

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL**

**ROBSON FERREIRA CAVALCANTE DE ALMEIDA**

**EPIDEMIOLOGIA DE RICKETTSIAS DO GRUPO DA FEBRE MACULOSA NO  
ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL**

**CAMPO GRANDE  
2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL**

**ROBSON FERREIRA CAVALCANTE DE ALMEIDA**

**EPIDEMIOLOGIA DE RICKETTSIAS DO GRUPO DA FEBRE MACULOSA NO  
ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL**

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina “Dr. Hélio Mandetta”, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob a orientação do Professor Doutor Renato Andreotti.

**CAMPO GRANDE  
2013**

## FOLHA DE APROVAÇÃO

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, meu encorajador, meu provedor e conhecedor de minhas necessidades, completa expressão de amor, que muitas vezes enxugou minhas lágrimas e retirou minha tristeza.

A minha esposa Mariana Pinheiro Alves Vincenzi por todo amor, apoio, dedicação e companheirismo. Eu só tenho a agradecer por você existir em minha vida.

As minhas filhas Manuela e Valentina, meus amores, pela alegria proporcionada nos momentos de angústia e dificuldade. O sorriso de vocês me deu forças para continuar.

Aos meus pais Manoel e Elisa por terem me ensinado valores sólidos e que nunca se desgastarão com tempo.

A Osvaldo Vincenzi e Maria Isabel Pinheiro Alves por me ensinarem como ser um pai melhor, um marido melhor, um filho melhor e um cidadão melhor.

Ao meu orientador Renato Andreotti por todo apoio e ensinamento que me permitiram concluir este trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Gado de Corte e da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pela preciosa contribuição durante todo o processo de execução e confecção desta tese. Sem o auxílio de vocês nada disso seria possível.

A Coordenação, professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da FAMED.

*“É melhor tentar e falhar,  
que preocupar-se e ver a vida passar;  
é melhor tentar, ainda que em vão,  
que sentar-se fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar,  
que em dias tristes em casa me esconder.  
Prefiro ser feliz, embora louco,  
que em conformidade viver ...”*

Martin Luther King

## RESUMO

Os carrapatos são parasitas acarídeos que transmitem agentes patogênicos capazes de exercer efeitos prejudiciais à saúde de seus hospedeiros, dentre eles, bactéria gram-negativas do gênero *Rickettsia* spp., que são responsáveis por zoonoses emergentes de importância global. No presente estudo, foi realizado levantamento epidemiológico para identificação de *Rickettsia* spp. do grupo da febre maculosa em carrapatos de hospedeiros domésticos, silvestres e do meio ambiente no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Foram coletados e classificados 3131 carrapatos, sendo 2015 capturados em hospedeiros na área urbana e 1116 na área peri-urbana. Os carrapatos foram avaliados por meio de teste de hemolinfa e por reação em cadeia da polimerase utilizando os primers CS 78/CS 323 e as amostras positivas foram submetidas a uma segunda reação em cadeia da polimerase para amplificação do gene *ompA*, utilizando os primers Rr 190.70p e Rr 190.602n. Todas as amostras de hemolinfa analisadas foram negativas e os resultados da reação em cadeia da polimerase identificaram como positivas para *Rickettsia* spp., quatro amostras de *A. nodosum* coletados de *Tamandua tetradactyla* e uma amostra de *Rhipicephalus sanguineus* coletada de cão. Os produtos da reação em cadeia da polimerase foram purificados e sequenciados e a análise filogenética baseada na sequência do gene *ompA* demonstrou que a amostra oriunda de *Amblyomma nodosum* esta segregada no mesmo *cluster* que *Rickettsia parkeri* cepa cooperi, com valor de bootstrap de 78%, podendo ser considerada *Rickettsia parkeri-like*. A análise da amostra de *R. sanguineus* mostrou ter homologia de 100% com outras sequências de *R. rickettsii* disponíveis no GenBank e está inclusa no mesmo *cluster* de isolados de *R. rickettsii* detectados em *Amblyomma* spp. no Brasil e de *R. rickettsii* e *Rickettsia philipii* encontrados em *Dermacentor* spp. nos Estados Unidos da América. Este trabalho relata pela primeira vez, no Município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, região Central do Brasil, a infecção natural de *A. nodosum* por *Rickettsia parkeri-like* e de *R. sanguineus* por *R. rickettsii*, importantes agentes causadores de doenças em seres humanos.

Descritores: *Rickettsia* spp. Epidemiologia. Rickettsioses. Febre maculosa. Carrapatos.

## ABSTRACT

Ticks are parasitic mites that transmit pathogens able to exert adverse effects on the health of their hosts, including Gram-negative bacteria of the genus *Rickettsia* spp., which are responsible for emerging zoonosis of global importance. In this study, an epidemiological survey was conducted to identify *Rickettsia* spp. the spotted fever group in ticks from domestic hosts, wildlife and the environment in Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Were collected and classified 3131 ticks, being 2015 captured in hosts the urban area and 1116 in the periurban area. Ticks were evaluated using hemolymph test and by polymerase chain reaction using the primers CS 78 and CS 323 and positive samples were submitted to a second polymerase chain reaction for amplification of *ompA* gene, using primers Rr 190.70p and Rr 190.602n. All hemolymph samples analyzed were negative and the results of polymerase chain reaction has identified as positives for *Rickettsia* spp., four samples *A. nodosum* collected *Tamandua tetradactyla* and one sample of *Rhipicephalus sanguineus* collected dog. The polymerase chain reaction products were purified and sequenced and phylogenetic analysis based on the sequence of the *ompA* gene has demonstrated that the sample originated from *Amblyomma nodosum* this segregated in same *cluster* as *Rickettsia parkeri* strain cooperi, with bootstrap value of 78%, and may be considered *Rickettsia parkeri*- like. The analysis of sample *R. sanguineus* has shown to have 100% homology with other sequences of *R. rickettsii* available in GenBank and is included in the same *cluster* of isolates of *R. rickettsii* detected in *Amblyomma* spp. in Brazil and *R. rickettsii* and *Rickettsia philipii* found in *Dermacentor* spp. in the United States of America. This work reports for the first time, in the city of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, midwestern of Brazil, natural infection of *A. nodosum* by *Rickettsia parkeri*-like and *R. sanguineus* by *R. rickettsii*, important causative agents of disease in humans.

Descriptors: *Rickettsia* spp. Epidemiology. Rickettsioses. Spotted fever. Ticks.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Hemolinfa corada com a coloração de Gimenez (1969). A – Amostra negativa. B – Amostra com estruturas morfológicamente semelhantes à <i>Rickettsia</i> spp. (Foto B – PIRANDA, 2008).....	12
Figura 2 – Carrapato do gênero <i>Amblyomma</i> spp., espécie <i>A. cajennense</i> .....	13
Figura 3 – Escarra de inoculação.....	14
Figura 4 – <i>R. sanguineus</i> principal carrapato de cães observado em áreas urbanas no Brasil. ....	16
Figura 5 - Mapa do Brasil destacando a região Centro-Oeste. Em detalhe mapa setorizado do Município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul.....	24
Figura 6 - Área da coleta periurbana. Os pontos em destaque definem os locais de coleta de carrapatos e captura de animais silvestres. ....	25
Figura 7 – Armadilhas de CO <sub>2</sub> , utilizando gelo seco, para captura de carrapatos. ...	26
Tabela 1 – Número e espécies de carrapatos coletados de março de 2011 a outubro de 2012. ....	31
Figura 8 - Árvore filogenética baseada no gene <i>ompA</i> de <i>Rickettsia</i> . spp. Rsa CG..	33
Tabela 2 – Hospedeiros, número e espécies de carrapatos coletados de março de 2011 a outubro de 2012 em área periurbana no município de Campo Grande, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil.....	34
Figura 9 – Resultado positivo de amostras de carrapatos <i>A. nodosum</i> submetidas a PCR com os primers CS 78 e CS 323, identificando o gene <i>gltA</i> , de <i>Rickettsia</i> spp., originando um produto de amplificação de 401 pb. 1 - marcador molecular de 100 pb; 2, 5, 6, 7, 8 e 10 amostras negativas; 3, 4, 9 e 11 amostras positivas; 12 controle negativo e 13 controle positivo. ....	34
Figura 10 – Alinhamento para avaliar a similaridade e divergências da sequência do gene <i>gltA</i> -CG de <i>Rickettsia</i> spp. CG amplificado a partir de <i>A. nodosum</i> , comparado com sequências do gene <i>gltA</i> de outras <i>Rickettsia</i> spp depositadas no GenBank. ...	35
Figura 11 - Árvore filogenética baseada no gene <i>ompA</i> de <i>Rickettsia</i> . spp. CG.....	36

# 1 INTRODUÇÃO

Os carrapatos são responsáveis por transmitirem aos seres humanos e animais uma grande variedade de bioagentes que podem causar complicações à saúde de seus hospedeiros e, dependendo da intensidade e do microrganismo envolvido no processo infeccioso, pode, muitas vezes, levá-los à morte. Esses ectoparasitas têm despertado o interesse da comunidade científica e de saúde pública por causa da sua participação na transmissão de doenças e esse interesse vem aumentando por causa da emergência e reemergência de enfermidades de natureza zoonótica e muitas vezes letal para os seres humanos.

Dentre as doenças transmitidas por carrapatos, as rickettsioses têm recebido especial atenção em todo mundo, sendo consideradas doenças de ameaça emergente global. Essas zoonoses, principalmente as determinadas pelas bactérias do grupo da febre maculosa (GFM), são reportadas no Brasil desde o final da década de 20. No entanto, somente em 2001 as rickettsioses passaram a ser consideradas doenças de notificação compulsória, ratificando a importância das rickettsias como importantes causas de doenças, emergentes e reemergentes, em seres humanos e animais.

Com casos confirmados em diferentes regiões do Brasil, sendo a maioria na região Sudeste, principalmente São Paulo e Minas Gerais, as doenças determinadas pelas bactérias do grupo da febre maculosa (GFM) são enfermidades subestimadas que, por não apresentarem sinais clínicos característicos, podem ser com frequência confundidas pelos profissionais da saúde.

Todas as espécies de rickettsias do GFM conhecidas até o momento mantêm seu ciclo de vida na natureza entre o carrapato vetor e algumas espécies de mamíferos silvestres, denominados de hospedeiros amplificadores. Embora a bactéria também seja transmitida entre gerações sucessivas de uma população de carrapatos por meio de transmissão transovariana ou transestadial, apenas este mecanismo não seria suficiente para mantê-la ativa ao longo do tempo. Desta forma, o efeito amplificador que alguns hospedeiros silvestres desempenham deve existir para assegurar a manutenção da bactéria na natureza.

Estudos ecológicos sobre rickettsias do GFM têm demonstrado que no Brasil as principais espécies de carrapatos envolvidas na transmissão dessa doença

pertencem ao gênero *Amblyomma* spp., no entanto outros gêneros já foram observados infectados. A bactéria mantém-se nesses carrapatos e amplificam-se em animais silvestres e domésticos, principalmente capivaras, antas e equinos. Cães domésticos que frequentam áreas de matas, também podem desempenhar um importante papel epidemiológico no ciclo urbano da doença, por causa do transporte de carrapatos infectados e contato mais próximo com seres humanos.

No Brasil, os carrapatos do gênero *Amblyomma* spp., estão distribuídos por todas as regiões, sendo os vetores competentes para a transmissão de *Rickettsia* spp., e além deste, outros gêneros de carrapatos também são potencialmente vetores, por esta razão estudos *in loco* devem ser realizados para identificar a presença de rickettsias na natureza e as relações epidemiológicas desses bioagentes com os hospedeiros locais, especialmente em áreas sem relato de casos, mas que apresentam condições favoráveis à circulação dessas bactérias.

A identificação dos hospedeiros amplificadores é um ponto importante no entendimento epidemiológico das rickettsioses, pois muitos deles colonizam áreas urbanas e peridomiciliares, determinando a aproximação dos seres humanos e animais domésticos à ixodofauna silvestre potencialmente infectada, aumentando a probabilidade de novos contágios.

Embora o Estado de Mato Grosso do Sul apresente condições propícias para a circulação de carrapatos potencialmente infectados por *Rickettsia* spp., os estudos sobre a circulação desta bactéria são limitados e somente em 2012 foi observada a presença deste agente por meio de análise molecular, infectando vetores no estado.

Considerando que os principais vetores da doença estão distribuídos abundantemente em todo o estado de MS, e os estudos são escassos, o objetivo deste trabalho foi estudar a epidemiologia das rickettsias do grupo da febre maculosa brasileira, por meio da identificação dos carrapatos presentes na região, associando-os com seus respectivos hospedeiros, realizando a análise molecular dos carrapatos para identificação dessas bactérias por meio da reação em cadeia da polimerase e o sequenciamento e análise filogenética das amostras positivas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos gerais

Carrapatos são artrópodes hematófagos obrigatórios que parasitam vertebrados em diversas partes do mundo (SONENSHINE, 1991). Estão entre os principais vetores de patógenos (vírus, bactérias e protozoários) para os animais e o homem (SERRA-FREIRE; SENA; BORSOI, 2011), que podem causar complicações a saúde de seus hospedeiros e muitas vezes leva-los á morte (ESTRADA-PEÑA; JONGEJAN, 1999). De maneira geral, são os segundo maiores vetores de doenças para humanos em todo mundo, perdendo apenas para os mosquitos, e considerados os maiores vetores de doenças para animais domésticos e selvagens (DE LA FUENTE *et al.*, 2008).

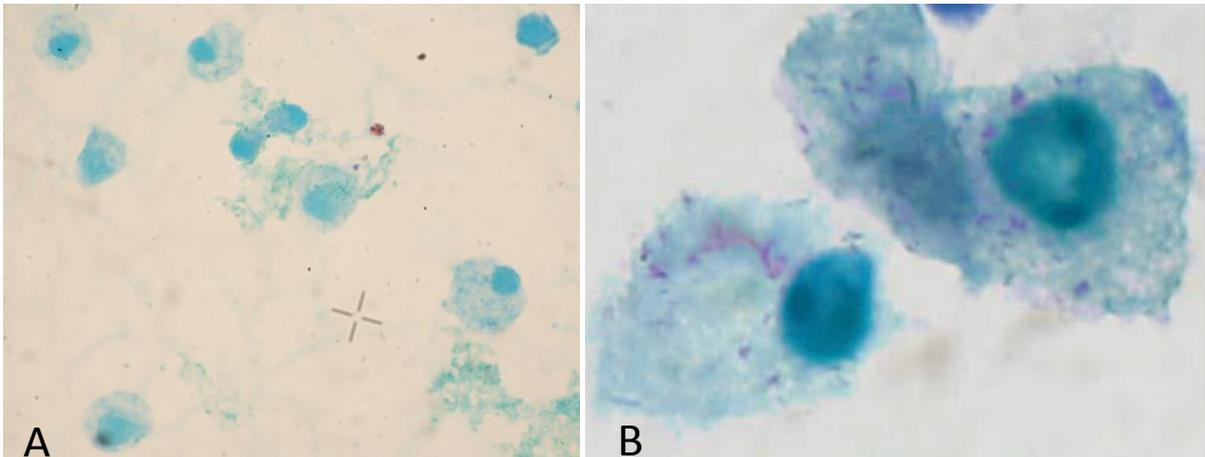
Os carrapatos possuem uma diversidade microbiana bastante variada que se distribui por diferentes tecidos (ANDREOTTI *et al.*, 2011). Essa diversidade de bioagentes os permite atuar como grandes vetores, principalmente de doenças emergentes, pois ao se alimentarem fixados nos hospedeiros, incluindo o homem, por períodos relativamente longos, transmitem os patógenos por meio da saliva. Sua saliva também contém quinases que catalisam a bradicinina, o que explica em parte a ausência de dor, enquanto permanecem aderidos aos hospedeiros e a presença de prostaglandinas que inibem a produção de interleucina 1 e a migração de macrófagos (MASSARD; FONSECA, 2004), prejudicando a resposta imunológica do hospedeiro.

Dentre as doenças transmitidas por carrapatos, as Rickettsioses têm recebido especial atenção em todo mundo, sendo consideradas doenças de ameaça emergente global (LIM *et al.*, 2012). Essas zoonoses, principalmente as determinadas pelas bactérias do grupo da febre maculosa (GFM), que inclui mais de 20 espécies, a maioria associada a carrapatos (PAROLA; PADDOCK; RAOULT, 2005), possuem características bastante variadas e não se coram pelo método de Gram, entretanto, podem ser coradas pelas técnicas de Gimenez (Figura 1) ou Giemsa (WEISS; MOULDER, 1984).

Com exceção das rickettsias do GFM, que eventualmente são vistas intranuclearmente, todas as rickettsias invadem exclusivamente o citoplasma (MELLES; COLOMBO; LEMOS, 1999). O mecanismo de invasão celular ainda não foi completamente descritos, sabe-se apenas que exige o envolvimento de um complexo grupo de proteínas e da participação das células endoteliais que desempenham uma função importante na regulação da resposta imunológica de acordo com sua localização e suas funções biológicas (REED; SERIO; WELCH, 2012; RYDKINA; TURPIN; SAHNI, 2010).

As rickettsioses constituem um grupo de doenças determinadas por bactérias intracelulares obrigatórias da Ordem Rickettsiales, Tribo Rickettsiae, Família Rickettsiaceae e Gênero *Rickettsia*. Várias espécies dessa ordem são relatadas como causadoras de doenças no homem e em outros hospedeiros vertebrados. Apesar da importância destas zoonoses ser frequentemente subestimada, as rickettsioses ocorrem em todos os países, de modo esporádico ou epidêmico, de acordo com fatores ecológicos ou epidemiológicos (DIAS; MARTINS, 1939; WEISS; MOULDER, 1984; ZOGUEREH; NDIHOKUBWAYO; SIMOYINUMA, 2000).

Figura 1 – Hemolinfa corada com coloração de Gimenez (1969). A – Amostra negativa. B – Amostra com estruturas morfológicamente semelhantes à *Rickettsia* spp.



Fonte A: Almeida (2013a).

Fonte B: Piranda (2008).

Das rickettsioses que apresentam potencial patogênico para os seres humanos, a determinada pela bactéria *R. rickettsii* é a que apresenta maior letalidade em todo mundo. Esta bactéria determina a doença intitulada febre maculosa, que no Brasil apresenta-se como doença infecciosa aguda, de gravidade

variável e pelo que se conhece até o momento, transmitida por carrapatos do gênero *Amblyomma* spp. (Figura 2). A ecologia e a distribuição do carrapato vetor determinam os principais aspectos epidemiológicos desta enfermidade (LEMOS *et al.*, 1997).

Mesmo sendo notificada pela primeira vez no Brasil no final de 1920 (ANGERAMI *et al.*, 2006; LEMOS *et al.*, 2001) somente nos últimos anos passou a ser considerada uma doença de notificação compulsória, ratificando a importância das rickettsias como causadoras de doenças em seres humanos e animais.

A doença apresenta sazonalidade bastante definida, onde o número de casos se concentra no período de maior atividade dos carrapatos, normalmente na primavera e verão, onde se encontram as melhores condições para a multiplicação desses vetores.

Figura 2 – Carrapato do gênero *Amblyomma* spp.



Fonte: Almeida (2013b).

Mesmo sendo relatados como hospedeiros acidentais, não sendo considerados reservatórios da doença, e também não colaborarem com a propagação do agente, os seres humanos são acometidos de maneira bastante intensa pela bactéria, que após a penetração no corpo pela picada do carrapato, as

rickétsias invadem as células endoteliais da parede vascular e a partir daí disseminam-se pelo organismo por via hematogena ou linfática. A multiplicação bacteriana gera uma vasculite e induz a ativação do sistema de coagulação, podendo levar a um quadro de trombose. As lesões geradas no endotélio vascular provocam aumento da permeabilidade capilar e frequentemente distúrbios hemostáticos podendo levar a formação de petéquias, escaras de inoculação (Figura 3), úlceras pruriginosas e exantema (BROUQUI, 1997).

Figura 3 – Escarra de inoculação



Fonte: Martino *et al.*, (2001).

Pelo quadro clínico da febre maculosa brasileira podemos considerá-la uma doença multissistêmica, que apresenta um curso variável, desde quadros clássicos a formas atípicas sem exantema, viscerotrópicas e fulminantes. Inicia-se, geralmente de forma abrupta, com manifestações inespecíficas tais como febre, mal-estar generalizado, cefaléia, hiperemia conjuntival e mialgias.

Os sinais e sintomas clínicos podem variar com comprometimento gastrointestinal com náusea, vômito, dor abdominal, diarréia e, eventualmente, comprometimento hepático com icterícia; manifestações renais com azotemia pré-renal relacionada à hipovolemia e à necrose tubular aguda; comprometimento pulmonar com tosse, edema pulmonar e alterações radiológicas incluindo infiltrado

alveolar, pneumonia intersticial, derrame pleural; manifestações neurológicas como déficit neurológico, meningite/encefalite e vasculite retiniana (BRASIL, 2010).

O exantema é o sinal mais importante da febre maculosa, aparece geralmente no terceiro-quinto dia de doença, podendo estar ausente em 15% a 20% dos pacientes, o que dificulta e retarda o diagnóstico, determinando maior número de óbitos. No início macular, o exantema pode evoluir posteriormente para um padrão maculopapular-petequial. Geralmente, no começo da doença atinge as extremidades, disseminando-se a seguir centripetamente para o tronco. Pode envolver a região palmoplantar, o que auxilia o diagnóstico, embora este comprometimento não seja observado em todos os casos. Podem ser observadas lesões equimóticas ou purpúricas, determinando necrose/gangrena, em decorrência da extensa lesão da microcirculação, requerendo às vezes amputação de dedos ou membros (KAPLOWITZ *et al.*, 1983).

O diagnóstico preciso e imediato é muito difícil, principalmente durante os primeiros dias, quando as manifestações clínicas também podem sugerir leptospirose, dengue, hepatite viral, salmonelose, encefalite, infecções respiratórias dentre outras. Com o surgimento do exantema, o diagnóstico diferencial deve ser feito com sarampo, meningococcemia, enterovirose, tifo endêmico, febre tifóide, leptospirose, dengue, febre purpúrica brasileira, sepse com coagulação intravascular disseminada, lues secundária, rubéola, mononucleose infecciosa, entre outras (LEMOS, 2002).

Recentemente, com o aumento de casos de doenças transmitidas por carrapatos, borreliose (doença de Lyme) e erliquiose devem também fazer parte do diagnóstico diferencial. Cabe ressaltar que os estudos sobre as rickettsioses são dados isolados, de áreas equidistantes, com diferentes ecologias, e os registros sugerem que a doença pode ser mais comum do que é demonstrado por dados existentes (NASCIMENTO *et al.*, 2005). Por isso, existe a necessidade de estudos que forneçam dados sobre a presença da doença *in loco* para que em suspeita da doença, esta possa ser diagnosticada de maneira oportuna e o tratamento adequado seja instituído rapidamente.

Nos carrapatos que são os hospedeiros naturais, reservatórios e vetores de *R. rickettsii*, a transmissão pode ser transovariana e também de estágio para estágio, infectando gerações sucessivas (BILLINGS *et al.*, 1998), permitindo que o microorganismo seja mantido na natureza pela transmissão cíclica entre os

carrapatos e os animais hospedeiros (MCDADE; NEWHOUSE, 1986, NASCIMENTO *et al.*, 2005).

Nos últimos anos tem se relatado o aumento no número de casos da doença, tanto pela proximidade maior dos seres humanos dos hospedeiros naturais, por conta da expansão das cidades sobre as matas, como pela maior participação de outros carrapatos como vetores da doença, como *Rhipicephalus sanguineus* (Figura 4). Esse carrapato, parasito de cães, foi confirmado como portador de *R. rickettsii* no Rio de Janeiro (CUNHA *et al.*, 2009), e que no Brasil, tem aumentado seu antropofilismo (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO; BRANDÃO-FILHO, 2006; GODDARD, 1989; LOULY *et al.*, 2006), sendo considerado um potencial vetor de doenças transmitidas por carrapatos a seres humanos.

Figura 4 – *R. sanguineus* principal carrapato de cães observado em áreas urbanas no Brasil



Fonte: ALMEIDA (2013c).

Com relação aos métodos de diagnóstico para febre maculosa ou para o GFM, estes são geralmente sorológicos e retrospectivos, com a utilização de diversas técnicas. A imunofluorescência indireta ainda é considerada o teste padrão-ouro para humanos e animais. É uma metodologia simples, econômica, com uma sensibilidade acima de 90%, podendo ser utilizada no diagnóstico oportuno da

doença, em estudos soropidemiológicos e ainda, na dependência da disponibilidade de diferentes antígenos, pode permitir a diferenciação de alguns isolados (SCOLA; RAOULT, 1997).

Por outro lado, embora de baixa sensibilidade e especificidade, quando necessário, o teste de Weil-Felix é empregado, pois é de fácil utilização no campo e apresenta baixo custo financeiro (NASCIMENTO; SCHUMAKER, 2004).

Outra metodologia utilizada para o diagnóstico laboratorial da doença é o isolamento do agente. Este recurso possibilita obter resultados positivos antes da soroconversão pelo paciente infectado, podendo ser utilizado no diagnóstico de casos agudos. As rickettsias podem ser isoladas a partir de triturado de coágulo, plasma, biópsia de pele, tecido de necropsia e amostras de artrópodes. O material pode ser inoculado em animais experimentais, em culturas primárias de embrião de galinha, linhagens de células VERO, entre outras (MELLES; COLOMBO; LEMOS, 1999).

A multiplicação rickettsiana pode ser acompanhada por meio do efeito citopático (ECP) e a confirmação do grupo de rickettsias é feita por meio de reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Todavia, a multiplicação de patógenos é extremamente difícil, sendo frustrante em grande parte das tentativas realizadas mesmo com espécimes coletados de pacientes sintomáticos (NASCIMENTO; COLOMBO, 2004).

O advento dos métodos de biologia molecular e a introdução de técnicas mais desenvolvidas de cultura de células ajudaram na identificação de novas rickettsias (ROUX *et al.*, 1997). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) mostra-se como uma técnica eficiente na investigação das interações entre as rickettsias e seus reservatórios artrópodes. Por ser uma técnica que depende somente de iniciadores (primers) de sequências específicas, tornou possível o desenvolvimento de ensaios de PCR específicos para espécies ou grupos específicos de espécies de rickettsias (BOUYER *et al.*, 2001).

A técnica de PCR mostra-se capaz de superar dificuldades associadas aos métodos tradicionais de isolamento, identificando a rickettsia do grupo da febre maculosa nos casos confirmados no Brasil, resultando em avanços significativos dentro do estudo da febre maculosa, podendo ser utilizado também para quantificar rickettsias, sendo um valioso instrumento complementar dos métodos atuais de quantificação de rickettsias (EREMEEVA; DASCH; SILVERMAN, 2003).

Cabe ressaltar, que a identificação seguida de caracterização molecular é fundamental para a descoberta de novas rickettsioses, especialmente em regiões onde as rickettsias ainda não tenham sido identificadas, pois diferentes rickettsioses podem apresentar as mesmas manifestações clínicas e os testes sorológicos, frente a determinados antígenos, podem resultar positivos em função da existência de reações cruzadas (CHOI *et al.*, 2005).

A PCR tem sido utilizada com frequência para a detecção de rickettsias em amostras humanas (sangue e tecidos) e em artrópodes, porém, muitos isolados apresentam o mesmo perfil eletroforético, não sendo possível a identificação de todas as espécies do GFM. As análises de sequências de bases de fragmentos de genes rickettsiais amplificados pela PCR, permitiram a diferenciação de inúmeras espécies. O diagnóstico baseado na PCR pode ser realizado em laboratórios ou centros de referência, necessitando de infra-estrutura relativamente simples, fornecendo resultado rápido (24 horas) e positivo em pacientes previamente submetidos à terapia com antibiótico. Esta técnica é a de escolha para diagnóstico rápido, especialmente antes da soroconversão (SCOLA; RAOULT, 1997).

### **2.1.1 Infecção em animais domésticos e silvestres**

Os carrapatos possuem uma extraordinária capacidade de agirem como vetores de doenças entre animais domésticos, silvestres, aves e o homem, pois possuem várias características biológicas que favorecem a transmissão de agentes patogênicos. O hematofagismo em todas as fases evolutivas aumenta sua eficiência como vetor; a fixação profunda nos hospedeiros dificulta sua remoção e propicia sua dispersão para outras áreas; o ingurgitamento lento favorece a inoculação e aquisição de patógenos; a adaptação a diferentes hospedeiros possibilita a veiculação de patógenos entre diferentes espécies; grande longevidade dos estágios imaturos no ambiente, o que otimiza o tempo para multiplicação de seus bioagentes; transmissão transovariana, permitindo sucessivas gerações com potencial de transmitir e atuarem como reservatórios; poucos inimigos naturais; são favorecidos pela excelente adaptação ao ambiente tropical; grande esclerotização, propiciando resistência as adversidades climáticas e; grande potencial biótico, favorecendo a perpetuação da espécie (HARWOOD; JAMES, 1979).

Considera-se que *R. rickettsii* mantém seu ciclo vital na natureza, entre o carrapato vetor e algumas espécies de pequenos roedores, chamadas de hospedeiro amplificador. Embora a bactéria também seja transmitida hereditariamente entre gerações sucessivas de uma população de carrapatos, apenas este mecanismo não seria suficiente para mantê-la ativa ao longo do tempo. Desta forma, o efeito amplificador que alguns animais silvestres desempenham deve existir para garantir a manutenção da bactéria na natureza. Nesse caso, o hospedeiro amplificador mantém a bactéria em níveis altos em sua corrente sanguínea por alguns dias ou semanas, garantindo que novos carrapatos se infectem, amplificando a infecção na população de carrapatos (BURGDORFER, 1988).

Alem dos carrapatos outros artrópodes podem ser vetores de agentes do grupo da febre maculosa como pulgas e piolhos que fazem repasto sanguíneo (são hematófagos, machos e fêmeas) nos animais que parasitam, mantendo assim um ciclo enzoótico (CALIC, 2004).

Tanto os artrópodes vetores como os animais parecem suportar bem a infecção, sendo esta geralmente inaparente, subclínica ou oligossintomática. Mas nem sempre a simbiose é bem tolerada. Animais podem adoecer e morrer. Muitos dos piolhos que adquirem o agente do tifo epidêmico podem vir a morrer em decorrência de uma descamação do epitélio de seu trato intestinal e consequente obstrução provocada pelas rickettsias. Carrapatos também podem ter sua fisiologia alterada (LABRUNA *et al.*, 2001).

A manutenção do ciclo zoonótico na natureza requer um vetor e um animal com rickettsemia, mas não é estritamente necessário este ciclo para a manutenção da *Rickettsia* spp. na natureza. Isto ocorre com os carrapatos, por exemplo, uma vez que por propagação transtadial e transovariana as rickettsias mantêm-se na prole descendente de carrapatos, apesar da redução na sua viabilidade. Os mamíferos funcionam apenas na amplificação da infecção (LABRUNA *et al.*, 2001).

Em geral, um hospedeiro primário é o vertebrado, sem o qual, uma determinada população de carrapato não é capaz de se estabelecer em uma área. Para a espécie *A. cajennense*, os hospedeiros primários são os equinos, antas e capivaras (FORTES *et al.*, 2011), principalmente os primeiros, que também podem ser utilizados na vigilância da rickettsioses por meio da pesquisa de anticorpos em soro (SANGIONI *et al.*, 2005). Em uma área onde a população de carrapatos esteja

estabelecida, pelo menos uma destas três espécies de vertebrados deverá estar presente.

Uma vez que a população de carrapatos cresce, ela passa a parasitar outros hospedeiros, chamados secundários. Na literatura há diversos relatos do parasitismo por *A. cajennense* em dezenas de espécies de hospedeiros mamíferos e aves. Como regra geral, quanto maior a população de *A. cajennense* numa determinada área, maior a chance de encontrá-lo parasitando outras espécies de hospedeiros, humanos inclusive. De fato, a ocorrência de infestação humana por *A. cajennense* está associada a altas infestações por este carrapato em seus hospedeiros primários (LABRUNA *et al.*, 2001).

Em áreas onde não ocorre a presença de equinos, as capivaras serão os hospedeiros primários predominantes para *A. cajennense* (FORTES *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2009), e esses roedores podem servir como potenciais sentinelas para identificar a circulação de *Rickettsia* spp. (MIRANDA *et al.*, 2011; PACHECO *et al.*, 2007). Pequenos roedores e gambás também podem participar do ciclo natural da doença, amplificando e infectando novos carrapatos durante respasto sanguíneo (HORTA *et al.*, 2007, 2010).

A infecção normalmente é sazonal, com a ocorrência de maior número de casos de febre maculosa, correspondendo ao aumento da atividade dos carrapatos e do concomitante maior contato do homem com estes artrópodes (SOUZA *et al.*, 2006).

Na região de Campinas, área endêmica de FMB, em levantamento das espécies, *Amblyomma dubitatum* apareceu em frequência significativa similar ao *A. cajennense*. *A. dubitatum* foi apresentado como hospedeiro de novo agente rickettsial no Brasil (*Rickettsia* spp. cepa Pampulha) (ALMEIDA *et al.*, 2011), e relatado como hospedeiro de *Rickettsia* spp. em áreas endêmicas de FMB (GUEDES *et al.*, 2011). Como eventualmente agride seres humanos pode se tornar um importante transmissor da doença para os seres humanos (LABRUNA *et al.*, 2007),

Segundo Labruna (2006) para que uma espécie de vertebrado seja considerada como um bom hospedeiro amplificador de *R. rickettsii* na natureza, ela deve preencher basicamente, alguns pre-requisitos, como ser abundante na área endêmica para a febre maculosa; ser um bom hospedeiro do carrapato vetor em condições naturais; ser susceptível à infecção por *R. rickettsii*; manter *R. rickettsii*

circulante em níveis plasmáticos suficientes para infectar carrapatos que nele se alimentam e possuem uma alta taxa de renovação populacional (quanto maior a renovação, maior será a introdução de animais susceptíveis na população).

Além de *A. cajennense*, outras espécies de carrapatos podem estar infectadas com rickettsias, mas somente as espécies do gênero *Amblyomma* spp. são consideradas importantes na transmissão da febre maculosa humana no Brasil. *A. aureolatum* é outro carrapato envolvido na epidemiologia da FMB, alimentando-se de animais selvagens durante os estágios imaturos e parasitando cães durante a fase adulta (MORAES-FILHO *et al.*, 2009a). *R. rickettsii* foi identificado neste carrapato, coletados de cães em região endêmica de São Paulo, sugerindo ser um importante vetor no Brasil (PINTER; LABRUNA 2006).

Embora os casos humanos sejam associados com infestações por carrapatos *Amblyomma* spp., vários relatos indicam um risco potencial de transmissão de *R. rickettsii* aos seres humanos por *R. sanguineus*, embora a confirmação deste vetor como transmissor no Brasil, ainda não tenha sido comprovada.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Estudar a epidemiologia de rickettsias do grupo da febre maculosa no Estado de Mato Grosso do Sul.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Para o alcance do objetivo geral foram estabelecidos os objetivos específicos descritos abaixo:

- a) identificar taxonomicamente os carrapatos coletados do ambiente e de hospedeiros;
- b) pesquisar a presença de rickettsias nas amostras por meio do teste de hemolinfa, a partir de coloração pelo método Gimenez;
- c) verificar por meio da reação em cadeia da polimerase a presença de rickettsias do grupo da febre maculosa, em carrapatos naturalmente infectados; e
- d) realizar o sequenciamento e análise filogenética das amostras positivas.

## **4 MATERIAIS E METODOS**

### **4.1 Tipo, período e local da pesquisa**

A pesquisa é um estudo seccional, realizado no período de março de 2011 a outubro de 2012, na área urbana e periurbana de Campo Grande, MS.

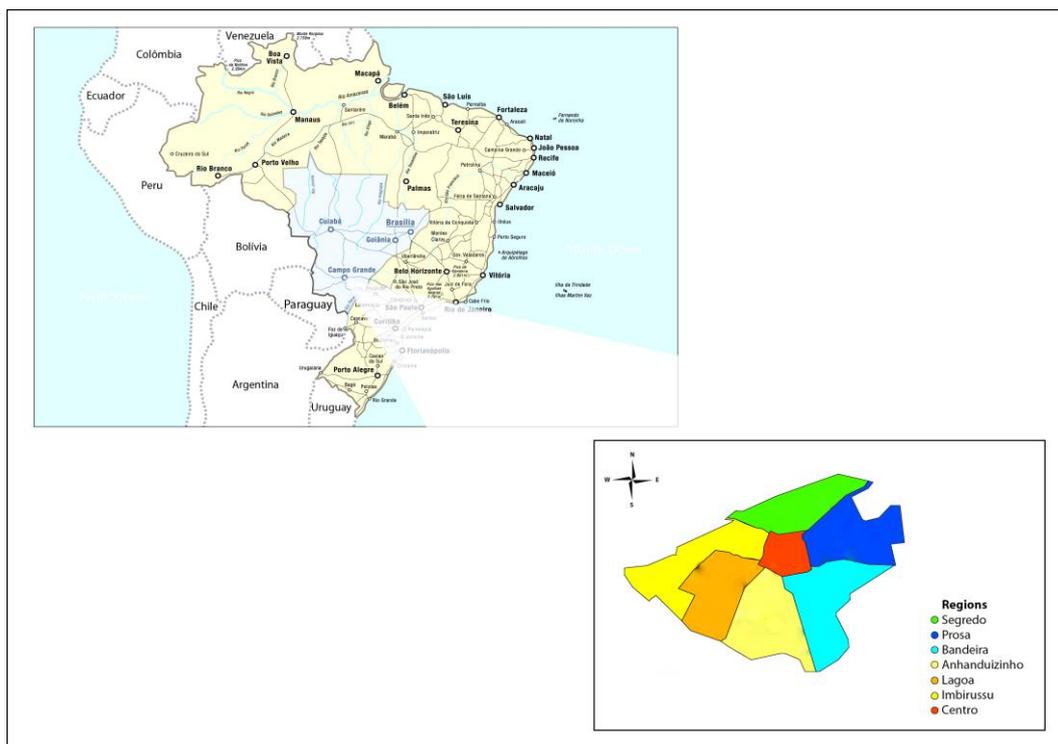
### **4.2 Local do estudo**

#### **4.2.1 Área urbana**

O estudo foi conduzido no Município de Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul, região central do Brasil (20°26'34 S e 54°38'47" O) (Figura 5). A região possui clima tropical, com precipitação anual média de 1200 mm e altitude de 592 m. O Município possui uma área total de 8.096,051 km<sup>2</sup> e área urbana de 154.454 km<sup>2</sup>, com população estimada de 796.252 habitantes e densidade populacional de 98,67 hab./km<sup>2</sup>. A área urbana do Município esta dividida em 74 bairros, sete regiões e dois distritos.

Na área urbana do município, no período do estudo, foram realizadas 14 coletas de carrapatos em cães domiciliados. A população canina da cidade é de aproximadamente 133 mil animais com uma relação cão/habitante de 1: 6,25.

Figura 5 - Mapa do Brasil destacando a região Centro-Oeste. Em detalhe mapa setorizado do Município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul



Fonte: Adaptado de Almeida *et al.* (2013) – Artigo 2 (Anexo C).

#### 4.2.2 Área periurbana

Na área periurbana o estudo foi conduzido em dois fragmentos de matas nativas pertencentes à Embrapa Gado de Corte, cuja sede ocupa uma área de 3.081 hectares e esta situada a 15 km do centro do Município de Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul. As posições geográficas das matas compreendem as coordenadas 20° 26.571' de latitude Sul, 54° 43.506' de longitude Oeste e altitude de 514 m; e 20° 26.601' de latitude Sul, 54° 43.738' de longitude Oeste e altitude de 494 m. O clima é caracterizado como tropical chuvoso de savana, com temperatura média anual de 23 °C. A cobertura vegetal dos fragmentos de mata é caracterizada por tipos fitofisionômicos, mata ciliar e vereda (Figura 6)

Figura 6 - Área da coleta periurbana. Os pontos em destaque definem os locais de coleta de carrapatos e captura de animais silvestres



Fonte: Google imagens (2013).

Para coleta dos carrapatos em animais silvestres, foram utilizadas para captura armadilhas tipo Tomahawk. Os animais foram capturados mediante autorização do Ministério do Meio Ambiente sob número 29430-1. Estes foram sedados utilizando associação de tiletamina e zolazepan em dosagem espécie específica de acordo com as recomendações do fabricante. Foram realizadas quatro coletas, com duração de 15 dias, uma em cada estação do ano, do outono de 2011 ao verão de 2012. Nesse mesmo período, foram realizadas coletas de carrapatos do ambiente por meio de arraste de flanela, busca visual (TERASSINI *et al.*, 2010) e com utilização de armadilhas de CO<sub>2</sub> (Figura 7).

Figura 7 – Armadilhas de CO<sub>2</sub>, utilizando gelo seco, para captura de carrapatos



Fonte: Almeida (2013d)

#### **4.2.3 Coleta de carrapatos**

Os animais foram inspecionados com o objetivo de identificar e colher carrapatos de diferentes espécies em instar de ninfa e adulto. Os carrapatos que se encontravam fixados à pele do hospedeiro foram removidos com pinça, girando em sentido horário para facilitar a desprendimento do mesmo, minimizando os danos ao aparelho bucal. Os carrapatos coletados foram acondicionados em microtubos de 1,5 mL com um pequeno furo na tampa e identificados quanto ao seu hospedeiro. Chegando ao laboratório, os carrapatos foram classificados processados e armazenados em ultrafreezer -80 °C até a extração de DNA.

#### **4.2.4 Identificação dos carrapatos**

Os carrapatos colhidos foram identificados e classificados de acordo com a chave taxonômica proposta por BARROS-BATTESTI; ARZUA e BECHARA (2006).

As ninfas ingurgitadas foram incubadas em estufa a 28 °C e 80 % de umidade para ecdise e posterior identificação.

#### **4.2.5 Teste de hemolinfa**

Os carrapatos foram lavados em álcool 70% e submetidos ao teste de hemolinfa para detecção direta das bactérias. Para tanto, a porção distal do primeiro par de patas foi seccionado e a hemolinfa transferida para uma lâmina que, depois de fixada, foi corada pelo método descrito por GIMENEZ (1969). Os carrapatos foram acondicionados em tubo de 1,5 mL e mantidos em freezer a – 80 °C.

#### **4.2.6 Extração de DNA**

Após a identificação da espécie, os carrapatos foram submetidos a extração de DNA utilizando um protocolo com associação de isotiocianato de guanidina (5 mL de Tris HCl 1 M; 10 mL de EDTA 0,5 M; isotiocianato de guanidina 6 M, 100 mL de água destilada) e fenol. O tampão de extração (GT) é preparado um dia antes do procedimento adicionando-se um volume de fenol em um volume da solução contendo isotiocianato de guanidina 6 M e incubando-se à 4 °C durante a noite. Os carrapatos foram retirados do freezer -80 °C e imediatamente macerados com pistilos em 150 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4) em gelo. Logo após, adicionou-se 450 µL do tampão GT gelado aos carrapatos macerados.

As amostras foram incubadas em banho de gelo durante 10 minutos, sendo vortexadas por 10 segundos a cada 2 minutos. Adicionou-se 100 µL de clorofórmio, homogeneizou-se a amostra em vortex por 10 segundos e incubou-as em gelo por mais 2 minutos. Foi realizada centrifugação a 12.000 x g a 4 °C durante 5 minutos. Aproximadamente 300 µL de fase aquosa foram transferidos para microtubos estéreis de 1,5 mL e adicionados de 600 µL de álcool isopropílico, seguidos de homogeneização por inversão dos tubos por 6 vezes e incubação a -20 °C durante 2 horas. As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g durante 15 minutos, a 4 °C e o

sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 800  $\mu\text{L}$  de etanol 70% ao precipitado e centrifugou-se novamente a 12.000 x g durante 15 minutos a 4 °C.

O precipitado foi seco em termobloco a 56 °C durante 15 minutos e ressuspenso em 50  $\mu\text{L}$  de água ultrapura estéril. As extrações foram incubadas durante a noite a 4 °C para a reidratação do DNA extraído. As amostras foram então quantificadas em aparelho GeneQuant™ Spectrophotometer (Pharmacia) e a concentração de DNA total de cada amostra foi corrigida para 200 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . As amostras de DNA extraído foram armazenadas a -20 °C até a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR).

#### 4.2.7 Detecção de *Rickettsia* spp. por PCR

Para a detecção de *Rickettsia* spp., as amostras foram testadas individualmente em PCR, utilizando-se os primers CS 78F (5'-GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT-3') e CS 323R (5'-GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT-3') que têm como alvo uma sequência parcial do gene da enzima citrato sintase (*gltA*), gerando um produto de 401-pb (LABRUNA *et al.*, 2004). A sequência deste gene é relativamente bem conservada em todas as espécies de *Rickettsia* spp. (ROUX *et al.*, 1997).

As PCR foram realizadas em termociclador Masterscycler® personal (Eppendorf), com 25  $\mu\text{L}$  de volume final por reação, contendo 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão de PCR (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.4), 0,75  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  50 mM (1.5 mM), 0,5  $\mu\text{L}$  de dNTP 10 mM (0,2 mM), 0,5  $\mu\text{L}$  de cada primer a 10  $\mu\text{M}$  (0,2  $\mu\text{M}$ ), 0,2  $\mu\text{L}$  de DNA polimerase 5 U  $\mu\text{L}^{-1}$  (1 U), 19,05  $\mu\text{L}$  de água e 1  $\mu\text{L}$  de DNA (aproximadamente 200 ng). As temperaturas utilizadas na termociclagem foram: um aquecimento inicial a 95 °C por 3 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95 °C a 15 segundos, 55 °C a 30 segundos e 72 °C a 30 segundos, e uma extensão final a 72 °C por 7 minutos.

As amostras positivas foram submetidas a PCR com os primers Rr 190.70p (5'-ATGGCGAATATTTCTCCAAAA-3') e Rr 190.602n (5'-AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT-3') que tem como alvo o gene *ompA* (REGNERY; SPRUILL; PLIKAYTIS, 1991). As PCR foram realizadas com 25  $\mu\text{L}$  de volume final por reação, contendo 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão de PCR (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH

8.4), 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0,5 µL de dNTP 10 mM, 0,5 µL de cada primer a 10 µM, 0,2 µL de DNA polimerase 5 U µl<sup>-1</sup>, 19,05 µL de água e 1 µL de DNA template. As temperaturas utilizadas na termociclagem foram: um aquecimento inicial a 95 °C por 3 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95 °C a 15 segundos, 55 °C a 30 segundos e 72 °C a 30 segundos, e uma extensão final a 72 °C por 7 minutos.

Em cada ensaio foram realizadas PCR's dos DNA's controles negativo e positivo (40 ng de DNA). Quinze microlitros de cada produto de PCR foram utilizados na eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio (0,5 µg mL<sup>-1</sup>). O gel foi fotodocumentado em transluminador com luz ultra-violeta.

O DNA utilizado como controle negativo foi extraído de uma cepa de *A. cajennense* de vida livre isolada em Campo Grande – MS, não infectada com *Rickettsia spp.* e mantida em laboratório. O controle positivo foi obtido de 100 µL de cultivo com 10<sup>6</sup> células de *R. parkeri* cepa NOD cultivadas em células Vero, gentilmente cedidas pelo pesquisador Marcelo Bahia Labruna do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

#### 4.2.8 Sequenciamento

Os produtos da PCR para o gene *ompA* que tiveram ampliações foram purificados pelo Kit Purelink™ (Invitrogen) seguindo recomendações do fabricante e posteriormente sequenciados. O sequenciamento foi realizado em sequenciador (DNA Analyser, Applied Biosystems), em sistema de análise de DNA de 48 capilares. As reações de sequenciamento foram feitas utilizando reagentes recomendados para o aparelho (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit) conforme recomendações do fabricante. As amostras foram sequenciadas no sentido 5' → 3', pela amplificação com o oligômero iniciador senso, e no sentido 3'→5', com o oligômero iniciador antisenso. As sequências consensos foram determinadas por análise em programa computacional BioEdit (HALL, 1999). As sequências parciais obtidas foram submetidas à análise BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990) para confirmar se havia semelhança com espécies de *Rickettsia spp.* e quais as espécies mais próximas.

#### **4.2.9 Análise filogenética**

A análise filogenética foi realizada utilizando o programa computacional MEGA 5.05 (TAMURA *et al.*, 2011). As sequências de DNA parciais obtidas a partir dos produtos amplificadas por PCR foram alinhadas com as sequências correspondentes de outras espécies de *Rickettsia* spp. disponíveis no GenBank utilizando o algoritmo CLUSTAL. A distância filogenética entre sequências homólogas foi calculada usando o *Kimura's two-parameter model*. Um filograma foi construído pelo método *neighbor-joining*. Os intervalos de confiança para ramos individuais da árvore resultante foram determinados por análise de bootstrap com 1.000 repetições. *Rickettsia australis* foi designado como *outgroup* (STENOS; WALKER, 2000).

#### **4.3 Aspectos éticos**

O projeto foi submetido à apreciação e aprovado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA/UFMS), estando de acordo com os princípios éticos em investigação que envolve animais e certificado pelo protocolo número 228 (Anexo A).

## 5 RESULTADOS

Os resultados deste trabalho permitiram a publicação de três artigos científicos:

Artigo 1 - The first report of *Rickettsia* spp. in *Amblyomma nodosum* in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil (Anexo B).

Artigo 2 - Ixodid fauna and zoonotic agents in ticks from dogs: first report of *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus sanguineus* in the state of Mato Grosso do Sul, mid-western Brazil (Anexo C).

Artigo 3 – Environmentally associated ticks (Acari: Ixodidae) in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil (Anexo D).

Esses resultados foram obtidos a partir da coleta de 3131 carrapatos, sendo 2015 capturados em hospedeiros na área urbana e 1116 na área periurbana, em hospedeiros e no meio ambiente, de três gêneros e oito espécies diferentes. Nas coletas do meio ambiente, por arraste de flanela, armadilhas de CO<sub>2</sub> e por visualização em vegetação foram coletados 417 exemplares de carrapatos (Tabela 1).

Tabela 1 – Número e espécies de carrapatos coletados de março de 2011 a outubro de 2012

<b>Espécies de carrapatos</b>	<b>Hospedeiros</b>	<b>Ambiente</b>	<b>n</b>
<i>Amblyomma</i> spp.	82	-	82
<i>A. cajennense</i>	426	391	817
<i>A. ovale</i>	38	-	38
<i>A. nodosum</i>	22	-	22
<i>A. dubitatum</i>	-	26	26
<i>Dermacentor nitens</i>	20	-	20
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	2015	-	2015
<i>Rhipicephalus microplus</i>	111	-	111
<b>Total</b>	<b>2714</b>	<b>417</b>	<b>3131</b>

Dos 2714 carrapatos coletados em hospedeiros, 2015 foram coletados em cães na área urbana de Campo Grande e 699 foram coletados de seis espécies de hospedeiros silvestres (quati, macaco-prego, tamanduá-bandeira, tamanduá-mirim, cotia e cachorro do mato), de bovinos e equinos na área periurbana.

Na área urbana de Campo Grande um total de 148 cães provenientes de 71 bairros foram avaliados e dos 2015 carrapatos coletados, foram identificadas as espécies *R. sanguineus* (98,86%) e *A. cajennense* (1,14%). Desses, 444 foram submetidos ao teste de hemolinfa e posterior extração de DNA para realização de PCR para identificação de *Rickettsia* spp..

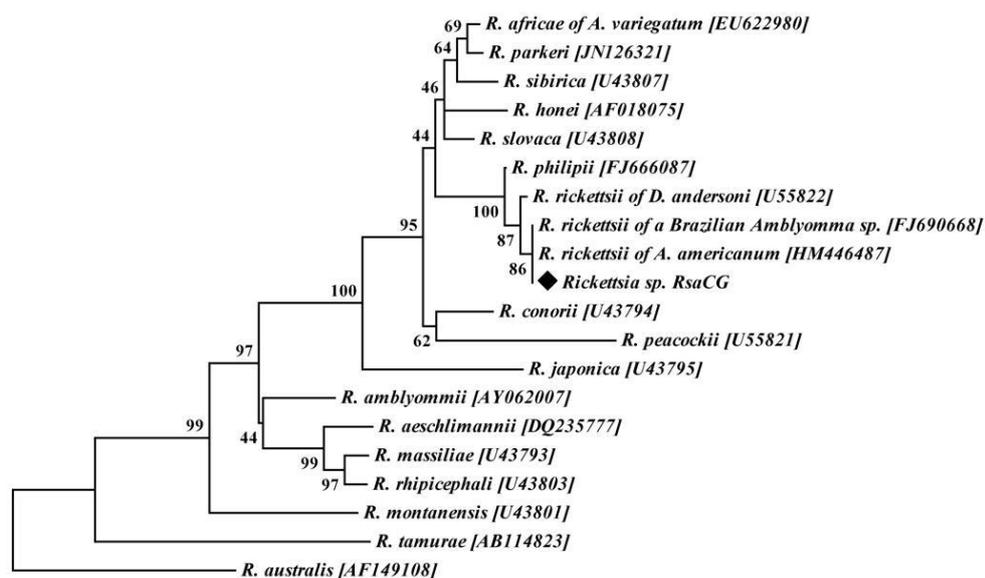
O teste de hemolinfa foi realizado em carrapatos adultos, de ambos os sexos, e todas as amostras analisadas apresentaram-se negativas.

Para extração de DNA e PCR as amostras foram agrupadas, utilizando três carrapatos de cada animal, totalizando 148 amostras. Com método de extração de DNA utilizado, extraíram-se DNA de carrapatos de forma eficiente, que depois de quantificados obteve-se uma concentração mínima entre 50 e 200 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  de DNA por amostra, expressando relação de pureza de  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} \geq 1,6$  para todas as amostras, permitindo, assim, a realização da PCR.

As PCR realizadas para identificação de *Rickettsia* spp. apresentaram uma amostra positiva o gene *gltA*, utilizando os primers CS 78 e CS 323, com produto amplificado de 401 pb. Essa amostra foi submetida a PCR com os primers Rr 190.70p e Rr 190.602n que tem com alvo o gene *ompA*, que gerou um produto de amplificação de 532 pb.

Após purificação o material foi encaminhado para sequenciamento e identificou pela primeira vez no estado de Mato Grosso do Sul, região central do Brasil, a presença de *Rickettsia rickettsii* em carrapato *R. sanguineus* infectado naturalmente. A análise filogenética do gene *OmpA* mostrou que *Rickettsia* spp. RsaCG é segregado no mesmo cluster de *R. rickettsii* de *Amblyomma americanum* e de *R. rickettsii* de *Amblyomma* spp. do Brasil com um bootstrap de 86% e com *R. rickettsii* de *Dermacentor andersoni* dos EUA e e *Rickettsia philipii* também dos EUA com um bootstrap de 100% (Figura 8).

Figura 8 - Árvore filogenética baseada no gene *ompA* de *Rickettsia*. spp. Rsa CG.



Nota: As sequências foram comparadas pelo método de *neighbor-joining* utilizando o software MEGA 5. A escala representa o número de mutações por posição dos nucleotídeos. A análise bootstrap foi realizada com 1000 repetições. ♦ Indica o isolado detectado nesse estudo. Os números entre parênteses são os números de acesso ao GenBank

O alinhamento revelou 100% de identidade com sequências homologas de *R. rickettsii* observada em *R. sanguineus* no Brasil (CP003307), Colômbia (CP003306) e México (HM195101). Essa sequência também foi idêntica a cepas observadas nos EUA em *Amblyomma americanum* (HM446487), *Dermacentor* spp. (EU109179), *Dermacentor andersoni* (U55822) e de *R. rickettsii* encontrada em cães e humanos (DQ150684).

Essa cepa também apresentou 100% de identidade com *R. rickettsii* relatadas no Brasil em *Amblyomma* spp. (JF690668) e em humanos (FJ959382). Este trabalho também relata pela primeira vez, em Mato Grosso do Sul, a infecção natural de *R. sanguineus* por *R. rickettsii*.

Na área periurbana de Campo Grande foram capturados 55 animais silvestres de seis espécies diferentes, sendo 35 quatis (*Nasua nasua*), 10 macacos-prego (*Cebus* spp.), quatro cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*), dois tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*), dois tamanduás-mirim (*Tamandua tetradactyla*) e duas cotias (*Dasyprocta aguti*). Também foram avaliados 15 equinos e 39 bovinos presentes na área do estudo. Desses animais foram coletados 699 carrapatos, conforme a tabela 2.

Tabela 2 – Hospedeiros, número e espécies de carrapatos coletados de março de 2011 a outubro de 2012 em área periurbana no município de Campo Grande, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil (n = 699)

Hospedeiros	<i>A. cajennense</i> * <sup>1</sup>		<i>A. ovale</i>	<i>A. nodosum</i>	<i>Amblyomma</i> spp. * <sup>2</sup>		<i>D. nitens</i>	<i>R. sanguineus</i>	<i>R. microplus</i>
	A	N	A	A	N	A	A	A	
Quati	10	46	38	-	37	-	-	-	
Macaco prego	-	-	-	-	-	-	-	-	
Cachorro do mato	7	15	-	-	25	-	-	-	
Tamandua bandeira	-	79	-	9	18	-	-	-	
Tamandua mirim	1	-	-	13	20	-	-	-	
Cotia	1	1	-	-	3	-	-	-	
Equinos	245	-	-	-	-	20	-	-	
Bovinos	-	-	-	-	-	-	-	111	

A - Adultos N - Ninfas

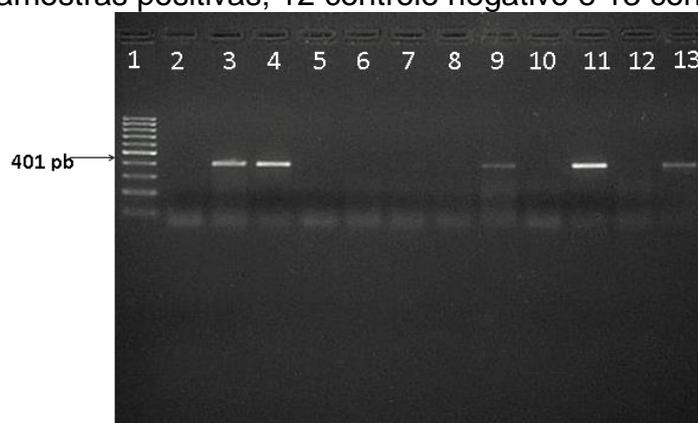
\*<sup>1</sup> Das 141 ninfas ingurgitadas de *A. cajennense*, 85 sofreram ecdise para forma adulta em estufa.

\*<sup>2</sup> Das 103 ninfas não ingurgitadas de *Amblyomma* spp., 21 sofreram ecdise para forma adulta após repasto sanguíneo em coelhos.

Todos os carrapatos adultos foram submetidos individualmente ao teste de hemolinfa e apresentaram resultado negativo. Procedeu-se extração de DNA dos 699 carrapatos coletados em hospedeiros e dos 417 carrapatos coletados do meio ambiente, totalizando 1116 amostras analisadas por PCR.

Das amostras analisadas, quatro das 13 amostras de *A. nodosum*, todos coletados de *Tamandua tetradactyla*, revelaram resultados positivos em PCR para *Rickettsia* spp. genes *gltA* (Figura 9) e *ompA*.

Figura 9 – Resultado positivo de amostras de carrapatos *A. nodosum* submetidas a PCR com os primers CS 78 e CS 323, identificando o gene *gltA*, de *Rickettsia* spp., originando um produto de amplificação de 401 pb. 1 - marcador molecular de 100 pb; 2, 5, 6, 7, 8 e 10 amostras negativas; 3, 4, 9 e 11 amostras positivas; 12 controle negativo e 13 controle positivo

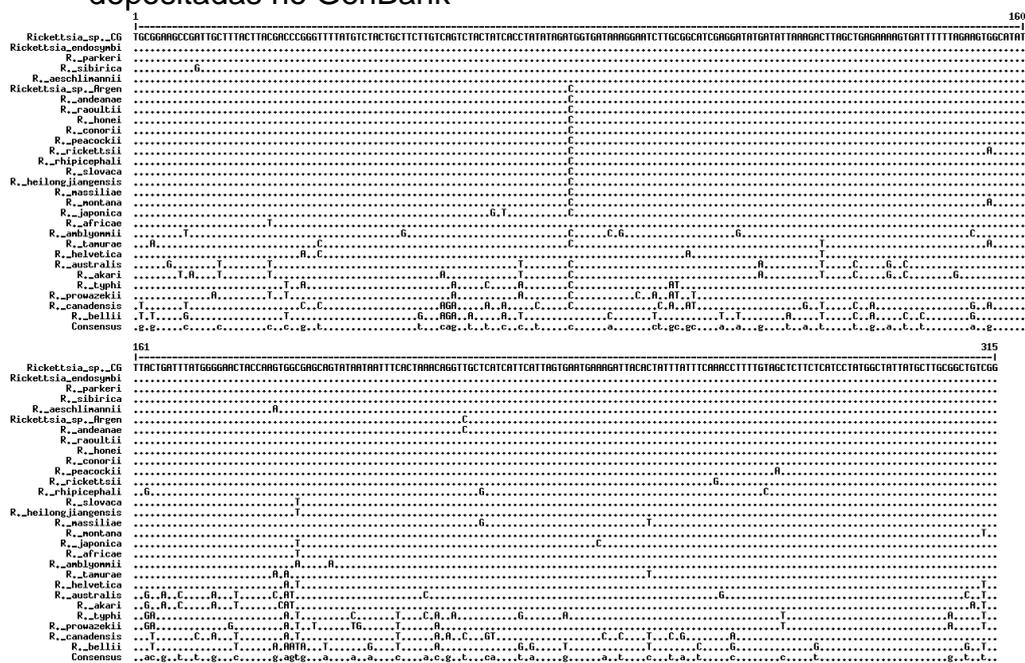


Todos os produtos de PCR foram purificados e sequenciados com sucesso. Desta maneira, foi obtida uma sequência consenso do gene *gltA* para cada amostra,

sendo que as quatro sequências geradas a partir dos quatro carrapatos *A. nodosum* eram idênticas umas as outras, obtendo-se, assim, uma sequência parcial de 315 pb do gene *gltA* de rickettsias a partir de uma estirpe de Campo Grande – MS, Brasil (*gltA-CG*).

A similaridade indicada pelo alinhamento mostrou que a sequência do gene *gltA-CG* amplificado a partir de *A. nodosum* foi 100 % (315/315) idêntica às sequências correspondentes de *R. parkeri* e *Rickettsia* spp. endossimbionte de *Amblyomma tuberculatum* dos EUA. Também demonstrou ser 99,7 % (314/315) idêntica às sequências de *R. sibirica* e *R. conorii* de Senegal e *R. rauloti* da Europa e Rússia. Apresentou similaridade para este gene de 99,4 % (313/315) com *Rickettsia* spp. da Argentina e 99,0 % (312/315) idêntica à *R. massiliae*, *R. montana* e *R. rickettsii*. As divergências entre pares de bases podem ser observadas na figura 10.

Figura 10 – Alinhamento para avaliar a similaridade e divergências da sequência do gene *gltA-CG* de *Rickettsia* spp. CG amplificado a partir de *A. nodosum*, comparado com sequências do gene *gltA* de outras *Rickettsia* spp. depositadas no GenBank

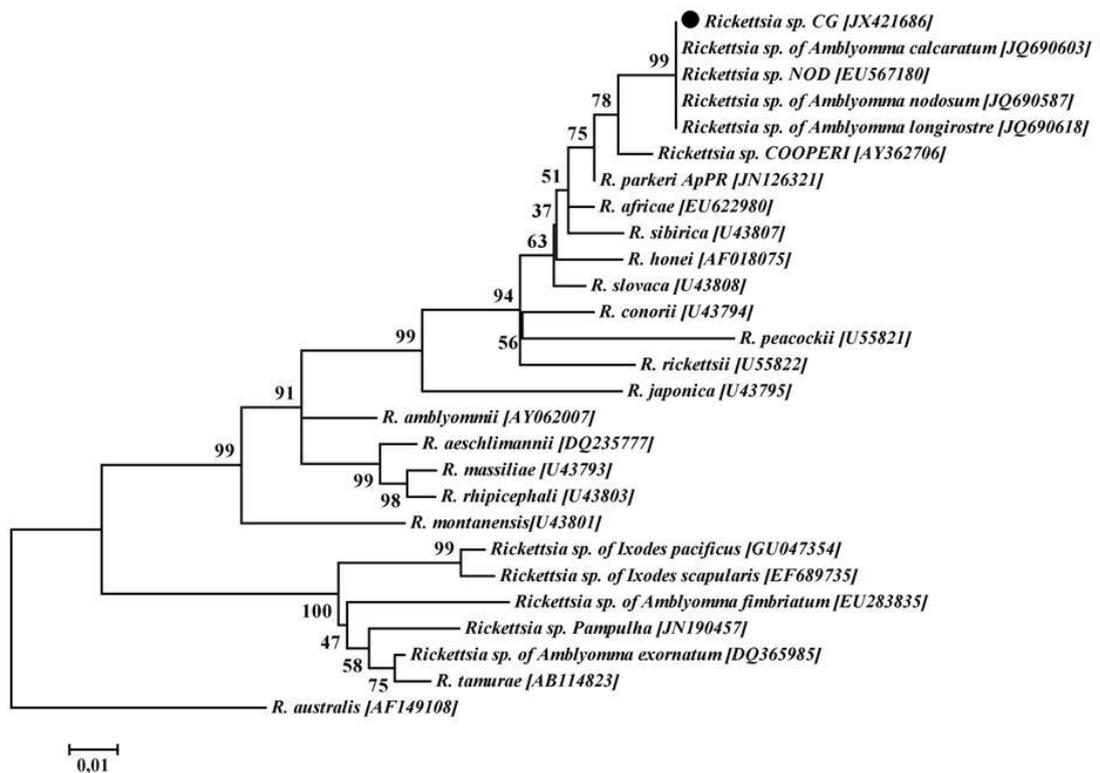


As sequências de DNA parciais gerados para os genes *gltA* e *ompA*, 315 pb e 510 pb, respectivamente, foram depositados no GenBank com números de adesão JX099787 e JX421686. A análise BLAST do gene *OmpA* CG revelou que a sequência do gene amplificado de *A. nodosum* foi 100% (491/491) idêntica às

sequências de *Rickettsia* spp. NOD do Brasil e de outras três sequências de *Rickettsia* spp. endossimbiontes de *A. longirostre* (448/448), *A. nodosum* (445/445) e *A. calcaratum* (444/444), todas dos EUA. A sequência *ompA* CG também foi 98,6% (484/491) idêntica a *R. parkeri* cepa ApPR e 98,4% idêntica a *Rickettsia* spp. cepa Cooperi, ambas do Brasil.

A análise filogenética inferida a partir da sequência do DNA rickettsial do gene *ompA* demonstra que *Rickettsia* spp. CG esta segregada no mesmo cluster de *R. parkeri* cepa COOPERI com um valor de bootstrap de 78% . Adicionalmente, *Rickettsia* spp. CG esta segregada no mesmo cluster de outras cepas de *R. parkeri* do Brasil e de uma cepa de *Rickettsia* spp. endossimbionte ainda não classificada com bootstrap variando de 75 a 99% (Figura 11).

Figura 11 - Árvore filogenética baseada no gene *ompA* de *Rickettsia* spp. CG.



Nota: As sequências foram comparadas pelo método de *neighbor-joining* utilizando o software MEGA 5. A escala representa o número de mutações por posição dos nucleotídeos. A análise bootstrap foi realizada com 1000 repetições. ● Indica o isolado detectado nesse estudo. Os números entre parênteses são os números de acesso ao GenBank

## 6 DISCUSSÃO

Os resultados mostraram uma alta prevalência de animais infestados por carrapatos, tanto na área urbana como periurbana de Campo Grande. Todas as espécies identificadas neste trabalho já haviam sido relatadas anteriormente em Mato Grosso do Sul.

Apesar de compartilharem o mesmo *habitat*, algumas espécies de carrapatos foram claramente ligadas a hospedeiros silvestres, enquanto outros apenas para animais domésticos. No entanto, a espécie de carrapato mais prevalente na área periurbana, *A. cajennense* foi encontrado em animais silvestres e domésticos e também foi a espécie mais frequente nas coletas no meio ambiente. Já a espécie mais prevalente na área urbana, *R. sanguineus* foi observada somente em cães domésticos.

Equinos encontravam-se parasitados apenas pelas espécies *A. cajennense* e *D. nitens*, confirmando esses carrapatos como os principais parasitos desses hospedeiros. Em bovinos a única espécie observada foi *R. microplus* ratificando ser este o principal ixodídeo de bovinos no Brasil. Mesmo com vários estudos destacando parasitismo de *R. microplus* em outros animais domésticos, silvestres (ARAGÃO, 1936; FRANQUE *et al.*, 2009; SZABÓ *et al.*, 2003), e seres humanos (SOARES *et al.*, 2007), neste trabalho este ectoparasito ficou restrito aos bovinos.

A maior prevalência e abundância de *A. cajennense* parece relacionada à sua adaptação ao Cerrado (SZABÓ; OLEGÁRIO; SANTOS, 2007; VERONEZ *et al.*, 2010) e baixa especificidade parasitária de hospedeiros durante as fases de vida, principalmente adulta, que inclui animais domésticos e selvagens (ARAGÃO, 1936; PEREIRA *et al.*, 2000; LABRUNA *et al.*, 2001). Desta forma, é o principal carrapato vetor de patógenos no Cerrado e pode ser um elo de transmissão de doenças entre animais silvestres e domésticos. Cabe ressaltar que esta espécie de carrapato também é agressiva ao homem e relatos de picadas são frequentes (GUGLIELMONE *et al.*, 2006), sendo considerado, no Brasil, o principal vetor de *Rickettsia rickettsii* (LABRUNA, 2009).

A segunda espécie mais abundante em animais silvestres, *A. ovale*, foi encontrada apenas na fase adulta. Esta espécie de carrapato tem uma preferência

por carnívoros, como quatis (LABRUNA *et al.*, 2005), e acredita-se que larvas e ninfas parasitam pequenos roedores (MARTINS, MOURA, LABRUNA, 2012).

No entanto, *A. ovale* não foi encontrado no outro carnívoro (Cachorro do mato), que conhecido por hospedar esta espécie de carrapato (LABRUNA *et al.*, 2005). Provavelmente, isso tenha ocorrido, por causa do baixo número de animais capturados. *A. ovale* também é conhecido por agressão a seres humanos (GUGLIELMONE *et al.*, 2006) e por ser reservatório de *Rickettsia* spp. na Mata Atlântica e em Santa Catarina (MEDEIROS *et al.*, 2011; SZABO *et al.*, 2103), podendo atuar como o vetor de uma nova rickettsiose no Brasil (SPOLIDORIO *et al.*, 2010).

A espécie de carrapato *A. nodosum* foi encontrada na forma adulta nas duas espécies de tamanduás capturados. Os relatos indicam que adultos desses carrapatos são mais comuns aos membros da família Myrmecophagidae, como é o caso do tamanduá mirim e do tamanduá bandeira (ARZUA; ONOFRIO; BARROS-BATTESTI, 2005; GUGLIELMONE *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2000), e as formas imaturas são parasitas de aves (LABRUNA *et al.*, 2007; OGRZEWALSKA *et al.*, 2009, TOLESANO-PASCOLI *et al.*, 2010).

A predominância de 98,86% de *R. sanguineus* em cães de área urbana detectada nesse estudo, corrobora com achados que indicam ser esta espécie a mais prevalente em áreas urbanas no Brasil (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO; BRANDÃO-FILHO, 2006; LABRUNA *et al.*, 2001; OYAFUSO *et al.*, 2002; RIBEIRO *et al.*, 1997; RODRIGUES; DAEMON; RODRIGUES, 2008; SZABO *et al.*, 2001), aliado ao fato de que *R. sanguineus* possui hábito nidícola e está adaptado aos domicílios localizados nas cidades (LABRUNA, 2004, RODRIGUES; DAEMON; RODRIGUES, 2008).

A observação de 1,14% dos cães infestados por *A. cajennense* pode estar associada a cães semi-domiciliados e com acesso livre a áreas remanescentes de mata, parques e outros ambientes, onde várias espécies de animais silvestres estão presentes, favorecendo a infestação por diferentes espécies de carrapatos nativos (LABRUNA; PEREIRA, 2001; LABRUNA *et al.*, 2001).

Todos os cães infestados por *A. cajennense*, neste trabalho, encontravam-se em regiões da periferia da cidade, onde a existe a presença de equinos, capivaras, quatis e outros pequenos roedores, que favorece as infestações dos cães por

carrapatos do gênero *Amblyomma* spp. (MONTEIRO *et al.*, 2004; PACHECO *et al.*, 2004; RODRIGUES; DAEMON; RODRIGUES, 2008).

Cabe ressaltar que cães que se movem livremente em pastagens, matas, parques, estábulos e ao redor das casas, sendo a maioria deles animais de estimação, principalmente para as crianças, podem constituir-se fator de risco para a ocorrência de casos humanos, pois transportam carrapatos de seu ambiente natural para as residências, aproximando os seres humanos e outros animais domésticos de espécies de carrapatos potencialmente vetores de rickettsias (CUNHA *et al.*, 2009).

A aproximação de seres humanos a outras espécies de carrapatos, muitas com grande antropofilismo, tendo como intermediários os cães e outros animais silvestres sinatrópicos, possui importante implicação na transmissão de bioagentes zoonóticos, antes confinados ao ambiente silvestre (LABRUNA, 2004; SERRA-FREIRE; SENA; BORSOI, 2011).

Todos os carrapatos capturados foram submetidos ao teste de hemolinfa, no entanto, em nenhuma das amostras analisadas observou-se estruturas sugestivas de *Rickettsia* spp. ou outros agentes patogênicos. O teste de hemolinfa é um método de triagem para identificar carrapatos infectados por rickettsias, sendo uma ferramenta bastante útil para o isolamento, principalmente em locais onde não existem relatos da doença e a necessidade de caracterização da cepa regional.

Essa técnica já foi utilizada por vários autores como mecanismo de identificação de *Rickettsia* spp. (BEATI *et al.*, 1995; ESTRADA *et al.*, 2006; PACHECO *et al.*, 2009); entretanto, neste estudo o teste apresentou baixa sensibilidade. Salientamos que achados morfológicos característicos são apenas sugestivos e não permitem diagnóstico conclusivo.

De acordo com Policastro *et al.* (1997), as rickettsias apresentam pleomorfismo térmico, alterando as formas intracelulares, interferindo na sensibilidade do teste, o que implica em resultados falsos negativos. Também a utilização de diferentes corantes e o pH da hemolinfa podem alterar a fixação e conduzir a diferenças na qualidade dos resultados, contribuindo com a baixa confiabilidade do teste (SANGIONI, 2003).

Com relação aos hospedeiros silvestres avaliados durante o estudo, dos 55 animais coletados, 35 eram quatis (*Nasua nasua*). *Nasua nasua* são mamíferos, da Ordem Carnívora, Família Procyonidae e possuem ampla distribuição por toda

América do Sul. Os quatis são capazes de se adaptarem a diferentes ambientes e esse comportamento faz com que seja possível esses animais viverem em florestas urbanas, fazendo intercâmbios entre áreas urbanizadas e matas nativas (BEISIEGEL, 2001; FIGUEIREDO; SANTOS; GUERRA, 2010; RODRIGUES, DAEMON, MASSARD, 2006).

A facilidade de adaptação dos quatis a ambientes modificados pelo homem pode levar a um aumento da sua população em áreas antropizadas (BISBAL, 1993; SANTOS; BIESIEGEL, 2006). Essa proximidade com áreas urbanas pode acarretar sérios problemas, pois facilita a transmissão de bioagentes para os animais domésticos e seres humanos. Em quatis já foram relatados várias espécies de carrapatos potencialmente vetores de *Rickettsia* spp., como *A. cajennense* e *A. ovale* (ARAGÃO; FONSECA, 1961).

Nesse trabalho essas foram as duas espécies de carrapatos encontradas parasitando quatis, sendo que todos os exemplares de *A. ovale* foram coletados nesses animais. Sendo esses carrapatos considerados vetores de *Rickettsia* spp. (LABRUNA *et al.*, 2004; PACHECO *et al.*, 2008; SABATINI *et al.*, 2010), esses hospedeiros podem atuar como amplificadores de *Rickettsia* spp.. Desta forma, estudos para avaliar a importância desses animais como hospedeiros amplificadores de *Rickettsia* spp. e como reservatórios de outras zoonoses emergentes devem ser estimulados.

Nos macacos-prego (*Cebus* sp. Schreber, 1774) nenhum carrapato foi observado. Como ocorre com os quatis, esses macacos são altamente adaptáveis, sendo encontradas desde ambientes com florestas densas, até ambientes bastante antropizados. Ressalta-se que esses primatas não humanos são reservatórios potenciais de várias zoonoses de interesse em Saúde Pública (LEITE *et al.*, 2008), e suscetíveis ao desenvolvimento de rickettsioses (PETERSEN *et al.*, 1975).

Desta forma, esses animais também devem ser investigados para avaliar a situação epidemiológica local desta infecção e para a vigilância dessa zoonose, pois esse hospedeiro já foi relatado infestado por carrapatos do gênero *Amblyomma* spp. (LABRUNA *et al.*, 2002).

As duas cutias (*Dasyprocta aguti* Linnaeus 1766) estavam parasitadas somente com espécimes do gênero *A. cajennense*. Esses pequenos mamíferos roedores já haviam sido relatados no estado, na região do Pantanal, como hospedeiros desta espécie de carrapato (CANÇADO, 2008).

Como esses animais pertencem a Ordem Rodentia, a mesma das capivaras, que são considerados excelentes hospedeiros amplificadores para *Rickettsia* spp., as cotias também podem atuar no ciclo silvestre da doença. No entanto, em decorrência do comportamento social e reprodutivo não são consideradas importantes como amplificadores desta bactéria.

Neste estudo, descrevemos o primeiro caso no Estado de Mato Grosso do Sul, Centro-Oeste do Brasil, de carrapatos da espécie *A. nodosum*, coletados diretamente de tamanduá-mirim (*T. tetradactyla*), infectados com *Rickettsia* spp. pertencente ao GFM e carrapato da espécie *R. sanguineus* infectado com *R. rickettsii*.

*Amblyomma nodosum* já havia sido descrito anteriormente infestando tamanduás (ARAGÃO, 1936; DANTAS-TORRES *et al.*, 2010; LABRUNA *et al.*, 2002), no entanto não existem informações sobre a presença de carrapatos desta espécie, coletados em *T. tetradactyla* infectados por *Rickettsia* spp.. *A. nodosum* infectado com *Rickettsia* spp., já foi relatado por Ogrzewalska *et al.* (2009), em estudos com espécies de aves passeriformes na Floresta Atlântica, onde foram identificadas as presenças de *R. belli* e *R. parkeri*, sendo este o primeiro relato desses agentes em *A. nodosum*.

Cabe lembrar que os tamanduás podem se infestar com outras espécies de carrapatos, incluindo *A. cajennense*, e servirem de amplificador da bactéria e infectar espécies de carrapatos mais agressivas para seres humanos.

Na análise filogenética do gene *ompA*, a sequência das amostras de *Rickettsia* spp. CG de *A. nodosum* foram idênticas a outras *Rickettsia* spp. observadas em *Amblyomma longirostre*, *A. nodosum* e *A. calcaratum*. A sequência também foi idêntica à *R. parkeri* cepa NOD, que foi isolada a partir de *A. nodosum*. Esse resultado nos permite sugerir que podemos ter detectado a mesma espécie de *R. parkeri*, pois elas estão presentes no mesmo cluster, sem uma distância significativa entre *R. parkeri* cepa NOD e *Rickettsia* sp. CG. No entanto, não podemos concluir que são a mesma espécie de *Rickettsia* spp. sem isolamento do agente.

Sendo assim, devemos considerar, mesmo sem o isolamento, *Rickettsia* spp. CG como uma *Rickettsia parkeri-like*, que é patogênica para seres humanos e determina sinais clínicos mais moderados, como linfadenopatia e lesões papulares no local da picada do carrapato (WITHMAN *et al.*, 2007).

*Rickettsia parkeri* já havia sido relatada no estado de Mato Grosso do Sul infectando *A. calcaratum* coletado em aves (OGRZEWALSKA *et al.*, 2013). Mesmo que, *A. calcaratum* e *A. nodosum* nunca tenham sido relatados agredindo seres humanos, e as possibilidades para estes carrapatos transmitirem *R. parkeri-like* para os seres humanos seja presumidamente baixa, o fato da bactéria ser encontrada infectando carrapatos, sugere a participação destes na epidemiologia da doença, principalmente, na infecção dos hospedeiros que atuarão como amplificadores e contaminando outras espécies de carrapatos.

A identificação de *R. sanguineus* infectado por *R. rickettsii* aumenta os riscos do aparecimento de casos de febre maculosa em seres humanos, tanto pela proximidade do homem com os cães infestados, como pela presença dessa espécie de carrapato em todas as regiões do Município. Desde 1940, estudos têm demonstrado que *R. sanguineus* pode participar no ciclo de transmissão para os seres humanos de rickettsias do grupo da febre maculosa (BUSTAMANTE; VARELA, 1947). No entanto, apenas em 2002 foi identificada *R. rickettsii* em *R. sanguineus* nos EUA, passando a ser considerado importante vetor da febre maculosa das montanhas rochosas no leste do Arizona (DEMMA *et al.*, 2005).

*Rickettsia rickettsii* já havia sido identificada infectando naturalmente *R. sanguineus* em outras regiões do Brasil (CUNHA *et al.*, 2009, GEHRKE *et al.*, 2009; MORAES-FILHO *et al.*, 2009b) e, com base em infecções experimentais realizadas por Costa *et al.* (2011), verificou-se a transmissão transtadial de *R. rickettsii* em *R. sanguineus* quando estes carrapatos são infectados na fase de ninfa.

A confirmação da transmissão transtadial corroborou com os achados de Piranda *et al.* (2011) que, ao alimentarem larvas e ninfas de *R. sanguineus* em cães com ricketsemia, observaram por meio da PCR a infecção por *R. rickettsii* dos instares seguintes, comprovando a transmissão transtadial do agente e a eficiência dos cães como agentes amplificadores.

Pacheco *et al.* (2011) também observaram a presença de DNA rickettsial em teleogina ingurgitadas e ovos de *R. sanguineus* coletados de cães, que depois de sequenciadas, as amostras revelaram identidade de 100% com *R. rickettsii*. As larvas de ovos infectados foram mantidas até a fase adulta, utilizando coelhos como hospedeiros. A infecção permaneceu durante todas as fases de desenvolvimento do carrapato (larvas, ninfas e adultos), indicando a competência vetorial de *R. sanguineus* para transmitir *R. rickettsii* a hospedeiros suscetíveis.

A análise da identidade genética da amostra positiva de *R. sanguineus* deste trabalho, *Rickettsia* spp. Rsa CG, revelou homologia de 100% com isolados de *R. rickettsii* de diferentes regiões do Brasil e do mundo.

*Rickettsia* spp. Rsa CG foi idêntica ao isolado detectado por Favacho *et al.* (2011), que causou a morte de um homem negro apenas cinco dias após o início dos sintomas e com ausência de erupções da pele, que é uma característica clínica comum em casos de febre maculosa, e ao isolado de *R. philipii* detectado por Shapiro *et al.* (2010) em um homem de 80 anos de idade, de uma área rural no sul da Califórnia, EUA.

Assim, a cepa de *Rickettsia* spp. identificada no presente estudo pode ter considerável potencial zoonótico, tanto pelo elevado grau de homologia com *R. rickettsii* e *R. philipii*, como pelo fato dos carrapatos infectados poderem parasitar o homem. A letalidade exibida por este grupo de bactérias e a diversidade clínica que pode ocorrer reforçam a importância de um método de diagnóstico rápido e preciso e a identificação do carrapato vetor que participa no ciclo local de doença.

A identificação de *A. nodosum* e *R. sanguineus* infectados por *R. parkeri-like* e *R. rickettsii*, respectivamente, sinaliza que estas espécies de carrapatos podem desempenhar um papel importante na transmissão desses agentes aos seres humanos e na manutenção e disseminação, por meio dos hospedeiros amplificadores dessas bactérias, no meio ambiente.

No caso de *R. sanguineus* que pode realizar hematofagia em seres humanos, os riscos do surgimento de várias antropozoonoses aumentam significativamente, e pela ausência de sintomatologia que as diferencie de outras doenças com eventos clínicos semelhantes e mais frequentes no homem, muitas vezes são diagnosticadas tardiamente, podendo levar a óbitos.

Alem disso, a estreita relação entre cães e humanos e a frequência com que esse ixodídeo é encontrado em ambientes urbanos, a observação de *R. rickettsii* em carrapatos em Campo Grande, serve de alerta aos órgãos de Saúde Pública para inclusão da febre maculosa no diagnóstico diferencial em casos de pacientes com sinais clínicos compatíveis e instituição de antibióticoterapia imediata em casos suspeitos.

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados dessa permitem concluir que a fauna ixodídea de cães na área urbana de Campo Grande esta restrita a duas espécies de carrapatos *R. sanguineus* e *A. cajennense*, enquanto na área periurbana encontram-se as espécies *A. cajennense*, *A. ovale*, *A. nodosum*, *A. dubitatum*, *R. microplus* e *D. nitens*. A maioria destes carrapatos estão restritos a microambientes e hospedeiros específicos, no entanto, *A. cajennense* está distribuido por várias fitofisionomias na área periurbana e em áreas antropizadas.

A grande quantidade de carrapatos observados em hospedeiros selvagens, principalmente em quatis, pode favorecer a disseminação de vetores e agentes patogênicos, antes confinados a ambiente silvestres, já que esses animais estão antropizados e a proximidade com áreas urbanas pode facilitar a transmissão de bioagentes para os animais domésticos e seres humanos.

Há ocorrência de *Rickettsia* spp. do grupo da febre maculosa infectando carrapatos das espécies *A. nodosum* e *R. sanguineus* em Campo Grande, Mato Grosso do Sul e pode contribuir na transmissão desses agentes aos seres humanos e na manutenção e disseminação por meio dos hospedeiros amplificadores dessas bactérias no meio ambiente.

A análise filogenética identificou em Campo Grande, a circulação de *R. parkeri-like* e *R. rickettsii*, que são bactérias patogênicas e que podem causar óbitos em seres humanos, sendo necessário o monitoramento pró-ativo das rickettsioses em Campo Grande, com a identificação de presença das bactérias do GFM em vetores e hospedeiros, objetivando a diminuição da exposição de pessoas e a consequente letalidade por essas rickettsioses.

## 8 RECOMENDAÇÕES

Em locais onde existem casos confirmados de rickettsioses ou locais onde existe a circulação da bactéria e risco de ocorrência da doença em seres humanos, devem ser implantados sistemas específicos de vigilância das rickettsioses que respeitem as características epidemiológicas locais. Essas ações de vigilância devem priorizar o diagnóstico e tratamento imediato de casos suspeitos, a investigação e controle de surtos, a investigação epidemiológica e controle dos vetores e dos locais prováveis de infecção e as medidas controle e prevenção da doença.

Entretanto, para que essas ações sejam eficientes, faz-se necessário a capacitação dos profissionais de saúde da rede local e a disseminação da importância do diagnóstico oportuno e diferencial com outras doenças.

Devem ser realizadas ações de educação e saúde da população para informar sobre a circulação sazonal do carrapato, como forma educativa e preventiva.

Os locais prováveis de infecção devem ser identificados, mapeados e monitorados, principalmente quanto à presença de vetores e disponibilidade de hospedeiros suscetíveis. Embora a presença de carrapatos infectados seja necessário, somente isso não é suficiente para produzir casos humanos, no entanto, fornece um ponto de partida para o estudo da epidemiologia e ecologia da doença e ações locais de vigilância epidemiológica.

Pela identificação de *Rickettsia* spp., patogênicas para seres humanos, no Estado de Mato Grosso Sul, a vigilância epidemiológica para as rickettsioses, principalmente do grupo da febre maculosa, deve ser realizada de maneira contínua, com a estimulação e financiamento de novos estudos, colocando-a na agenda de prioridades da saúde pública e de pesquisa, conforme preconizado pela Organização Mundial de Saúde. Ressalta-se que em áreas com risco da ocorrência da doença, financiamentos em pesquisas e a criação de laboratórios de referência devem estimulados para que se permita o diagnóstico rápido e preciso em casos suspeitos.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. P.; CUNHA, L. M.; BELLO, A. C. P. P.; CUNHA, A. P.; DOMINGUES, L. N.; LEITE, R. C.; LABRUNA, M. B. A novel *Rickettsia* infecting *Amblyomma dubitatum* ticks in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 2, n. 4, p. 209– 212, Dec. 2011.

ALMEIDA, R. F. C. Figura 1 - Foto A: Amostra negativa de hemolinfa corada com coloração de Gimenez (1969), 2013a.

ALMEIDA, R. F. C. Figura 2 – Foto de carrapato do gênero *Amblyomma* spp., espécie *A. cajennense*, 2013b.

ALMEIDA, R. F. C. Figura 4 – Foto de *R. sanguineus* principal carrapato de cães observado em áreas urbanas no Brasil, 2013c.

ALMEIDA, R. F. C. Figura 7 – Foto de armadilhas de CO<sub>2</sub>, utilizando gelo seco, para captura de carrapatos, 2013d.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, Oct. 1990.

ANDREOTTI, R.; LEÓN, A. A. P.; DOWD, S. E.; GUERRERO, F. D.; BENDELE, K. G.; SCOLES, G. A. Assessment of bacterial diversity in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* through tag-encoded pyrosequencing. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 1-11, Jan. 2011.

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 Área in Southeastern Brazil - Clinical Aspects. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, n. 1, p. 252-254, Oct. 2006.

ARAGÃO, H. Ixodidas brasileiros e de alguns países limítrofes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 31, n. 4, p. 759-843, 1936.

ARAGÃO, H.; FONSECA, F. Notas de Ixodologia VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 59, n. 2, p.115-130, 1961.

ARZUA, M.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. Catalogue of the tick collection (Acari: Ixodida) of the Museu de História Natural Capão da Imbuia, Curitiba, Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 3, p. 623-632, Sept. 2005.

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

BEATI, L.; KELLY, P. J.; MATTHEWMAN, L. A.; MASON, P. R.; RAOULT, D. Prevalence of rickettsia-like organisms and spotted fever group rickettsiae in ticks (acari: ixodidae) from Zimbabwe. **Journal of Medical Entomology**, v. 32, n. 6, p.787-792, Nov. 1995.

BEISIEGEL, B. M. Notes on the coati *Nasua nasua* (Carnivora: Procionidae) in an atlantic forest área. **Brazilian Journal of Biology**, v. 61, n. 4, p. 689-692, Nov. 2001.

BILLINGS, A. N.; YU, X. J.; TEEL, P. D.; WALKER, D. H. Detection of a spotted fever group rickettsia in *Amblyomma cajennense* (Acari: ixodidae) in south Texas. **Journal Medical Entomologic**, v. 35, n. 4, p. 474-478, July. 1998.

BISBAL, F. J. Impacto humano sobre los carnívoros de Venezuela. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 28, n. 3, p. 145-156, 1993.

BOUYER, D. H.; STENOS, J.; CROCQUET-VALDES, P.; MORON, C. G.; POPOV, V. L.; ZAVALA-VELASQUEZ, J. E.; FOIL, L. D.; STOTHARD, D. R.; AZAD, A. F.; WALKER, D. H. *Rickettsia felis*: molecular characterization of a new member of the spotted fever group. **International Journal of Systematic and Evolucionary Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 339-347, Mar. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias**: guia de bolso. 8. ed. Brasília; Ministério da Saúde, 2010.

BROUQUI, P. Tropical animal and human rickettsial infections. **Medicine Tropicale**, v. 57, suppl. 3, p. 23-27, Mar. 1997.

BURGDORFER, W. Ecological and epidemiological considerations of Rock Mountain spotted fever and scrub typhus. In: Walker D. H. (Org.). **Biology of Rickettsial Diseases**, v. 1, n. 1, p. 33-50, 1988.

BUSTAMANTE, M. E.; VARELA, G. Estudios de fiebre manchada en México: papel del *Rhipicephalus sanguineus* en la transmission de la fiebre manchada en la Republica Mexicana. **Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales**, v. 8, p.139-141, 1947.

CALIC, S. B. Sorologia das riquetsioses. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 13, supl. 1, p. 185-187, 2004.

CANÇADO, P. H. D. **Carrapatos de animais silvestres e domésticos do pantanal sul-matogrossense (sub-região da Nhecolândia): especies, hospedeiros e infestação em áreas com diferentes manejos**. 65f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Instituto de Veterinária – UFRRJ, Seropédica, 2008.

CHOI, Y. J.; LEE, S. H.; PARK, K. H.; KOH, Y. S.; LEE, K. H.; BAIK, H. S.; CHOI, M. S.; KIM, I. S.; JANG, W. J. Evaluation of PCR-based assay for diagnosis of spotted fever group Rickettsiosis in human serum samples. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 12, n. 6, p. 756-763, June. 2005.

COSTA, L. F. S.; NUNES, P. H.; SOARES, J. F.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Distribution of *Rickettsia rickettsii* in ovary cells of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille1806) (Acari: Ixodidae). **Parasites & Vectors**, v. 4, p. 222, Dec. 2011.

CUNHA, N. C.; FONSECA, A. H.; REZENDE, J.; ROZENTAL, T.; FAVACHO, A. R. M.; BARREIRA, J. D.; MASSARD, C. L.; LEMOS, E. R. S. First identification of natural infection of *Rickettsia rickettsii* in the *Rhipicephalus sanguineus* tick, in the State of Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 105-108, Feb. 2009.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A.; BRANDAO-FILHO, S. P. Primeira descrição de parasitismo humano por *R. sanguineus* (Acari: ixodidae) no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 64-67, jan./fev. 2006.

DANTAS-TORRES, F.; FERREIRA, D. R. A.; MELO, L. M.; LIMA, P. C. P.; SIQUEIRA, D. B.; ALBUQUERQUE, L. C. R.; MELO, A. V.; RAMOS, J. A. C. Ticks on captive and free-living wild animals in northeastern Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 50, n. 2, p. 181-189, Feb. 2010.

DE LA FUENTE, J.; ESTRADA-PEÑA, A.; VENZAL, J. M.; KOCAN, K. M.; SONENSHINE, D. E. Overview: ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, p. 6938-6946, May. 2008.

DEMMA, L. J.; TRAEGER, M. S.; NICHOLSON, W. L.; PADDOCK, C. D.; BLAU, D. M.; EREMEEVA, M. E.; DASCH, G. A.; LEVIN, M. L.; SINGLETON, J. J. R.; 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. 551-553, Aug. 2005.

DIAS, E.; MARTINS, A. V. Spotted fever in Brazil. A summary. **American Journal of Tropical Medicine**, v.19, n. 2, p. 103-108, 1939.

EREMEEVA, M. E.; DASCH, A. G.; SILVERMAN, D. J. Evaluation of a PCR Assay for quantitation of *Rickettsia rickettsii* and closely related Spotted Fever Group Rickettsiae. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5466-5472, Dec. 2003.

ESTRADA, D. A.; SCHUMAKER, T. T. S.; SOUZA, C. E.; RODRIGUES NETO, E. J.; LINHARES, A. X. Rickettsiae detection in Amblyomma ticks (Acari: Ixodidae) collected in the urban area of Campinas City, SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 68-71, Jan./Feb. 2006.

ESTRADA-PEÑA, A.; JONGEJAN, F. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. **Experimental Applied Acarology**, v. 23, n. 9, p. 685-715, Sept. 1999.

FAVACHO, A. R. M.; ROZENTAL, T.; CALIC, S. B.; SCOFIELD, M. A. M.; LEMOS, E. R. S. Fatal Brazilian spotless fever caused by *Rickettsia rickettsii* in a dark-skinned patient. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 3, p. 395-396, maio/jun. 2011.

FIGUEIREDO, M. A. P.; SANTOS, A. C. G.; GUERRA, R. M. S. N. C. Ectoparasitos de animais silvestres no Maranhão. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 11, p. 988-990, nov. 2010.

FORTES, F. S.; SANTOS, L. C.; CUBAS, Z. S.; BARROS-FILHO, I. R.; BIONDO A. W.; SILVEIRA, I.; LABRUNA, M. B.; MOLENTO, M. B. Anti-*Rickettsia* spp. antibodies in free-ranging and captive capybaras from southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 11, p. 1014-1018, Nov. 2011.

FRANQUE, M. P.; SANTOS, H. A.; LINAREZ, F. F. M.; MASSARD, C. L. Experimental equine infestation by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Ciência Rural**, v. 39, n. 7, p. 2117-2122, Oct. 2009.

GEHRKE, F. S.; GAZETA, G. S.; SOUZA, E. R.; RIBEIRO, A.; MARRELLI, M. T.; SCHUMAKER, T. T. S. *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia felis* and *Rickettsia* sp. TwKM03 infecting *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis* collected from dogs in a Brazilian spotted fever focus in the State of Rio De Janeiro/Brazil. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 15, suppl. 2, p. 267-268, 2009.

GIMÉNEZ, D. F. Staining Rickettsiae in yolk-sac cultures. **Stain Technology**, v. 39, p. 135-140, 1969.

GODDARD, J. Focus of human parasitism by the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 26, n. 6, p. 628-629, Nov. 1989.

GOOGLE IMAGENS. Figura 6 – Disponível em: [http://maps.google.com.br/maps?q=como%20referenciar%20imagens%20do%20google%20earth&bav=on.2,or.r\\_qf.&bvm=bv.46751780,d.dmg&biw=1366&bih=667&um=1&hl=pt-BR&ie=UTF-8&sa=N&tab=il](http://maps.google.com.br/maps?q=como%20referenciar%20imagens%20do%20google%20earth&bav=on.2,or.r_qf.&bvm=bv.46751780,d.dmg&biw=1366&bih=667&um=1&hl=pt-BR&ie=UTF-8&sa=N&tab=il), acesso em 14 de abril de 2013.

GUEDES, E.; LEITE, R. C.; PACHECO, R. C.; SILVEIRA, I.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma* ticks from an area endemic for Brazilian spotted fever in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 4, p. 308-311, Oct./Dec. 2011.

GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PEÑA, A.; KEIRANS, J. E.; ROBBINS, R. G. **Ticks (Acari: Ixodida) of the Neotropical Zoogeographic Region**, Atalanta, Houten: Publisher Universiteit Utrecht, 2003. (Special Publication of the International Consortium on Ticks and Tick-Borne Diseases-2).

GUGLIELMONE, A. A.; BEATI, L.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; NAVA, S.; VENZAL, J. M.; MANGOLD, A. J.; SZABÓ, M. J. P.; MARTINS, J. R.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; ESTRADA-PEÑA, A. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Experimental and Applied Acarology**, v. 40, n. 2, p. 83-100, Oct. 2006

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HARWOOD, R. F.; JAMES, M. T. **Entomology in human and animal health**. 7<sup>th</sup>. ed. New York: Macmillan Publishing, 1979.

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**, v.102, n. 7, p. 793-801, Nov. 2007.

HORTA, M. C.; SABATINI, G. S.; MORAES-FILHO, J.; OGRZEWALSKA, M.; CANAL, R. B.; PACHECO, R. C.; MARTINS, T. F.; MATUSHIMA, E. R.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of the opossum *Didelphis aurita* by *Rickettsia felis*, *Rickettsia bellii*, and *Rickettsia parkeri* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense* and *Amblyomma dubitatum*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 10, p. 959-967, Dec. 2010.

KAPLOWITZ, L. G.; LANGE, J. V.; FISCHER, J. J; WALKER, D. H. Correlation of rickettsial titers, circulating endotoxin, and clinical features in Rocky Mountain spotted fever. **Archives of Internal Medicine**, v. 143, n. 6, p. 1149-1155, June. 1983.

LABRUNA, M. B.; KERBER, C. A.; FERREIRA, F.; FACCINI, J. L. H.; DE WAAL, D. T.; GENNARI, S. M. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the State of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 97, n. 1, p. 1-14, May, 2001.

LABRUNA, M.B.; PEREIRA, M. C. Carrapatos em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, v. 30, p. 24-32, Jan./Fev. 2001.

LABRUNA, M. B.; PAULA, C. D.; LIMA, T. F.; SANA, D. A. Ticks (Acari: Ixodidae) on Wild Animals from the Porto-Primavera hydroelectric power station area, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 7, n. 8, p. 1133-1136, Dec. 2002.

LABRUNA, M. B. Biologia-ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, supl. 1, p. 123-124, 2004.

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, 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, Jan. 2004.

LABRUNA, M. B.; KEIRANS J. E.; CAMARGO, L. M.; RIBEIRO, A. F.; SOARES, R. M.; CAMARGO, E. P. *Amblyomma latepunctatum*, a valid tick species (Acari: Ixodidae) long misidentified with both *Amblyomma incisum* and *Amblyomma scalpturatum*. **Journal of Parasitology**, v. 9, n. 3, p. 527–541, June 2005.

LABRUNA, M. B. Epidemiologia da febre maculosa no Brasil e nas Américas. In: Simpósio Brasileiro de Acarologia, **Anais...** Viçosa, p. 63-72, Maio 2006.

LABRUNA, M. B.; PACHECO, R. C.; ATALIBA, A. C.; SZABÓ, M. P. J. Human parasitism by the capybara tick *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae). **Entomological News**, v. 118, n. 1, p. 77-80, Jan./Feb. 2007.

LABRUNA, M. B. Ecology of Rickettsia in South America. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1166, n. 1, p. 156-166, May 2009.

LEITE, T. N. B.; MAJA, T. A.; OVANDO, T. M.; CANTADORI, D. T.; SCHIMIDT, L. R.; GUÉRCIO, A. C.; CAVALCANTI, A.; LOPES, F. M. R.; CUNHA, I. A. L.; NAVARRO, I. T. Occurrence of infection *Leishmania* spp. and *Toxoplasma gondii* in monkeys (*Cebus apella*) from Campo Grande, MS. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, suppl. 1, p. 307-310, 2008.

LEMOS, E. R. S. Rickettsial diseases in Brazil. **Virus Reviews and Research**, v. 7, n. 1, p. 7-16, 2002.

LEMOS, E. R. S.; MACHADO, R. D.; PIRES, F. D. A.; MACHADO, S. L.; COSTA, L. M. C.; COURA, J. R. Rickettsiae-infection ticks in a endemic área for spotted fever in State of Minas Gerais, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 4, p. 477-481, July/Aug. 1997.

LEMOS, E. R. S.; ALVARENGA, F. B.; CINTRA, M. L.; RAMOS, M. C.; PADDOCK, C. D.; FEREBEE, T. L. Spotted fever in Brazil: a seroepidemiological study and description of clinical cases in an endemic area in the State of São Paulo. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 4, p. 329-334, Oct. 2001.

LIM, M. Y.; BRADY, H.; HAMBLING, T.; SEXTON, K.; TOMPKINS, D.; SLANEY, D. *Rickettsia felis* infections, New Zealand. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 167-169, Jan. 2012.

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, Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 1, p. 103-106, jan./mar. 2006.

MARTINO, O.; ORDUNA, T.; LOURTAU, L.; SCAPELLATO, P.; CERNIGO, B.; SEIJO, A. Rickettsioses do grupo das febres maculosas em viajantes argentinos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 6, p. 559-562, nov./dez. 2001.

MARTINS, T. F.; MOURA, M. M.; LABRUNA, M. B. Life-cycle and host preference of *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Experimental and Applied Acarology**, v. 56, n. 2, p. 151-158, Feb. 2012.

MASSARD, C. L.; FONSECA A. H. Carrapatos e doenças transmitidas, comuns ao homem e aos animais. **A Hora Veterinária**, v. 135, n. 1, p. 15-23, 2004.

MCDADE, J. E.; NEWHOUSE, V. F. Natural history of *Rickettsia rickettsii*. **Annual Review of Microbiology**, v. 40, p. 287-309, 1986.

MEDEIROS, A. P.; DE SOUZA, A. P.; DE MOURA, A. B.; LAVINA, M. S.; BELLATO, V.; SARTOR, A. A.; NIERI-BASTOS, F. A.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. Spotted fever group *Rickettsia* infecting ticks (Acari: Ixodidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.106, n. 8, p. 926-930, Dec. 2011.

MELLES, H. H. B.; COLOMBO, S.; LEMOS, E. R. S. Isolation of *Rickettsia* in vero cell culture. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 5, p. 469-473, Sept./Oct. 1999.

MIRANDA, J.; CONTRERAS, V.; NEGRETE, Y.; LABRUNA, M. B.; MÁTTAR, S. Vigilancia de la infección por *Rickettsia* sp. en capibaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) un modelo potencial de alerta epidemiológica en zonas endêmicas. **Biomedica**, v. 31, p. 216-221, Feb. 2011.

MONTEIRO, C. M. O.; SANTOS-ROSA, L.; DABÉS, L.; RODRIGUES, A. F. S. F. Levantamento preliminar da ixodofauna da mata do morro do imperador Juiz de Fora-MG, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, supl. 1, p. 315, 2004.

MORAES-FILHO, J.; HORTA, M. C.; PACHECO, R. C.; MAEDA, M. M.; GALANO, A.; OLIVEIRA, M. L.; YAL, L. E. O.; LABRUNA, M. B. Pesquisa de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii* em equinos do Centro de Controle de Zoonoses do município de São Paulo (CCZ/SP). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 2, p. 85-91, Aug. 2009a.

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. C.; LABRUNA, M. B. New epidemiological data on brazilian spotted fever in an endemic area of the state of São Paulo, Brazil. **Vector-borne Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 1, p. 73-78, Feb. 2009b.

NASCIMENTO, E. M. M.; COLOMBO, S. Diagnóstico Laboratorial da febre maculosa brasileira. **Informe Mensal sobre Agravos à Saúde Pública**, n. 9, p. 1282-1285, 2004.

NASCIMENTO, E. M. M.; SCHUMAKER, T. T. S. Isolamento e identificação de riquetsias no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, supl. 1, p. 193-196, 2004.

NASCIMENTO, E. M. M.; GEHRKE, F. S.; MALDONADO, R. A.; COLOMBO, S.; SILVA, L. J.; SCHUMAKER, T. T. S. Detection of Brazilian spotted fever infection by polymerase chain reaction in a patient from the state of São Paulo. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 3, p. 277-279, May 2005.

OGRZEWALSKA, M.; MARTINS, T.; CAPEK, M.; LITERAK, I.; LABRUNA, M. B. A *Rickettsia parkeri*-like agent infecting *Amblyomma calcaratum* nymphs from wild birds in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, n. 1-2, p. 145-147, Feb. 2013.

OGRZEWALSKA, M.; PACHECO, R. C.; UEZU, A.; RICHTZENHAIN, L. J.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in *Amblyomma nodosum* ticks (Acari: Ixodidae) from Brazil. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 103, n. 5, p. 413-425, July 2009.

OYAFUSO, M. K.; DAGNONE, A. S.; VIDOTTO, O.; MORAIS, H. S. A. Characterization of ticks infecting dogs in a hospital population in North Paraná, Brazil. **Ciencias Agrarias**, v. 23, n. 1, p. 71-74, Jan./June 2002.

PACHECO, R. C.; PINTER, A.; FERREIRA, P. M.; LABRUNA, M. B. Carrapatos infestando capivaras em cinco áreas do Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, supl. 1, p. 315, 2004.

PACHECO, R. C.; HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; ATALIBA, A. A.; 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*. **Biomédica**, v. 27, n. 3, p. 364-371, Sept. 2007.

PACHECO, R.; ROSA, S.; RICHTZENHAIN, L.; SZABÓ M. P. J.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia bellii* from *Amblyomma ovale* and *Amblyomma incisum* ticks from southern Brazil. **Revista Mvz Cordoba**, v. 13, n. 2, p. 1273-1279, May/Aug. 2008.

PACHECO, R. C.; HORTA M. C.; PINTER, A.; MORAES-FILHO, J.; MARTINS, T. F.; NARDI, M. S.; SOUZA, S. S. A. L.; SOUZA, C. E.; SZABÓ, M. P. J.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. Survey of *Rickettsia* spp in the ticks *Amblyomma cajennense* and *Amblyomma dubitatum* in the State of São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 3, p. 351-353, May/June 2009.

PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; GUEDES, E.; SILVEIRA, I.; RICHTZENHAIN, L. J.; LEITE, E. R. C.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infections of dogs, horses and ticks in Juiz de Fora, southeastern Brazil, and isolation of *Rickettsia rickettsii* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 25, n. 2, p. 148-155, June 2011.

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, Oct. 2005.

PEREIRA, M. C.; SZABÓ, M. P. J.; BECHARA, G. H.; MATUSHIMA, E. R.; DUARTE, J. M. B.; RECHAV, Y.; FIELDEN, L.; KEIRANS, J. E. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with wild animals in the Pantanal region of Brazil. **Journal Medical Entomology**, v. 37, n. 6, p. 979-983, Nov. 2000.

PETERSEN, C. E.; BAGLEY, L. R.; KENYON, R. H.; SAMMONS, L. S.; BURGER, G. T. Demonstration of *Rickettsia rickettsii* in the Rhesus Monkey by Immune Fluorescence Microscopy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 121-125, Aug. 1975.

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. 523-529. Oct. 2006.

PIRANDA, E. M. **Estudos biológicos de *Rhipicephalus sanguineus* e interação *Rickettsia rickettsii*, *R. sanguineus* e cães em condições laboratoriais**. 74f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Instituto de Veterinária - UFRRJ, Seropédica, 2008.

PIRANDA, E. M.; FACCINI, J. L. H.; PINTER, A.; PACHECO, R. C.; CANÇADO P. H. D.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of *Rhipicephalus sanguineus* ticks with the bacterium *Rickettsia rickettsii* using experimentally infected dogs. **Vector-borne Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 1, p. 29-36, Jan. 2011.

POLICASTRO, P. F.; MUNDERLOH, U. G.; FISCHER, E. R.; HACKSTADT, T. *Rickettsia rickettsii* growth and temperature-inducible protein expression in embryonic tick cell lines. **Journal Medical Microbiology**, v. 46, n. 10, p. 839-845, Oct. 1997.

REED, S.; SERIO, A. W.; WELCH, M. D. *Rickettsia parkeri* invasion of diverse host cells involves an Arp2/3 complex, WAVE complex and Rho-family GTPase-dependent pathway. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 529-545, Jan. 2012.

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, Mar. 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, June 1997.

RODRIGUES, A. F. S. F.; DAEMON, E.; MASSARD, C. L. Ectoparasites of *Nasua nasua* (Carnivora, Procyonidae) from an urban Forest in Southeastern Brazil. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 969-971, Oct. 2006.

RODRIGUES, D. F.; DAEMON, E.; RODRIGUES, A. F. S. F. Caracterização da população de ectoparasitos em cães de núcleos de expansão urbana de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 4, p. 185-188, 2008.

ROUX, V.; RYDKING, E.; EREMEEVA, M.; RAOULT, D. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsia. **International Journal of Systematic and Evolucionary Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 252-261, Apr. 1997.

RYDKINA, E.; TURPIN, L. C.; SAHNI, S. K. *Rickettsia rickettsii* infection of human macrovascular and microvascular endothelial cells reveals activation of both common and cell type-specific host response mechanisms. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 6, p. 2599-2606, June 2010

SABATINI, G. S.; PINTER, A.; NIERI-BASTOS, F. A.; MARCILI, A.; LABRUNA, M. B. Survey of ticks (Acari: Ixodidae) and their rickettsia in an Atlantic rain Forest reserve in the state of São Paulo, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 47, n. 5, p. 913-916, Sept. 2010.

SANGIONI, L. A. **Pesquisa de infecção por riquettsias do grupo da febre maculosa em humanos, cães, equideos e em adultos de *Amblyomma cajennense*, em região endêmica e não endêmica do estado de São Paulo**. 86f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicado às Zoonoses), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, 2003.

SANGIONI, L. A.; HORTA, M. C.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. M.; MÁRCIO, A. 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 Diseases**, v. 11, n. 2, p. 265-270, Feb. 2005.

SANTOS, V. A. S.; BEISIEGEL, B. M. A dieta de *Nasua nasua* (Linnaeus, 1766) no Parque Ecológico do Tietê, SP. **Revista Brasileira de Zociências**, v. 8, n. 2, p. 199-203, 2006.

SCOLA, B. L.; RAOULT, D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 11, p. 2715-2727, Nov. 1997.

SERRA-FREIRE, N. M.; SENA, L. M. M.; BORSOI, A. B. P. Parasitismo humano por carrapatos na Mata Atlântica, Rio de Janeiro, Brasil. **Entomobrasilis**, v. 4, n. 2, p. 67-72, Maio/Ago. 2011.

SHAPIRO, M. R.; FRITZ, C. L.; TAIT, K.; PADDOCK, C. D.; NICHOLSON, W. L.; ABRAMOWICZ, K. F.; KARPATY, S. E.; DASCH, G. A.; SUMNER, J. W.; ADEM, P. V.; SCOTT, J. J.; PADGETT, K. A.; ZAKI, S. R.; EREMEEVA, M. E. Rickettsia 364 D: A newly recognized cause of eschar-associated illness in California. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 4, p. 541-548, Feb. 2010.

SOARES, J. F.; SANGIONI, L. A.; VOGEL, F. S. F.; SILVA, C. F. B. Human parasitism by *B. microplus* (Acari: Ixodidae), Santa Maria, RS, Brazil. **Ciência Rural**, v. 37, n. 5, p. 1495-1497, Sept./Oct. 2007.

SONENSHINE, D. E. **Biology of ticks**. Oxford University Press, New York, 1991, (v. 1).

SOUZA, S. S. A. L.; SOUZA, C. E.; RODRIGUES NETO, E. J.; PRADO, A. P. Seasonal dynamics of ticks (Acari:Ixodidae) in an endemic area for spotted fever in the Campinas region, state of São Paulo, Brazil. **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, p. 887-891, June 2006.

SOUZA, C. E.; MORAES-FILHO, J.; OGRZEWALSKA, M.; UCHOA, F. C.; HORTA, M. C.; SOUZA, S. S. L.; BORBA, R. C. M.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. **Veterinary Parasitology**, v. 161, n. 1-2, p. 116-121, Apr. 2009.

SPOLIDORIO, M. G.; LABRUNA, M. B.; MANTOVANI, E.; BRANDÃO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J.; YOSHINARI, N. H. Novel spotted fever group rickettsiosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 521-523, Mar. 2010.

STENOS, J.; WALKER, D. H. The rickettsial outer-membrane protein A and B genes of *Rickettsia australis*, the most divergent rickettsia of the spotted fever group. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 1775-1779, 2000.

SZABÓ, M. P. J.; OLEGÁRIO, M. M. M.; SANTOS, A. L. Q. Tick fauna from two locations in the Brazilian savannah. **Experimental and Applied Acarology**, v. 43, n. 1, p. 73-84, Sept. 2007.

SZABÓ, M. P. J.; CUNHA, T. M.; PINTER, A.; VICENTINI, F. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 25, n. 10-11, p. 909-916, 2001.

SZABÓ, M. P.; LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C.; DUARTE, J. M. Ticks (Acari: Ixodidae) in wild marsh deer (*Blastocerus dichotomus*), from Southeast Brazil: infestations before and after habitat loss. **Journal of Medical Entomology**, v. 40, n. 3, p. 268-274, May 2003.

SZABÓ, M. P. J.; NIERI-BASTOS, F. A.; SPOLIDORIO, M. G.; MARTINS, T. F.; BARBIERI, A. M.; LABRUNA, M. B. *In vitro* isolation from *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) and ecological aspects of the Atlantic rainforest *Rickettsia*, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. **Parasitology**, v. 140, n.6, p. 719 - 728, May 2013.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, May 2011.

TERASSINI, F. A.; BARBIERI, F. S.; ALBUQUERQUE, S.; SZABÓ, M. P. J.; CAMARGO, L. M. A.; LABRUNA, M. B. Comparison of two methods for collecting

free-living ticks in the Amazonian forest. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 1, p. 194-196, 2010.

TOLESANO-PASCOLI, G. V.; TORGA, K.; FRANCHIN, A. G.; OGRZEWALSKA, M.; GERARDI, M.; OLEGÁRIO, M. M. M.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P. J.; MARÇAL-JÚNIOR, O. Ticks on birds in a forest fragment of Brazilian cerrado (savanna) in the municipality of Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 4, p. 244-248, Oct./DEC. 2010.

VERONEZ, V. A.; FREITAS, B. Z.; OLEGARIO, M. M. M.; CARVALHO, W. M.; PASCOLI, G. V. T.; THORGA, K.; GARCIA, M. V.; SZABÓ, M. P. Ticks (Acari: Ixodidae) within various phytophysiognomies of a Cerrado reserve in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 50, n. 2, p. 169-179, Feb. 2010

WEISS, E.; MOULDER, J. W. The rickettsias and chlamydias. In: KRIEG, N. R. (Org.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. p. 687-709. Baltimore: Publisher Lippincott Williams & Wilkinsp, 1984.

WITHMAN, T. J.; RICHARDS, A. L.; PADDOCK, C. D.; TAMMINGA, C. L.; SNIEZEK, P. J.; JIANG, J.; BYERS, D. K.; SANDERS, J. W. *Rickettsia parkeri* infection after ticks bite, Virginia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 334-336, Feb. 2007.

ZOQUEREH, D. D.; NDIHOKUBWAYO, J. B.; SIMOYINUMA, A. Epidemic typhus in tropical Africa: a reemerging disease that is severe but curable. **Santé**, v. 10, n. 5, p. 339-44, Sept./Oct. 2000.

## ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ETICA EM PESQUISA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

### C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 228/2009 da Profª Maria de Fátima Cepa Matos, referente ao projeto de pesquisa **“Detecção do agente da febre maculosa brasileira em hospedeiros e vetores potenciais no Estado de Mato Grosso do Sul”**, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião de 23 de setembro de 2009.

Campo Grande (MS), 23 de setembro de 2009.

  
Drª Maria Araújo Teixeira  
Presidente da CEUA