURA, J. R.; GUIMARÃES, M. A. A. M; CHAGASI, N. Epidemiological aspects of the Brazilian Spotted Fever: Serological survey of dogs and horses in an endemic área in the state of São Paulo, Brazil. **Revista Instituto de Medicina Tropical**, v. 38, n. 6, p. 427-430, 1996a.

LEMOS, E. R. S.; MELLES, H. H. B.; COLOMBO, S.; MACHADO, R. D.; COURA, J. R.; GUIMARÃES, A. A.; SANSEVERINO, S. R.; MOURA, A. Primary isolation os spotted fever group from *Amblyomma cooperi* colleted from *Hydrochaeris hydrochaeris* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. v. 91, n. 3, p. 273-275, 1996b.

LEMOS, E. R. S.; MACHADO, R. D.; COURA, J. R.; GUIMARÃES, A. A.; SERRA-FREIRE, N. M.; AMORIN, M.; GAZETA, G. S. Epidemiological aspects of the Brazilian spotted fever: seasonal activity of ticks collected in an endemic area in São Paulo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 3, p. 181-185, 1997a.

LEMOS, E. R. S.; MACHADO, R. D.; PIRES, F. D. A.; MACHADO, S. L.; COSTA, L. M. C.; COURA, J. R. Rickettsiae-infected ticks in na endemic área of Spotted Fever in the state

of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 4, p. 477-481, 1997b.

LEMOS, E. R. S.; ALVARENGA, F. B. F.; CINTRA, M. L.; RAMOS, M. C.; PADDOCK, C. D.; FEREBEE, T. L.; ZAKI, S. R.; FERREIRA, F. C. C.; RAVAGNANI, R. C.; MACHADO, R.D.; GUIMARÃES, M.A.A.M.; COURA, J.R. Spotted fever in Brazil: a seroepidemiological study and description of clinical cases in an endemic área in the state of São Paulo. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65,n. 4, p. 329-334, 2001.

LEMOS, E. R. S. Rickettsial diseases in Brazil. **Virus Reviews and Research**, v. 7, p. 7-16, 2002a.

LEMOS, E. R.; ROZENTAL, T.; VILLELA, C. L. Brazilian spotted fever: description of a fatal clinical in the state of Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 5, p. 523-525, 2002b.

LIMA, W. P. **Impacto ambiental do eucalipto**. São Paulo. EDUSP, 1996, 301p.

LOULY, C. C. B.; FONSECA, I. N.; OLIVEIRA, V. F.; BORGES, L. M. F. Ocorrência de *Rhipicephalus sanguineus* em trabalhadores de clínicas veterinárias e canis, no Município de Goiânia, GO. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 1, p. 103-106, 2006.

MACALUSO, K. R.; SONENSHINE, D. E.; CERAUL, S. M.; AZAD, A. F. Rickettsial infection in *Dermacentor variabilis* (Acari:Ixodidae) inhibits transovarial transmission of a second *Rickettsia*. **Journal of Medical Entomology**, v. 39, n. 6, p. 809-813, 2002.

MAGALHÃES, O. Contribuição para o conhecimento das doenças do grupo “tifo exantemático” no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. Fascículo 2, Tomo 55, p. 191-208 dezembro, 1957.

MARRERO, M.; RAOUL, D. Centrifugation-Shell Vial Technique for Rapid Detection of Mediterranean Spotted Fever Rickettsia in Blood Culture. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 40, p. 197-199, 1989.

MASSARD, C. A.; MASSARD, C. L.; REZENDE, H. E. B.; BIANCHINI, I.; FONSECA, A. H. Carrapatos de cães em áreas urbanas e rurais de alguns estados brasileiros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 6., 1981, Belo Horizonte. **Anais...Belo Horizonte: SBP**, 1981.

MELLES, H. H. B.; COLOMBO, S.; LEMOS, E. R. S. Isolamento de Rickettsia em cultura de células vero. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 5, p. 469-473, 1999.

MORAES-FILHO, J.; PINTER, A.; PACHECO, R. C.; GUTMANN, T. B.; BARBOSA, S. O.; GONZÁLES, M. A. R. M.; MURARO, M. A.; CECÍLIO, S. R. M.; LABRUNA, M. B. New epidemiological data on Brazilian Spotted Fever in an endemic area of the state of São Paulo, Brazil. **Vector-borne and zoonotic diseases**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2008.

MOREIRA, M. F.; BERNDT, R. A. Sub-bosque em eucalipto: existe? **Silvicultura**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 53, p. 24-26, 1994.

MOREIRA, J. A.; MAGALHÃES, O. Typho exanthemático em Minas Gerais (8ª comunicação). **Brasil-médico**, v. 44, n. 21, p. 465-470, 1935.

MOREIRA, J. A.; MAGALHÃES, O. *Tiphus exanthematico* em Minas Gerais. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. Fascículo 2, TOMO XXVIII, p. 225-234, 1934.

MOREIRA, J. A.; MAGALHÃES, O. Typho exanthemático em Minas Gerais (4ª comunicação). **Brasil-médico**, v. 51, n. 21, p. 583-584, 1937.

NAVA, S.; ELSHENAWY, Y.; EREMEEVA, M. E.; SUMMER, J. W.; MASTROPAOLO, M.; PADDOCK, C. D. *Rickettsia parkeri* in Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 12, p. 1894-1897, 2008.

NICHOLSON, W. L.; GORDON, R.; DEMMA, L. J. Spotted Fever Group Rickettsial infection in dogs from Eastern Arizona. How long has it been there? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 519-522, 2006.

NIEBYLSKI, M. L.; PEACOCK, M. G.; SCHWAN, T. G. Lethal effect of *Rickettsia rickettsii* on tick vector (*Dermacentor andersoni*). **Applied and environmental microbiology**, v. 65, n. 2, p. 773-778, 1999.

NIGG, C.; LANDSTEINER, K. Studies on the cultivation of the typhus fever rickettsia in the presence of live tissue. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 55, n. 4, p. 563-576, 1932.

OLIVEIRA, P. R.; BORGES, L. M. F.; LOPES, C. M. L.; LEITE, R. C. Population dynamics of the free-living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari:Ixodidae) on pastures of Pedro Leopoldo, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 92, p. 295-301, 2000.

OLIVEIRA K. A.; OLIVEIRA, L. S.; DIAS, C. C. A.; SILVA Jr., A.; ALMEIDA, M. R.; ALMADA, G.; BOUYER, D. H.; GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C. L. Molecular identification of *Rickettsia felis* in ticks and fleas from an endemic area for Brazilian Spotted Fever. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 2, p. 191-194, 2008.

PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; NAVA, S.; BRANDÃO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. Detction of a novel spotted fever group rickettsia in *Amblyomma parvum* ticks (Acari:Ixodidae) from Argentina. **Experimental and Applied Acarology**, v. 43, n. 1, p. 63-71, 2007a.

PACHECO, R. C.; HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; ATALIBA, A. C.; PINTER, A.; LABRUNA, M.B. Rickettsial infection in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from São Paulo, Brazil: serological evidence for infection by *Rickettsia bellii* and *Rickettsia parkeri*. **Biomedica**, v. 27, n. 3, p. 364-371, 2007b.

PADDOCK, C. D.; GREER, P. W.; FEREBEE, T. L.; SINGLETON, J.; MCKECHNIE, D. B.; TREADWELL, T. A.; KREBS, J. W.; HOLMAN, R. C. OLSON, J. G.; CHILDS, J. E.; ZAKI, S. R. Hidden mortality attributable to Rocky Mountain spotted fever:

immunohistochemical detection of fatal, serologically unconfirmed disease. **Journal Infectious Diseases**, v. 179, n. 6, p. 1469-1476, 1999.

PADDOCK, C. D.; FERNANDEZ, S.; ECHENIQUE, G. A.; SUMMER, J. W.; REEVES, W. K.; ZAKI, S. R.; REMONDEGUI, C. E. Rocky Mountain spotted fever in Argentina. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 4, p. 687-692, 2008.

PATINO-CAMARGO, L. Nuevas observaciones sobre un tercer foco de fiebre petequeial (maculosa) en el hemisferio americano. **Boletín de la oficina sanitaria panamericana**, v. 20, p. 1112-24, 1941.

PAROLA, P.; RAOULT, D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p. 897-928, 2001.

PAROLA P.; PADDOCK C. D.; RAOULT D. Tick-borne Rickettsioses around the world: Emerging Diseases Challenging Old Concepts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, p. 719-756, 2005.

PEREIRA, G. M. **Epidemiologia teoria e prática**. 6. reimp. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara-Koogan. 2002, 596p.

PINTER, A.; DIAS, R. A.; GENNARI, S. M.; LABRUNA, M. B. Study of the seasonal dynamics, life cycle, and host specificity of *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae). **Journal Medical Entomology**, v. 41, n. 3, p. 324-332, 2004.

PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1078, p. 523-530, 2006.

PINTER, A., HORTA, M. C.; PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M. B. Serosurvey of *Rickettsia* spp. in dogs and humans from an endemic area for Brazilian spotted fever in the state of São Paulo, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 2, p. 247-252, 2008.

PIRANDA, E. M.; FACCINI, J. L.; PINTER, A.; SAITO, T. B.; PACHECO, R. C.; HAGIWARA, M. K.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical and laboratory findings. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 7, p. 696-701, 2008.

PIZA, J. T. Considerações epidemiológicas e clínicas sobre o Tifo Exantemático de São Paulo. São Paulo. **Sociedade Imprensa Paulista**, p. 11-119, 1932.

QUAGLIA, L. J. C. O eucalipto e a ecologia. **O papel**, São Paulo. v.60, n.8, p.46-47, 1999.

REGNERY, R. L.; SPRUILL, C. L.; PLIKAYTIS, B. D. Genotypic Identification of Rickettsiae and Estimation of Intraspecies Sequence Divergence for Portions of Two Rickettsial Genes. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 5, p. 1576-1589, 1991.

RIBEIRO, V. L. S.; WEBER, M. A.; FETZER, L. O.; VARGAS, C. R. B. Espécies e prevalência das infestações por carrapatos em cães de rua da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 27, n. 2, p. 285-289, 1997.

RICKETTS, H. T. Some aspects of Rocky Mountain spotted fever as shown by recent investigations. **Medical Record**, v. 76, p. 843-855, 1909.

RODANICHE, E. C. Natural infection of the tick *Amblyomma cajennense* with *Rickettsia rickettsii* in Panama. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 2, p. 696-699, 1953.

RODRIGUES, D. S.; CARVALHO, H. A.; FERNANDES, A. A.; FREITAS, C. M. V.; LEITE, R. C.; OLIVEIRA, P. R. Biology of *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) (Acari: Ixodidae) on some laboratory hosts in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 6, p. 853-856, 2002.

ROZENTAL, T.; BUSTAMANTE, M. C.; AMORIN, M.; SERRA-FREIRE, N. M.; LEMOS, E. R. S. Evidence of spotted fever group Rickettsiae in state of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 44, n. 3, p. 155-158, 2002.

ROZENTAL, T.; EREMEEVA, M. E.; PADDOCK, C. D.; ZAKI, S. R.; DASCH, G. A.; LEMOS, E. R. S. Fatal case of Brazilian Spotted Fever confirmed by immunohistochemical staining and sequencing methods on fixed tissues. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 257-259, 2006.

SAITO, T. B.; CUNHA-FILHO, N. A.; PACHECO, R. C. FERREIRA, F. PAPPEN, F. G.; FARIAS, N. A.; LARSON, C. E.; LABRUNA, M. B. Canine infection by Rickettsiae and Ehrlichiae in Southern Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 1, p. 102-108, 2008.

SANGIONI, L. A.; HORTA, M. C.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. M.; GALVÃO, M. A. M.; SCHUMAKER, T. T. S.; FERREIRA, F.; VIDOTTO, O.; LABRUNA, M. B. *Rickettsial* infection in animals and Brazilian Spotted Fever Endemicity. **Emerging Infectious Disease**, v. 11, n. 2, p. 265-270, 2005.

SEXTON, D. J.; MUNIZ, M.; COREY, G. R.; BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARY, B. C.; DUMLER, S.; WALKER, D. H.; PEÇANHA, P. M.; DIETZE, R. Brazilian spotted fever in Espírito Santo, Brazil: description of a focus of infection in new endemic region. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 2, p. 222-226, 1993.

SILVA, C. R. **Riqueza e diversidade de mamíferos não-voadores em um mosaico formado por plantios de *Eucalyptus saligna* e remanescentes de Floresta Atlântica no Município de Pilar do Sul, SP**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 2001, 81p.

SILVA, L. J.; GALVÃO, M. A. M. Epidemiologia das riquetsioses do gênero *Rickettsia* no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, suplemento 1, p. 197-198, 2004.

SILVEIRA, P. B. **Mamíferos de médio e grande porte em florestas de *Eucalyptus* spp com diferentes densidades de sub-bosques no Município de Itatinga, SP.** Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 75p. 2005.

SONENSHINE, D. E. Ecology of the American dog tick, *Dermacentor variabilis*, in a study area in Virginia. Studies on population dynamics using radioecological methods. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 65, p. 1165-1175, 1972a.

SONENSHINE, D. E.; PETERS, A. H.; LEVY, G. F. Rocky Mountain spotted fever in relation to vegetation in the eastern United States, 1951-1971. **American Journal of Entomology**, v. 96, n. 1, p. 59-69, 1972b.

SOUZA, S. S.A. L.; SOUZA, C. E.; NETO, E. J. R.; PRADO, A. P. Dinâmica sazonal de carrapatos (Acari: Ixodidae) na mata ciliar de uma área endêmica para febre maculosa na região de Campinas, São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, p. 887-891, 2006.

SPIELMAN, A.; HODGSON, J. C. The natural history of ticks: a human health perspective. In: _____. **Tickborne Infectious Diseases. Diagnosis and Management.** New York Ed. Burke A Cunha Marcel Dekker AG, 2000. p. 1-13.

STALLINGS, J. R. Small mammal inventories in na eastern brazilian park. **Bulletim Florida State Museum**, v. 34, n. 4, p. 153-200, 1989.

STALLINGS, J. R. The importance of understorey on wildlife in a Brazilian eucalpt plantation. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 7, p. 267-276, 1991.

TZIANABOS, T.; ANDERSON, B. E.; McDADE, J. E. Detection of *Rickettsia rickettsii* DNA in Clinical Specimens by Using Polymerase Chain Reaction Technology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 12, p. 2866-2868, 1989.

VALLEJO-FREIRE, A. Spotted fever in Mexico. **Memórias do Instituto Butantan**. v.19, p.159-180, 1946.

VENZAL, J. M.; PORTILLO, A.; ESTRADA-PEÑA, A.; CASTRO, O.; CABRERA, P. A.; OTEO, J. A. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma triste* from Uruguay. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 8, p. 1493-1495, 2004.

WILLIS, E. O. Birds of a eucalyptus woodlot in interior São Paulo. **Brazilian Journal of Biology**, v. 63, n. 1, p. 141-158, 2003.

WIKSWO, M. E., HU, R., METZGER, M. E.; EREMEEVA M. E. Detection of *Rickettsia rickettsii* and *Bartonella henselae* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from California. **Journal Medical Entomology**, v. 44, n. 1, p. 158-162, 2007.