

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO-UEMA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS-CCA
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

**ESTUDO SORO-EPIDEMIOLÓGICO E MOLECULAR DA INFECÇÃO POR
Rickettsia spp. EM CÃES DE AMBIENTE URBANO E RURAL NA
MESORREGIÃO DO OESTE MARANHENSE, MICRORREGIÃO DE
IMPERATRIZ, BRASIL**

Arannadia Barbosa Silva

São Luís-MA

2012

Arannadia Barbosa Silva

**ESTUDO SORO-EPIDEMIOLÓGICO E MOLECULAR DA INFECÇÃO POR
Rickettsia spp. EM CÃES DE AMBIENTE URBANO E RURAL NA
MESORREGIÃO DO OESTE MARANHENSE, MICRORREGIÃO DE
IMPERATRIZ, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Estadual do Maranhão-UEMA para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área: Medicina Veterinária Preventiva
Orientadora: Profa. Dra. Rita de Maria Seabra
Nogueira de Candanedo Guerra

São Luís

2012

Silva, Arannadia Barbosa.

Estudo soro-epidemiológico e molecular da infecção por *Rickettsia* spp. em cães do ambiente urbano e rural na mesorregião do Oeste maranhense, Microrregião de Imperatriz, Brasil / Arannadia Barbosa Silva.– São Luís, 2012.

74f

Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Rita de Maria Seabra Nogueira de Candanedo Guerra

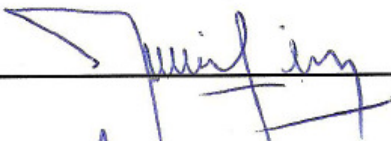
1. *Rickettsia*. 2. Sorologia. 3. Cão. 4. Vetores artrópodes. I. Título

CDU: 636.7:616.9(812.1)

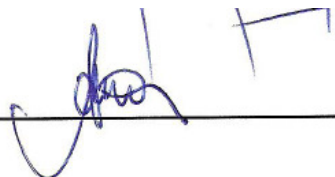
**ESTUDO SORO-EPIDEMIOLÓGICO E MOLECULAR DA INFECÇÃO POR
Rickettsia spp. EM CÃES DE AMBIENTE URBANO E RURAL NA
MESORREGIÃO DO OESTE MARANHENSE, MICRORREGIÃO DE
IMPERATRIZ, BRASIL**

Aprovada em 22/03/2012

Banca Examinadora



Prof^o Dr. José Manuel Macário Rêbello – UFMA



Prof^ª Dra. Alcina Vieira de Carvalho Neta – UEMA



Prof^ª Dra. Rita de Maria Seabra Nogueira de Candanedo Guerra – UEMA
Orientador

Aos meus pais e irmãos, com todo amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

À Deus por permitir que eu cumpra mais esta etapa.

Aos meus pais Julio e Francisca pelo amor incondicional, pelo incentivo, e por me mostrar o melhor caminho a seguir.

Aos meus irmãos (Ana Carla e Amarildo), minha sobrina, aos meus avós: Daniel Fernandes e Maria Fernandes (*in memorian*), Luís Pereira (*in memorian*) e Maria Alves; meus tios e primos. Agradeço a todos, pois são tão preciosos em minha vida.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão-UEMA pela oportunidade de ingressar neste programa.

À minha orientadora Profa. Dra. Rita de Maria Seabra pela orientação, dedicação, paciência, compreensão, amizade e incentivo durante todo o período de convivência.

Aos professores: Alcina Vieira de Carvalho Neta, Ana Lúcia Abreu Ana Clara Gomes dos Santos, Alana Lislea de Sousa, Ferdinan Almeida Melo, Helder de Moraes Pereira e Michele Oliveira pelos ensinamentos.

À minha turma de mestrado em especial: Verônica, Ermilton, Diego, Nayanna, Hallyne, Lyah e Conceição, agradeço pela convivência e pelos momentos felizes compartilhados.

Aos meus amigos Daniele Rosa, Verônica César, Milena Lopes, Leandro Macêdo, Gardel Franco, Janaira Sá, Iralberth Santos e Ermilton Freitas, agradeço pela amizade e pelo companherismo vivido durante esses anos.

Ao prof^o Antonio Exedito Ferreira do Centro de Estudo de Imperatriz/CESI/UEMA pela colaboração e disponibilidade de transporte para a realização das coletas.

Aos acadêmicos do curso de Medicina Veterinária CESI/UEMA pela ajuda nas coletas dos materiais a campo: Natanael Arruda, Ferdiman Júnior, Valber Santos, Ronilso de Souza e Alan Vilar.

À Andréa Costa e Francisco Borges pela amizade, ensinamentos e pela enorme contribuição neste trabalho durante o processamento das amostras e auxílio na análise estatística dos resultados.

Ao Prof^o Marcelo Bahia Labruna pelo auxílio na análise das amostras. Aos pós-graduandos: Jonas, Thiago, Amália, Herbert, Marcos, Vanessa, Danilo, Ricardo e Aline do Laboratório de Doenças Parasitárias/VPS/USP/FMVZ pela ajuda direta e/ou indireta no laboratório.

Aos técnicos de laboratório Renato Caravieri e Pedro pela receptividade e convivência tão harmoniosa no Laboratório de Doenças Parasitárias/VPS/USP.

As ex-secretárias do Mestrado em Ciência Animal/UEMA Caroline Romão, Laudicéia e Rosângela, agradeço pela eficiência e dedicação.

Aos meus colegas do Laboratório de Parasitologia/UEMA: Gabriel, Edvaldo, Giovane, Társia, Nathália e Francineto.

Ao João de Deus, Fátima, Bruna, Luna e Sabrina pelo acolhimento em seu âmbito familiar durante o período que estive em São Paulo.

Aos proprietários dos cães que voluntariamente permitiram as coletas de sangue nos seus animais.

Aos animais que participaram desse projeto, que, mesmo contra vontade, cederam materiais biológicos para a pesquisa.

A CAPES – Pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos que de alguma forma, mesmo com um simples "Boa Sorte", contribuíram para a concretização de mais esta etapa. MUITO OBRIGADA!!

*“A teoria ensina. Porém, a prática afere-lhe o valor.
Não basta saber.
É imprescindível utilizar o que se
conhece.”*

(Joanna de Ângelis)

RESUMO

As riquetsias são parasitos intracelulares obrigatórios responsáveis por várias doenças humanas conhecidas como riquetsioses, as quais são transmitidas através da picada de artrópodes hematófagos como carrapato, pulga e piolho. Objetivou-se estudar a prevalência da infecção por *Rickettsia* spp. em cães e em vetores biológicos de ambiente urbano e rural na Microrregião de Imperatriz, Estado Maranhão, através de técnicas sorológicas e moleculares. Foram coletados 300 soros caninos e testados frente a antígenos riquetsiais através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Foram coletados ectoparasitas dos animais infestados, e identificados de acordo com as características morfológicas, em seguida realizada extração do DNA dos carrapatos e das pulgas, e processados pela reação em cadeia polimerase (PCR) para a pesquisa do gene *gltA* e *ompA*, seguido de caracterização molecular através do sequenciamento genético. Os resultados do RIFI revelaram que 1,67% (5/300) das amostras continham anticorpos que reagiram para algum tipo de *Rickettsia*, determinou-se *R. rickettsii* e *R. amblyommii* como provável antígeno responsável pela infecção. Foram identificadas *Ctenocephalides felis*, *Heterodoxus spiniger* e *Rhipicephalus sanguineus* infestando 50% dos cães (150/300). Foram coletados 369 carrapatos da espécie *R. sanguineus*, dos quais 235 espécimes foram submetidos a PCR, revelando que nenhuma amostra foi positiva. Todas as 106 pulgas *C. felis* coletadas, foram submetidas a PCR, e 78,30% (83/106) revelaram-se positivas para pesquisa do gene *gltA*, e destas amostras 61,45% (51/83) permaneceram positivas no *ompA*. Os produtos amplificados tiveram as duas fitas do DNA seqüenciadas e apresentaram similaridade com as seqüências de nucleotídeos de *Rickettsia felis*. Estes resultados permitem concluir que a infecção por *Rickettsia* spp. ocorre em cães de ambiente urbano e rural da Microrregião de Imperatriz.

Palavras-chave: *Rickettsia*, cão, sorologia, vetores artrópodes

ABSTRACT

Rickettsiae are obligate intracellular parasites responsible for several human diseases known as rickettsial diseases, which are transmitted through the bite of arthropod vectors such as ticks, fleas and lice. Therefore, study the prevalence of infection with *Rickettsia* spp. in dogs and biological vectors of urban and rural environment in the microregion of Imperatriz, State Maranhão through serological and molecular techniques. 300 dogs sera were collected and tested against antigens rickettsiais by indirect immunofluorescence assay (IFA). Ectoparasites were collected from infected animals, and identified according to morphological characteristics, then we performed DNA extraction from ticks and fleas, and processed by polymerase chain reaction (PCR) to investigate the gene *gltA* and *ompA*, followed by characterization through molecular genetic sequencing. The results of the IFA showed that 1,67% (5/300) of the samples contained antibodies that reacted to a type of *Rickettsia*, it was determined *R. rickettsii* and *R. amblyommii* as probable antigen responsible for the infection. *Ctenocephalides felis*, *Heterodoxus spininger* and *Rhipicephalus sanguineus* were identified infesting 50% of dogs (150/300). 369 ticks *R. sanguineus* we collected, of which 235 specimens were subjected to PCR, all sample were negative. 106 fleas *C. felis* collected, of then subjected to PCR, and of these 78,30% (83/106) were positive for *gltA* gene research, and these samples 61,45% (51/83) remained positive in *ompA2*. The amplified products were the two strands of DNA sequenced and showed similarity with the nucleotide sequence of *Rickettsia felis*. The data obtained showed that infection by *Rickettsia* spp. Occurs in dogs from rural and urban environment of the microregion Imperatriz.

Key-words: *Rickettsia*, dog, serology, arthropod vectors

SUMÁRIO

1. <u>INTRODUÇÃO</u>	14
2. <u>REVISÃO DE LITERATURA</u>	18
2.1 Caracterização do agente.....	18
2.2 Epidemiologia dos agentes etiológicos da Febre Maculosa.....	19
2.3 Biologia do agente nos vetores.....	21
2.4 Biologia do agente nos hospedeiros amplificadores.....	24
2.5 Diagnóstico.....	26
3. <u>OBJETIVOS</u>	31
3.1 Objetivo Geral.....	31
3.2 Objetivos Específicos.....	31
4. <u>METODOLOGIA</u>	32
4.1 Área de estudo.....	32
4.2 Amostragem e Coleta de Sangue.....	33
4.3 Sorologia por Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	34
4.4 Coleta e Identificação dos Ectoparasitas.....	35
4.5 Pesquisa de <i>Rickettsia</i> spp. nos Carrapatos e Pulgas.....	35
4.6 Análise dos produtos amplificados.....	37
4.7 Purificação e Seqüenciamento de Nucleotídeos.....	38
4.8 Preenchimento do Questionário.....	38
4.9 Análise Estatística.....	38
5. <u>RESULTADOS</u>	39
5.1 Caracterização da população canina da microrregião Imperatriz - MA.....	39
5.2 Presença de Ectoparasitos.....	41
5.3 Imunofluorescência indireta (RIFI) para <i>Rickettsia</i> spp.....	46
5.4 PCR dos carrapatos para <i>Rickettsia</i> spp.....	51
5.5 PCR das pulgas para <i>Rickettsia</i> spp.....	52
6. <u>CONCLUSÕES</u>	55
<u>REFERÊNCIAS</u>	56
APÊNDICES	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Cães da área urbana e rural da microrregião de Imperatriz-Maranhão com acesso a rua, Março de 2011.....	40
Tabela 2-	Cães da área urbana e rural da microrregião de Imperatriz-Maranhão com contato com animais silvestres, Março de 2011.....	41
Tabela 3-	Frequência de espécies de ectoparasitos encontrados nos cães das áreas urbanas e rurais da microrregião de Imperatriz, Maranhão, Brasil, Março de 2011.....	42
Tabela 4-	Infestação por pulgas <i>Ctenocephalides felis</i> em cães da área urbana e rural da microrregião de Imperatriz, Maranhão, Brasil, Março de 2011.....	44
Tabela 5-	Frequência de cães submentidos ao controle de ectoparasitos na área urbana e rural da Microrregião de Imperatriz, Maranhão, Brasil, Março de 2011	45
Tabela 6-	Títulos de anticorpos anti- <i>Rickettsia</i> spp. através da reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), em cães da microrregião de Imperatriz, Maranhão, Brasil, Março de 2011.....	47
Tabela 7-	Distribuição da frequência das variáveis sexo, faixa etária e contato com animais silvestres em cães soropositivos para <i>Rickettsia</i> spp. da microrregião de Imperatriz , Março de 2011.....	51

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** A: Mapa do estado do Maranhão; B: localização dos Municípios de Imperatriz, Davinópolis e Governador Edison Lobão..... 33
- Figura 2-** Gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo de amostras selecionadas para sequenciamento, com produto amplificado de PCR usando os *primes* CS62 e CS462 que amplificam fragmentos do gene citrato sintase (*gltA*). CP: controle negativo. CN: controle negativo. CM: controle do mix. Amostras 12 a 94: amostras positivas para *Rickettsia* spp..... 53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SUCEN = Superintendência de Controle de Endemias

OPAS= Organização Pan-Americana da Saúde

OMS = Organização Mundial da Saúde

CDC= Centers for Disease Control and Prevention - Centros para Controle e Prevenção de Doenças

RFLP = Restriction Fragment Length Polymorfism - Restrição de polimorfismo de Comprimento de Fragmentos

DNA = *Deoxyribonucleic Acid* - Ácido Desoxirribonucléico

Taq = *Thermus aquaticus*

EDTA = ácido etileno-diamino-tetracético

TBE = tris-borato-EDTA

TE = tampão TRIS HCl-EDTA

TRIS = tris (hidroximetil) amino metano

PBS = *Phosphate Buffered Saline solution* – Solução fosfato tamponada

pb = pares de bases

DNase = *Desoxirribonuclease*

RNase = *Ribonuclease*

dNTPs= Desorribonucleotídeo trifosfatado

MgCl₂ = Cloreto de Magnésio

1 INTRODUÇÃO

Atualmente as riquetsioses mantêm caráter endêmico e estão presentes em todos os continentes (OPAS, 2004). As espécies de *Rickettsia* mantêm ciclos silvestres e enzoóticos na natureza e muitas são agentes de zoonoses transmitidas por vetores artrópodes (OPAS, 2004; CDC, 2006; SUCEN, 2010). Este caráter endêmico pode ser explicado por ações antrópicas e mudanças ambientais levando o homem a maior exposição aos fatores de risco.

Com a degradação ambiental, as relações parasitos-hospedeiros também são modificadas, levando ao desequilíbrio. O reflorestamento feito com arbustos e a prática agrícola de criar monoculturas favorecem a proliferação de artrópodes devido à formação de microclimas favoráveis, o qual gera um excelente habitat favorecendo a sobrevivência dos ixodídeos e mamíferos hospedeiros dos estádios intermediários (CARDOSO et al., 2006). Nesse contexto, os carrapatos emergem como importantes vetores de doenças entre animais domésticos, silvestres, aves e o homem. Uma vez que, o processo de urbanização de áreas antes consideradas rurais aproxima o homem e os animais domésticos ao contato com animais silvestres portadores, aumentando o risco de infecção.

Existe uma serie de agentes infecciosos pertencentes ao gênero *Rickettsia* que podem causar várias enfermidades, algumas destas apresentando quadro clínico mais severo, com risco de morte e outras sem letalidade (GALVÃO et al., 2003). A manutenção e amplificação desses agentes na natureza estão relacionadas com a capacidade de disseminação das espécies de *Rickettsia* e ao poder de dispersão e adaptação de seus vetores.

No Brasil, a doença causada por riquetsias do grupo da febre maculosa (GFM) é denominada febre maculosa brasileira (FMB), sendo causada principalmente pela bactéria *Rickettsia rickettsii*, embora já tenham sido descritos outros agentes como *Rickettsia parkeri* e *Rickettsia felis*. A bactéria *R. rickettsii*, pode causar uma doença potencialmente fatal em seres humanos e

cães (PADDOCK et al., 2002), sendo que, pode haver variação quanto à virulência dos genótipos circulantes da bactéria (PAROLA et al., 2009). Atualmente, é considerada uma zoonose reemergente no Brasil e de grande impacto para a saúde pública, em decorrência da dificuldade de diagnóstico e à alta mortalidade em casos humanos não tratados precocemente (GRECA et al., 2008).

A febre maculosa causada por *R. parkeri* caracteriza-se por uma doença de curso não grave, não havendo letalidade registrada. Tal fato tende a dificultar o diagnóstico clínico, passando despercebida em locais onde nunca fora relatada. Atualmente a febre maculosa causada por *R. parkeri* é reconhecida nos EUA e Uruguai, com suspeita de ocorrência no Brasil, onde já foi detectada e isolada em carrapatos *Amblyomma triste* e *Amblyomma dubitatum* (LABRUNA et al., 2004; SILVEIRA et al., 2007).

Dentre todos os tipos de vetores artrópodes, os carrapatos são os mais comuns na transmissão de *Rickettsia* spp. (OPAS, 2004; BRASIL, 2005; CDC, 2006; SUCEN, 2010). No Brasil, a maior incidência da febre maculosa coincide com a presença do principal vetor e reservatório, *Amblyomma cajennense*. Outras espécies estão associadas a sua transmissão como *Amblyomma aureolatum* (GUEDES et al., 2005; PINTER & LABRUNA, 2006). Estudos efetuados com *R. rickettsii* e *R. conorii* concluíram que para haver transmissão do agente etiológico, são necessárias, em média, 6 a 20 horas de parasitismo pelo artrópode. Assim, os estádios intermediários (larvas e ninfas) devido a sua pequena dimensão, passam mais facilmente despercebidos durante mais tempo (MCDADE & NEWHOUSE, 1986).

Casos humanos de riquetsiose causada por *R. felis* também já foram descritos no Estado de Minas Gerais, em 2002, sendo este agente detectado por PCR em pulgas do gênero *Ctenocephalides* (OLIVEIRA et al., 2002). Posteriormente, Horta et al. (2010) detectaram a presença de anticorpos reativos para *R. felis*, através da reação de imunofluorescência indireta em seres humanos que trabalhavam com colônias de pulgas *Ctenocephalides felis* infectadas por *R. felis*. Este fato tem grande importância epidemiológica, pois atesta o potencial das pulgas como vetores na transmissão da *R. felis*.

Ressalta-se que o gênero *Ctenocephalides* é comumente encontrado em gatos e cães em muitas regiões temperadas e tropicais, mas também infesta gambás (*Didelphis* spp.) (HORTA et al., 2007), guaxinins (*Procyon lotor*) (PUNG et al., 1994), ratos (*Rattus* spp.) e camunongos (*Mus musculus*) (LOFTIS et al., 2006), além de poder se alimentar também em humanos (MÁRQUEZ et al., 2002; KENNY et al., 2003).

De acordo com Cardoso et al. (2006) para que haja atividade riquetsial seria necessário a coexistência de uma relação de positividade entre vetores, hospedeiros e reservatórios, incluindo animais silvestres. O cão é um animal próximo do homem e pode desempenhar importante papel na epidemiologia, principalmente em áreas endêmicas. Assim, o estudo sorológico desses hospedeiros potenciais é importante, pois pode fornecer informações sobre a epidemiologia da doença.

Embora, a ocorrência de FMB já ter sido descrita em seres humanos em vários estados brasileiros, o mesmo não ocorre com a população canina. No entanto, devido à maior exposição dos cães a carrapatos vetores potenciais e à susceptibilidade à infecção por *R. rickettsii*, é possível que ocorra maior incidência da doença em cães do que em seres humanos. Possivelmente, a subnotificação da doença em cães pode ocorrer devido ao conhecimento limitado da epidemiologia da doença (FORTES et al., 2011). A partir de inquéritos sorológicos para *R. rickettsii* em hospedeiros sentinelas, sobretudo o cão, pode-se determinar novas áreas para FMB e alertar proprietários de cães onde a bactéria é endêmica (PADDOCK et al., 2002; FREITAS, 2007).

Cães sobreviventes à infecção por *R. rickettsii* são capazes de produzir anticorpos (DEMMA et al., 2006), sendo portanto, um meio viável de determinar a exposição de seres humanos a *Rickettsia* spp. (RAOULT & PAROLA, 2007). Deste modo, são considerados importantes sentinelas para a FM (BREITSCHWERDT et al., 1987; PADDOCK et al., 2002; SANGIONI et al., 2005).

Assim, ao se investigar os cães domésticos como possíveis animais envolvidos na epidemiologia da FMB, observa-se que estes animais atendem os dois primeiros quesitos para ser hospedeiro competente, como ser

abundante na área endêmica para a doença; e também ser um bom hospedeiro para o artrópode vetor em condições naturais; sendo necessário estudos para avaliar a sua susceptibilidade à infecção por *Rickettsia* spp.

No Maranhão, Costa (2011) realizou um estudo em cães na microrregião de Chapadinha, cuja prevalência encontrada para *Rickettsia* spp. foi de 18,9%, determinando-se *R. amblyommii* como provável antígeno responsável pela infecção natural, sugerindo a presença de atividade riquetsial do Grupo da Febre Maculosa, evidenciando a vulnerabilidade da região. O Maranhão não é uma área endêmica para febre maculosa, sem casos registrados de FMB em humanos, no entanto, já há relatos com notificações registradas em estados da região nordeste como Bahia (SILVA et al., 2011).

O presente estudo justifica-se, pois a mesorregião do Oeste Maranhense apresenta condições ambientais favoráveis às fases de vida dos carrapatos e das pulgas, principais vetores das riquetsioses. Além do que, pesquisas sorológicas em populações caninas são úteis para avaliar e monitorar a frequência da FMB nas diferentes regiões do país, inclusive em outras áreas deste estado, estabelecendo assim novas áreas de potencial risco para a transmissão da doença em cães e seres humanos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caracterização do agente

O gênero *Rickettsia* compreende bactérias intracelulares obrigatórias que causam várias doenças zoonóticas e são transmitidas aos humanos por vetores artrópodes que incluem pulgas, piolhos, carrapatos e ácaros. São pertencentes à ordem Rickettsiales e família Rickettsiaceae, descritos como formas cocobacilares, pequenos bastonetes ou bacilos Gram-negativos (0,3 a 0,5 µm por 0,8 a 2,0 µm). As *Rickettsias* são parasitos intracelulares obrigatórios, cujo principal alvo em animais vertebrados são as células endoteliais, nas quais o agente se multiplica, causando vasculites com a ativação de plaquetas e do sistema de coagulação (GREENE & BREITSCHWERDT, 2006). Já nos artrópodes vetores, a bactéria permanece em células intestinais, túbulos de Malpighi, hemolinfa, glândulas salivares e ovários (GIMENEZ, 1964; BURGDORFER, 1970; BILLINGS et al., 1998; YU & WALKER, 2003; RAOULT et al. 2005).

As espécies de *Rickettsia* foram recentemente divididas em quatro grupos bem definidos: o grupo da febre maculosa (GFM), grupo ancestral (GA), o grupo do tifo (GT), e o grupo de transição (GTr) (GILLESPIE et al., 2007). O GFM, maior dos grupos é composto por mais de 30 espécies válidas, dentre as quais pelo menos 14 causam diferentes doenças ao homem (*Rickettsia aeschlimannii*, *Rickettsia africae*, *Rickettsia akari*, *Rickettsia australis*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia helvética*, *Rickettsia honei*, *Rickettsia japonica*, *Rickettsia marmionii*, *Rickettsia mongolotimonae*, *Rickettsia parkeri*, *R. rickettsii*, *Rickettsia sibirica*, *Rickettsia slovaca*). Todas as outras espécies de *Rickettsia* representantes do GFM são veiculadas por carrapatos (RAOULT & ROUX, 1997; RAOULT et al., 2002; BROUQUI et al., 2004; LABRUNA, 2006; HORTA et al., 2007; PACHECO et al., 2008; PAROLA et al., 2009; LABRUNA, 2009). A *R. rickettsii* é o principal agente etiológico do GFM e o de maior patogenicidade para seres humanos e cães, sendo que pode haver variação quanto à virulência dos genótipos circulantes da bactéria (PAROLA et al., 2009).

O GA é formado pelas espécies *R. bellii* e *R. canadensis*, ambas de patogenicidade desconhecida para animais (RAOULT & ROUX, 1997). O GT contém as espécies *Rickettsia prowazekii* (agente causal do tifo epidêmico) e *Rickettsia typhi* (agente do tifo endêmico ou murino), transmitidas por piolhos e pulgas, respectivamente (EREMEEVA et al., 2000).

O GTr contém *R. felis* e *R. akari*, associadas a pulgas e a pequenos ácaros dos gêneros *Ctenocephalides* e *Allodermanyssus*, respectivamente. A *R. felis* foi reagrupada por Gillespie et al. (2007) para o grupo de transição (GTr) em função do seu genoma, que é maior em relação as outras riquetsias. A sequência do genoma de *R. felis* revelou a presença de plasmídeos (PRF) e conjugativo pili, responsável pela transferência genética.

2.2 Epidemiologia dos agentes etiológicos da Febre Maculosa

Nos últimos anos, algumas espécies de *Rickettsia* têm sido apontadas como causadoras de enfermidades muitas vezes desconhecidas ou emergentes, como *R. massiliae* na Itália (VITALE et al., 2006), *R. aeschlimannii* em Marrocos (RAOULT et al., 2002), *R. parkeri* na Virginia, EUA (PADDOCK et al., 2004) e a *Rickettsia amblyommii* na Carolina do Norte, EUA (APPERSON et al., 2008). Essas doenças têm ocorrido em várias regiões do mundo, manifestando-se de forma branda ou causando óbitos.

Nas Américas, as espécies causadoras de febre maculosa são *R. rickettsii*, *R. africae*, *R. parkeri*, *R. felis* e *R. akari*. Recentemente, outras espécies de *Rickettsia* do GFM têm sido descritas em carrapatos nas Américas, com possível associação a casos de febre maculosa em humanos ou animais (BILLETER et al., 2007; APPERSON et al., 2008; SAITO et al., 2008). A doença foi descrita em 1899, nos Estados Unidos, fazendo inúmeras vítimas desde a sua descoberta naquele país, onde já foi notificada em quase todos os estados (CDC, 2006).

A doença foi descrita no Brasil desde a década de 30 e, nos últimos anos, ganhou destaque nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e Bahia (PLANK et al., 1979; SILVA; GALVÃO, 2004;

LEMOS et al., 2001; SILVA et al., 2011) com casos fatais em seres humanos. A maior prevalência encontrada foi em Minas Gerais (LEMOS et al., 1994; CALIC, 1998) e São Paulo (MELLES et al., 1992; LEMOS et al., 1996; LEMOS et al., 2001). Em contrapartida, a doença clínica em cães foi descrita apenas recentemente no país, a partir da confirmação de FMB em dois animais procedentes do município de Itu, no estado de São Paulo (LABRUNA et al., 2009), destacando a gravidade da infecção e a dificuldade de diagnóstico na população canina.

No Brasil, no período de 1997 a 2008, foram confirmados 641 casos de febre maculosa em humanos pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2010). Devido à sua crescente importância, tornou-se de notificação compulsória em todo território nacional desde 2001, por meio da Portaria Nº 1943 de 18/10/2001 (BRASIL, 2001).

Estudos buscam melhor conhecer a epidemiologia da doença e a dinâmica do agente na natureza, através da caracterização genotípica das cepas de *Rickettsia* spp. em áreas endêmicas, da identificação das espécies de vetores e de espécies de animais que possam atuar como hospedeiros amplificadores do agente (PIRANDA et al., 2008)

Martins (2009), estudando evidências sorológicas da presença de agentes do GFM em amostras de soro de humanos, cães e eqüinos de propriedades rurais de Quirinópolis, Estado de Goiás, Brasil. Observou frequência de soropositivos na reação de Imunofluorescência indireta (RIFI), com presença de anticorpos anti-riquettsiais nas amostras de soro sanguíneo de 36,6% (15/41) humanos, 11,6% (39/335) eqüinos e 16,7% (2/12) dos cães.

Horta et al. (2010) avaliaram a infecção por *Rickettsia* spp. em colônia de pulgas *C. felis*. Na RIFI, observaram a presença de anticorpos reagentes para *R. felis* no soro sanguíneo de 87,5% dos gatos que eram regularmente usados para alimentar a colônia de pulgas. Dos humanos que trabalhavam com a colônia de pulgas 40% tinha anticorpos que reagiram positivamente para *R. felis* na RIFI.

A detecção de *Rickettsia* spp. por reação em cadeia pela polimerase (PCR) em potenciais vetores, tem sido amplamente utilizada em estudos

epidemiológicos, como Silveira et al. (2007) o qual realizaram a extração de DNA de carrapatos *A. triste* e posterior processamento pela PCR do fragmento do gene *gltA* e do fragmento do gene *ompA*. Como resultado, observaram que 9,7% (3/31) dos carrapatos estavam positivos para o gene *gltA* e *ompA*. O material amplificado para o fragmento de gene *gltA* foi submetido ao seqüenciamento automático de nucleotídeos, resultando em 100% de identidade com *R. parkeri*.

Em Minas Gerais, onde a FM é endêmica, Cardoso et al. (2006) identificaram seqüências com 100% de homologia com *R. felis* em pulgas do gênero *Ctenocephalides* e em carrapatos *A. cajennense*, utilizando a PCR.

Recentemente, Horta et al. (2010) avaliaram a infecção por *Rickettsia* spp. em colônia de pulgas *C. felis*. Os produtos da PCR das pulgas mostraram que a colônia estava 100% infectada por *R. felis*.

2.3 Biologia do agente nos vetores

Nos Estados Unidos existem oficialmente três espécies de carrapatos incriminadas na transmissão da *R. rickettsi*: *Dermacentor variabilis*, *Dermacentor andersoni* e *Rhipicephalus sanguineus* (CDC, 2006).

No Brasil, os carrapatos vetores de *Rickettsia* spp. pertencem ao gênero *Amblyomma*: *A. cajennense* (DIAS & MARTINS, 1939; SANGIONI et al., 2005; GUEDES et al., 2005), *A. aureolatum* (PINTER & LABRUNA, 2006; LABRUNA, 2009; PINTER et al., 2004). O carrapato *A. dubitatum* comum em capivaras, é indicado como possível vetor, embora isso ainda não tenha sido comprovado (SUCEN, 2010). Já foram detectados através da PCR, a infecção de *R. parkeri* em carrapatos *A. triste*, no entanto, no Brasil há raras ocorrências de *A. triste*; e ainda não se tem relatos da picada deste carrapato em seres humanos (SILVEIRA et al., 2007). Além disso, há relatos da participação do *R. sanguineus* como vetor de *R. rickettsi* (CUNHA et al., 2009; MORAES-FILHO et al., 2009).

A. cajennense, conhecido como “carrapato estrela” é o principal vetor da febre maculosa (DIAS & MARTINS, 1939). Seus estádios evolutivos de

larva, ninfa e adulto, podem transmitir a bactéria (COMER, 1991). É encontrado em abundância nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, com distribuição limitada nos demais locais (HORTA et al., 2004; SANGIONI et al., 2005). Apesar de cavalos, antas (*Tapirus terrestris*) e capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) serem os principais hospedeiros de *A. cajennense*, quando a população deste ixodídeo está aumentada, esta espécie pode se alimentar em uma ampla variedade de hospedeiros vertebrados, entre estes, o cão doméstico (LABRUNA & PEREIRA, 2001).

O *A. aureolatum*, também chamado de “carrapato-amarelo-do-cão”, é encontrado em áreas de Mata Atlântica das regiões Sul e Sudeste, onde as condições de alta umidade e temperaturas amenas predominam durante o ano todo (PINTER et al., 2004). Este carrapato também já foi indicado como possível vetor de FMB na porção leste do estado de São Paulo (MORAES-FILHO et al., 2009), sendo considerado, em alguns locais endêmicos como principal transmissor do agente a seres humanos (EVANS et al., 2000). Os canídeos, inclusive os cães domésticos, são os principais hospedeiros para os estádios adultos de *A. aureolatum* e, em ambientes rurais próximos a remanescentes de floresta tropical (EVANS et al., 2000).

O *R. sanguineus* (“carrapato-marrom-do-cão”) é o principal carrapato que parasita os cães no Brasil, principalmente em áreas urbanas (LABRUNA et al., 2004), sendo encontrado em todas as regiões brasileiras e capaz de sobreviver em ambientes fechados. Raramente são relatados parasitando seres humanos, apesar de serem comumente encontrados em ambientes domésticos (MORAES-FILHO et al., 2009).

A participação de *R. sanguineus* na epidemiologia de *R. rickettsi* no Brasil foi evidenciada pela primeira vez em uma área endêmica da região metropolitana de São Paulo (MORAES-FILHO et al., 2009). E também em uma região rural do Rio de Janeiro, onde foi relatada, pela primeira vez, a infecção natural por *R. rickettsi* em *R. sanguineus* com registros anteriores de casos humanos de FMB (CUNHA et al., 2009). Estes dois estudos mostram a possível participação dessa espécie de carrapato na transmissão da bactéria a seres humanos no Brasil.

Enfatizamos que os cães expostos a carrapatos infectados com *R. rickettsii*, podem adquirir a infecção e ainda representar um potencial risco para a transmissão humana ao carregarem os vetores para o ambiente domiciliar, possibilitando o contato do carrapato com seres humanos (EVANS et al., 2000).

Em condições laboratoriais, carrapatos infectados por uma espécie de *Rickettsia* tornam-se incapazes de manter e transmitir outras espécies de *Rickettsia* spp. (BURGDORFER et al., 1988). Nenhum carrapato foi encontrado na natureza infectado por mais de uma espécie de *Rickettsia* (LABRUNA et al., 2004). Em alguns trabalhos tem sido observado que a presença de *Rickettsia* spp. não patogênicas dentro de uma população de carrapatos pode minimizar a transmissão transovariana de uma *Rickettsia* patogênica (BURGDORFER, 1988; MACALUSO et al., 2002), o que pode explicar a baixa prevalência da infecção na população de carrapatos na natureza (PHILIP & CASPER, 1981; PINTER & LABRUNA, 2006).

As pulgas *Ctenocephalides* spp. são responsáveis por transmitir a *R. felis*. A *R. felis* foi observada pela primeira vez por Adams et al. (1990) no intestino médio das pulgas da espécie *C. felis* coletada de um gato, e confirmada mais tarde como uma nova espécie através da utilização de genótipos (BOUYER et al., 2001). Atualmente, a identificação por técnica genotípica molecular está sendo muito mais utilizada, pois permite a caracterização das espécies anteriormente não encontradas, como a *R. felis* (BOUYER et al., 2001). Embora existam dados da detecção da *R. felis*, via Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), em carrapatos (ISHIKURA et al., 2003; DUH et al., 2005; CARDOSO et al., 2006; HORTA et al., 2007) ainda não há na literatura prova científica da transmissão desta espécie ao homem por intermédio de carrapatos.

A infecção de *R. felis* é mantida por transmissão vertical (transovariana) por sucessivas gerações da pulga, sem a necessidade de um reservatório vertebrado, o que justifica a alta incidência dos agentes nesses vetores (WEDINCAMP; FOIL, 2002). Além disso, infecções por *R. typhi* e *R. felis* não são letais para seus vetores naturais, diferentemente do que acontece

com outras riquetsias, como por exemplo *R. prowazekii* (AZAD et al., 1997) e *R. rickettsii* (NIEBYLSKI; PEACOCK; SCHWAN, 1999) para piolhos e carrapatos, respectivamente.

Pulgas infectadas com *R. felis* têm sido relatados na Espanha (MÁRQUEZ et al., 2002), França (ROLAIN et al., 2005) em algumas localidades nos Estados Unidos (BOOSTROM et al., 2002), México (ZAVALA-VELÁZQUEZ et al., 2002), Peru (PACHAS et al., 2001). Além disso, casos humanos de rickettsioses causada por *R. felis* foram notificados em Portugal, Estados Unidos, França, Brasil, México, Alemanha e Tailândia (SCHRIEFER et al., 1994; RAOULT et al. 2001; RICHTER et al., 2002; PAROLA et al., 2003).

No Brasil, há relatos de pulgas infectadas por *R. felis* no estado de Minas Gerais (OLIVEIRA et al., 2002; CARDOSO et al. 2006) e São Paulo (HORTA et al., 2005; HORTA et al., 2006; HORTA et al., 2007). Além do que, a presença de anticorpos reativos para *R. felis* em humanos, já foram detectados por Horta et al. (2010) através da reação de imunofluorescência indireta.

2.4 Biologia do agente nos hospedeiros amplificadores

Sabe-se que para uma espécie animal ser um hospedeiro competente de um bioagente veiculado por artrópode ela deve ser abundante na área endêmica para a doença; ser também um bom hospedeiro para o artrópode vetor em condições naturais; ser susceptível à infecção, manter o agente em níveis plasmáticos suficientes para infectar o vetor que se alimentem nele e, finalmente ter uma alta taxa de renovação populacional (LABRUNA, 2006).

Vários gêneros de carrapatos, incluindo *Dermacentor*, *Rhipicephalus* e *Amblyomma*, são importantes reservatórios de *R. rickettsii* na natureza (BURGDORFER, 1988). Estes carrapatos desempenham esse papel devido à capacidade de transmitir a bactéria transovariamente e transestadialmente. Assim, o carrapato permanece infectado durante toda a vida e é capaz de disseminar o microorganismo para as novas gerações. Entretanto, apenas esse mecanismo não seria suficiente para manter a bactéria ativa ao longo do

tempo, uma vez que há evidências laboratoriais de que *R. rickettsii* é patogênica para o carrapato vetor (McDADE & NEWHOUSE, 1986; BURGDORFER, 1988).

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).

Na América do Norte, o efeito amplificador de algumas espécies de pequenos roedores como *Microtus pensilvanicus*, *Pitymus pinetorum*, *Peromyscus leucopus* e *Sigmodon hispidus* já foi verificado (McDADE & NEWHOUSE, 1986; BURGDORFER, 1988).

No Brasil, trabalhos realizados desde a década de 30 apontam as capivaras (*Hydrochoerus hydrochoerus*) e os gambás (*Didelphis marsupialis* Linnaeus, 1758) como amplificadores de *R. rickettsii* para *A. cajennense* (MOREIRA & MAGALHÃES, 1935; TRAVASSOS & VALLEJO, 1942; LABRUNA, 2006; HORTA et al., 2009). Além desses animais, também já foram indicados o cão doméstico (*Canis familiaris*); o cachorro do mato (*Dusicyon* sp., sin. *Canis brasiliensis*); o coelho do mato (*Sylvilagus brasiliensis*, sin. *Sylvilagus minensis*); o preá (*Cavia aperea*); e a cutia (*Dasyprocta azarae*) (MOREIRA; MAGALHÃES, 1935). Equinos são considerados excelentes animais sentinelas para a FM (SANGIONI et al., 2005), não havendo relatos de sinais clínicos, apesar de apresentar altos títulos (≥ 1024) de anticorpos contra *R. rickettsii* (LEMOS et al., 1996). O carrapato estrela (*A. cajennense*) é a principal espécie de ixodídeo que parasita esta espécie animal.

Pássaros migradores também participam da circulação de riquetsias, por transportarem os ectoparasitas infectados a grandes distâncias, causando focos pontuais de infecção em zonas não endêmicas, podendo estabelecer novos focos se os ixodídeos se adaptarem à nova área geográfica (BURGDORFER, 1975; REHACEK & TARASEVICH, 1909; NICE, 1994).

Casos humanos de febre maculosa (*R. rickettsii*) transmitida pelo carrapato *R. sanguineus* no Arizona (EUA) reergueram a hipótese de cães desempenharem o papel de hospedeiros amplificadores de *R. rickettsii*, uma vez que o cão atende os dois primeiros quesitos, como ser abundante na área endêmica para a doença; e também um bom hospedeiro para o artrópode vetor em condições naturais; além do que todos os estágios parasitários de *R. sanguineus* parasitam primariamente o cão doméstico, o qual foi possivelmente a fonte de infecção para os carrapatos *R. sanguineus* no foco endêmico do Arizona (DEMMA et al., 2006).

Piranda et al. (2006) constataram que 20% dos carrapatos *R. sanguineus* se infectaram quando alimentados em cães riquetsêmicos, sugerindo um papel amplificador deste animal em áreas endêmicas.

Os casos clínicos de infecção por *R. rickettsii* em cães tem sido descritos nos Estados Unidos, incluindo sinais como febre, letargia, anorexia, anemia e trombocitopenia (GRINDEM et al., 1999; GASSER et al., 2001). No Brasil, cães foram observados clinicamente por Piranda et al. (2008), após infecção experimental por *R. rickettsii*, e os sintomas relatados foram febre, letargia, anorexia, anemia, trombocitopenia e lesões oculares. E mais recentemente, houve o relato dos primeiros casos de infecção natural em cães provenientes do estado de São Paulo (LABRUNA et al., 2009).

2.5 Diagnóstico

No Brasil, as taxas de letalidade e mortalidade da febre maculosa giram em torno de 10-40% e 20-30%, respectivamente. Em função das dificuldades em fazer o diagnóstico e estabelecer a terapia apropriada, relacionadas ao pouco conhecimento sobre a doença e à sintomatologia pouco específica (GALVÃO et al. 2005; ANGERAMI et al., 2006; CHAPMAN et al., 2006).

O diagnóstico da febre maculosa baseia-se nos sinais e sintomas clínicos bem característicos como o aparecimento de manchas hemorrágicas (petéquias e máculas) na pele e confirmação laboratorial por meio de métodos

diretos e/ou indiretos. É fundamental associar o diagnóstico laboratorial com a situação e os antecedentes epidemiológicos da região, a procedência do caso suspeito e a época do ano, para diferenciação de outras enfermidades. O histórico de exposição a carrapatos devem ser levados em consideração, visto que são os principais transmissores da bactéria (GASSER et al., 2001).

O diagnóstico indireto é baseado em provas sorológicas, que são os métodos usuais. O diagnóstico de infecção por *R. rickettsii* em cães é realizado, geralmente, mediante a detecção de anticorpos séricos específicos pela RIFI (LA SCOLA & RAOULT, 1997). Os testes sorológicos como reação de Weil-Félix, que utiliza antígenos não riquetsiais (WHO, 1988), são de difícil reprodução pela necessidade de purificação de antígenos, diante disso são pouco utilizados (GALVÃO et al., 2005a).

A RIFI é o método padrão-ouro para a FM (WHO, 1988) é preconizado pelo Ministério da Saúde como a técnica sorológica para o diagnóstico das riquetsioses, permite a pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG. No entanto, só é possível detectar anticorpos anti-riquetsiais após a segunda semana do início da doença. Portanto, o diagnóstico definitivo poderá ser tardio em alguns casos (LA SCOLA & RAOULT, 1997). Titulação iguais ou superiores a 1:64 em única amostra, ou uma diferença de quatro vezes no título entre amostras de soro pareadas, coletadas com intervalo de duas a quatro semanas, confirmam o diagnóstico (BRASIL, 2005). Para detecção de anticorpos séricos apresenta sensibilidade de 94 a 100% e especificidade de 100% (DUMLER, 1996; CDC, 2006). Apesar de ser um teste altamente sensível, não distingue as espécies dentre os isolados, devido à possibilidade de reações cruzadas entre riquetsias do GFM (GALVÃO et al., 2005; PAROLA et al., 2005). No entanto, quando as amostras são testadas contra seu antígeno específico, o título resultante é mais elevado (PHILIP et al., 1978).

A amostra de soro ao ser submetida a baterias de testes, frente a variados antígenos de *Rickettsia* spp. as diferenças entre os títulos de anticorpos são, em alguns casos, grandes o suficiente para indicar a espécie de riquetsia que estimulou a resposta imune (PINTER et al., 2008). Ao apresentar um título final de anticorpos contra determinada espécie de

Rickettsia pelo menos quatro vezes maior que o observado para quaisquer outras espécies, considera-se o soro homólogo à primeira espécie testada ou de genótipo semelhante. Esse critério vem sendo utilizado em várias pesquisas sorológicas utilizando animais sentinelas no Brasil, para determinar o provável agente causador da infecção (HORTA et al., 2004; FREITAS et al., 2006; LABRUNA et al., 2007; PINTER et al., 2008; TAMEKUNI et al., 2008).

Os Cães que sobrevivem à infecção por *R. rickettsii* são capazes de produzir anticorpos (DEMMA et al., 2006) e, em outros países a sorologia em cães demonstrou ser um meio viável de determinar a exposição de seres humanos a *Rickettsia* spp. e prever alterações na incidência de infecções em pessoas (RAOULT & PAROLA, 2007). Assim, os cães são considerados importantes sentinelas para riquetsioses, inclusive a FMB, em seres humanos. Diante disso, a soroprevalência para *R. rickettsii* em cães de determinadas áreas geográficas se aproxima da encontrada em seres humanos (BREITSCHWERDT et al., 1987). No entanto, já existem relatos de casos de infecção em cães e seres humanos ocorrendo simultaneamente (PADDOCK et al., 2002; ELCHOS & GODDARD, 2003; ZAVALA-CASTRO et al., 2006).

Vale ressaltar que muitas infecções causadas por *R. rickettsii* são de formas subclínicas, e um elevado percentual de cães aparentemente saudáveis que vivem em áreas endêmicas é soropositivo para a doença. Contudo, após o contato com o agente, a soropositividade persiste por um bom tempo. Em uma determinada área, a presença de animais sororeagentes indica a circulação de *Rickettsia* do GFM (PIRANDA et al., 2008), mas não necessariamente, indicam uma infecção recente. Por isso destaca-se a importância do cão como sentinela para a vigilância da FMB (PADDOCK et al., 2002; SANGIONI et al., 2005).

O Diagnóstico direto foi desenvolvido para detectar diretamente a presença de riquetsias a partir de materiais provenientes de pacientes em fase aguda da infecção e, assim, obter resultados positivos precocemente. Dentre eles, destacam-se a imunodeteção da bactéria em tecidos (imunohistoquímica) ou em células endoteliais extraídas de sangue total, o isolamento em cultura de células com o sistema “shell vial” e a amplificação de

DNA riquetsial pela PCR (LA SCOLA & RAOULT, 1997) de amostras de carrapatos coletados de pacientes ou de animais reservatórios, e até mesmo de vida livre no meio ambiente (SANGIONI et al., 2005).

Para realizar o isolamento da bactéria a partir de amostras de cães suspeitos. Pode ser utilizado plasma, triturado de coágulo, biópsia de pele, tecidos de necropsia e mesmo os artrópodes (LABRUNA, 2006). O cultivo é feito em células Vero, associado ou não à técnica de “shell vial”, com a penetração do agente no interior da célula. Com o isolamento por “shell vial”, são obtidos resultados positivos durante a fase de riquetsemia, antes da soro conversão, sendo útil no diagnóstico de casos agudos (LA SCOLA & RAOULT, 1997). A desvantagem é que este procedimento pode levar algumas semanas (RAOULT & PAROLA, 2007).

As técnicas de biologia molecular usadas na detecção e identificação de riquetsias são baseadas na PCR, na PCR/RFLP que está associada à análise de polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição e sequenciamento. A PCR fornece resultados rápidos e é a prova de eleição para um diagnóstico precoce, fornecendo resultado antes da soroconversão (LA SCOLA & RAOULT, 1997).

É importante ressaltar que a detecção de *Rickettsia* spp. em sangue de animais vertebrados normalmente é rara, pois o período de riquetsemia dura apenas alguns dias ou semanas e, posteriormente, a bactéria não é mais encontrada no sangue (BURGDORFER, 1988). Em infecção experimental em cães, já foi demonstrado que o período de bacteremia da *R. rickettsii*, com a detecção do agente na PCR somente foi possível até 10 dias após infecção (KIDD et al., 2008). Além disso, *Rickettsia* spp. infectam as células endoteliais dos animais, apresentando uma concentração muito baixa no sangue, dificultando a detecção por análise molecular (LA SCOLA & RAOULT, 1997).

A detecção de *Rickettsia* spp. por PCR em espécies de carrapatos tem sido amplamente utilizada em estudos epidemiológicos ou em surtos de riquetsioses. A mesma detecção tem sido utilizada para *R. felis* em pulgas. A sequência de DNA que codifica o gene da enzima respiratória citrato sintase está presente em diversos organismos procariotos e por ser codificador de uma

enzima de grande importância fisiológica, sofre uma elevada pressão seletiva para manter-se inalterada. Os iniciadores propostos por Regnery et al. (1991) identificaram, neste gene, uma sequência específica comum a todas as bactérias do gênero *Rickettsia* sendo o gene citrato sintase (*gltA*), o mais utilizado. Para a detecção de riquetsias do GMF, foram propostos iniciadores que localizam sequências genômicas responsáveis por codificar proteínas externa de membrana, chamadas *OmpA* (*outer membrane protein A*) e *OmpB* (*outer membrane protein B*), que estão mais expostas a mutações persistentes do genoma, representando uma ferramenta para a classificação e filogenia da diferentes espécies (WEBB et al., 1990; REGNERY et al., 1991; EREMEEVA et al. 1994; LABRUNA et al., 2004; LABRUNA et al., 2005; GUEDES et al., 2005; SANGIONI et al., 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Estudar a prevalência da infecção por *Rickettsia* spp. em cães e em vetores biológicos de ambiente urbano e rural na Microrregião de Imperatriz, Estado Maranhão, através de técnicas sorológicas e moleculares.

2.2 Específicos

- Detectar a frequência de infestação de cães por ectoparasitos;
- Determinar a soro prevalência de *Rickettsia* spp. em cães no ambiente urbano e rural utilizando a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI);
- Determinar os fatores associados para infecções naturais por *Rickettsia* spp.;
- Detectar diretamente a presença de *Rickettsia* spp. em artrópodes vetores (carrapatos e pulgas), através da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).

4 METODOLOGIA

4.1 Caracterização da Região

O estudo foi realizado na microrregião de Imperatriz-MA, esta microrregião localiza-se na mesorregião do Oeste Maranhense. A microrregião de Imperatriz é formada pela união de 16 municípios. Para a realização deste estudo, foram escolhidos os municípios de Imperatriz, Davinópolis e Governador Edison Lobão (Fig. 1).

A escolha da microrregião de Imperatriz foi oportuna, visto que, estudos sorológicos sobre prevalência de anticorpos anti-*Rickettsia* spp. em hospedeiros amplificadores, sobretudo o cão, são escassos nesta microrregião. No entanto, trabalhos de mesma natureza já foram realizados em outra microrregião do estado, pelo nosso grupo de pesquisa Morfobiologia e Patogenia de Parasitos de Animais.

A microrregião de Imperatriz encontra-se numa zona de ecótono, apresenta uma vegetação variada com características tanto de cerrado como de floresta amazônica, caracterizando-se como Floresta ombrófila aberta com vegetação de transição. Diante do intenso processo de antropização, essa área apresenta em sua maioria pouca vegetação remanescente, formada por vegetação secundária, pastagem, agricultura de subsistência e monocultura de eucalipto (SANTOS, 2011).

De acordo com os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) no ano de 2010, os municípios de Imperatriz, Davinópolis e Governador Edison Lobão possuíam uma população de 275.979 habitantes, distribuída nos 2320,792 km² de área. Desse total de habitantes, 251.991 habitantes residem na área urbana e 23.998 na área rural.

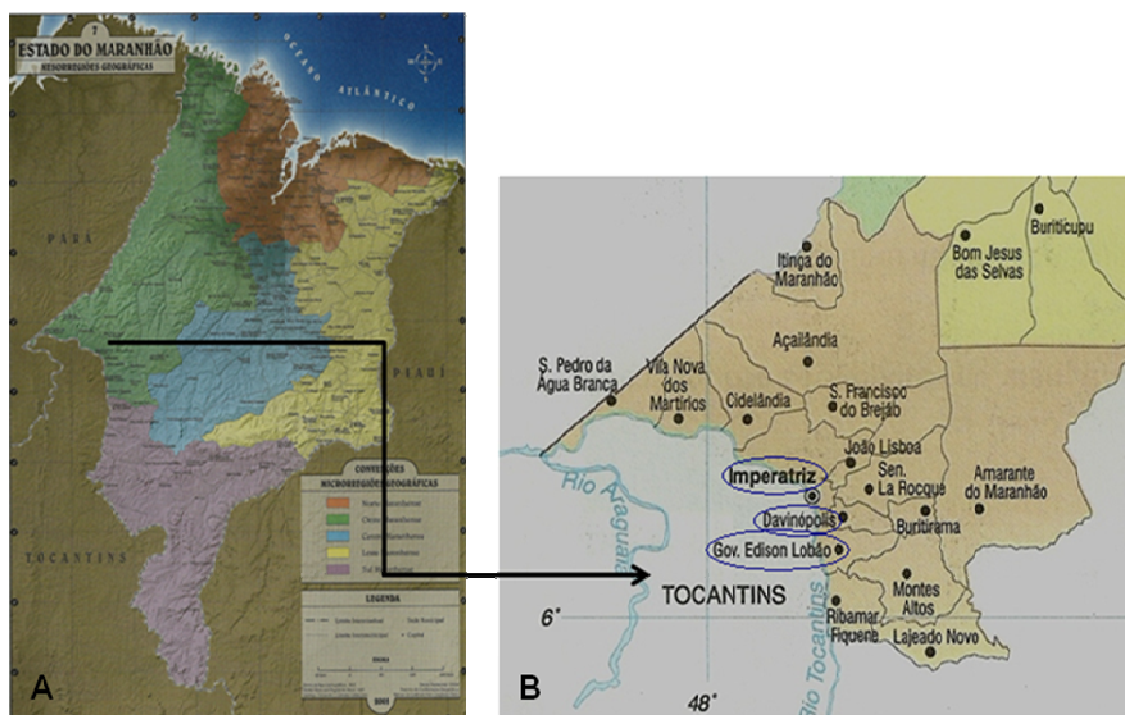


Figura 1- A: Mapa do estado do Maranhão; B: localização dos Municípios de Imperatriz, Davinópolis e Governador Edison Lobão (Atlas do Maranhão/Gerência de Planejamento e Desenvolvimento Econômico, Laboratório de Geoprocessamento-UEMA. São Luís: GEPLAN, 2002).

4.2 Amostragem e Coleta de Sangue

Foram amostrados por conveniência, 300 cães de três municípios, divididos em área urbana e rural. Sendo 100 para o município Imperatriz (50 área urbana e 50 área rural), 100 para Governador Edison Lobão (50 área urbana e 50 área rural) e 100 (50 área urbana e 50 área rural) para Davinópolis.

A escolha dos pontos de coleta dos bairros da área urbana e povoados da área rural foi baseada nas informações da receita do município e da Secretaria de Educação do município. Para a Receita Municipal e Secretaria de Educação Municipal, são considerados ambiente urbano e ambiente rural, áreas que estiverem no centro do perímetro urbano e distante dos limites do perímetro urbano, respectivamente. Este critério foi utilizado, para que não fosse geradas dúvidas sobre o tipo de área que iria ser realizada a coleta. Os cães foram escolhidos por conveniência de forma aleatória.

De cada animal foi coletado 5 mL de sangue, por meio da punção da veia cefálica ou jugular. As amostras de sangue foram centrifugadas e o soro obtido foi alíquotado em microtubos de 1,5 mL, duplicados, identificados, congelado e armazenado em temperatura de - 20°C, até a realização do RIFI.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEAA)/UEMA com parecer Nº 29/2010 (Apêndice I).

4.3 Sorologia por Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A sorologia por Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) foi realizada no Laboratório de Doenças Parasitárias da FMVZ da USP em São Paulo. Inicialmente foi realizada uma triagem para separação de soros positivos. O título de corte na triagem para o gênero *Rickettsia* é de 1:64. Os soros foram testados pela RIFI frente aos antígenos de *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyommii*, *R. rhipicephali* e *R. bellii*. Para a realização da RIFI foram preparadas as lâminas e os reagentes de acordo com a técnica proposta por Horta et al. (2004).

As lâminas foram colocadas em cuba com PBS por 10 minutos e em seguida colocadas para secar em temperatura ambiente ou estufa a 37°C. O soro foi descongelado em temperatura ambiente, e em seguida homogeneizando no vórtex. Em uma placa de diluição acrescentou-se 189 µl PBS + 3 µl da amostra, em seguida homogeneizou-se com a pipeta.

Foram gotejados 15 µl de soro em cada poço da lâmina, em seguida colocou-se em câmara úmida (placa de Petri com gaze úmida em água destilada) a 37°C por 30 minutos. Posteriormente foram lavados com piseta de solução de lavagem sem atingir os poços da lâmina, e posteriormente submetidos a duas lavagens em cuba com “washing buffer” por 10 minutos cada lavagem.

As lâminas foram colocadas em temperatura ambiente ou estufa a 37°C. Em seguida foram gotejados 15 µl de conjugado em cada poço da lâmina e colocados em câmara úmida (placa de Petri com gaze úmida em água destilada) a 37°C por 30 minutos. Posteriormente foram lavados com

piseta de solução de lavagem sem atingir os poços da lâmina, e posteriormente submetidos a duas lavagens em cuba com “washing buffer” e azul de Evan (1,5 ml) por 10 minutos cada lavagem e protegidas da luz. Em seguida as lâminas foram secas em temperatura ambiente, protegido da luz. Para leitura foram colocados glicerina pH 7,0 entre a lâmina e a lamínula e levadas ao microscópio de imunofluorescência no aumento de 40X.

Os soros reativos passaram por diluição seriada e titulação. O soro que demonstrou para uma determinada espécie de *Rickettsia* um título 4 vezes maior que para as demais espécies testadas, foi considerado homólogo para aquela espécie de *Rickettsia* (HORTA et al., 2004; LABRUNA et al., 2007).

4.4 Coleta e Identificação de Ectoparasitas

Os cães amostrados foram inspecionados quanto à presença de ectoparasitas. Os espécimes de ectoparasitas foram coletados manualmente e acondicionados em microtubos livre DNase/RNase e conservados em álcool a 70%. Cada microtubo foi etiquetado com um número correspondente ao registro do hospedeiro, anotado em fichas.

Os ixodídeos foram identificados até o gênero de acordo com as características morfológicas utilizando a chave pictórica modificada de Harry Pratt (1961). As espécies foram identificadas de acordo com a chave proposta por Aragão & Fonseca (1961). Os sifonápteros e os fitirápteros foram identificados de acordo com as chaves de identificação de Linardi & Guimarães (2000) e Furman & Catts (1970), respectivamente.

4.5 PESQUISA DE *Rickettsia* spp. NOS CARRAPATOS E PULGAS

Extração de DNA dos Carrapatos e Pulgas

De cada animal infestado por carrapatos, foram escolhidos três exemplares para a extração do DNA. Os carrapatos foram retirados do álcool e submetidos à secagem ao ambiente para total evaporação do álcool. A técnica utilizada para extração do DNA foi realizada de acordo com o protocolo Isotiocianato de Guanidina, descrito por Chomekzynski (1993), adaptado por

Sangioni et al. (2005). Para o procedimento de extração de DNA, os carrapatos foram colocados em microtubo de 1500 µL, triturados com agulha 40x12, na amostra foram adicionados 150 µl TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0) e macerados com ponteira queimada e submetidos ao vórtex por 10 segundos.

Foram adicionados 450 µl de isotiocianato de guanidina (GT) e os tubos levados para incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, com agitação a cada dois minutos e meio. Após esta etapa, foram adicionados 100 µl de clorofórmio a cada tubo, e submetidos ao vórtex por 10 segundos, posteriormente estes foram centrifugados por 5 minutos a 12000 rpm. Cerca de 400 µl do sobrenadante foram recuperados de cada tubo aos quais foram acrescentados 600 µl de isopropanol.

Os tubos foram levados ao freezer “over night” e só então foram centrifugados por 15 minutos a 4°C a 12000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e adicionados a cada tubo 800 µl de etanol a 70%, sendo novamente levados à centrifugação por 5 minutos a 4°C a 12000 rpm. Desprezou-se o sobrenadante e com o microtubo aberto, colocou-se no temobloco a 56°C por 15 minutos para que o pellet secasse. O pellet foi ressuspendido com 50 µl de TE, em seguida homogeneizado manualmente e incubado novamente, com o microtubo fechado, a 56°C por 15 minutos no termobloco. O microtubo foi armazenado a -20°C até sua utilização. O mesmo procedimento foi realizado para a extração do DNA das pulgas.

Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

O DNA extraído dos carrapatos e das pulgas foi individualmente testado para pesquisa de *Rickettsia* através da amplificação de um fragmento de 401pb do gene citrato sintase (*gltA*), presente em todas as espécies de riquetsia, utilizando-se um par de oligonucleotídeos iniciadores (“primers”), denominados de CS-62 senso (“forward”) (GCA AGT ATC GGT GAG GAT GTA AT) e CS-462 anti-senso (“reverse”) (CTT CCT TAA AAT TCA ATA AAT CAG GAT G) (LABRUNA et al., 2004). Sendo indicados como triagem por LABRUNA et al. (2004) para pesquisa de DNA de *Rickettsia*.

Amostras de pulgas positivas com esses primeiros *primers* foram testadas em novas baterias de PCRs utilizando-se um par de oligonucleotídeo iniciadores Rr190.70 (ATGGCGAATATTTCTCCAAA) e Rr190.701 (GTTCCGTTAATGGCAGCATCT) (REGNERY et al. 1991) que amplifica um fragmento 631 pb do gene da proteína externa de membrana A (*ompA2*), presentes em *R. felis* e riquetsias do Grupo da Febre Maculosa (GFM).

Todas as reações da PCR (50 µl de volume final) foram realizadas adicionando 5 µl da amostra de DNA a 25,2 µl de água ultra pura, 5,0 µl de dNTPs, 8,0 µl de Buffer, 0,3 µl de *Taq* DNA polimerase e 1,5 de MgCl₂ acrescentando-se ainda 2,5 µl de *primers* forward e 2,5 µl de *primers* reverse. As amostras foram levadas ao termociclador nas seguintes condições: para *primers* CS-62 e CS-462: desnaturação inicial a 97 °C por 2 minutos; 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos; anelamento a 64°C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos e extensão final a 72 °C por 5 minutos.

As condições de temperatura para os *primers* Rr190.70 e Rr190.701 desnaturação inicial a 97 °C por 2 minutos; 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos; anelamento a 62°C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos e extensão final a 72 °C por 5 minutos. Para cada reação, foram incluídos um controle negativo (5 µl da mesma água usada no mix) e um controle sabidamente positivo.

4.6 Análises dos produtos amplificados

Os produtos amplificados da reação de PCR foram visualizados em aparelho de eletroforese em gel de agarose a 2% (100 ml TBE 0,5%; 2,0g agarose UltraPure™ Agarose Invitrogen™), submetidos à voltagem de 100 V durante 30 minutos, coradas por brometo de etídeo e observadas em luz ultravioleta (SAMBROOK et al., 1989).

4.7 Purificação e Seqüenciamento de Nucleotídeos

Os produtos da PCR foram purificados utilizando o produto comercial ExoSAP-IT (USB Corporation) e posteriormente feito a reação de seqüenciamento com o kit comercial BigDye TM Terminator (Perkin Elmer) de acordo com especificações do fabricante. As amostras foram seqüenciadas em sequenciador automático (Applied Biosystems/PerkinElmer, Modelo ABI Prism 310 Genetic, CA, US) de acordo com as instruções do fabricante.

4.8 Preenchimento do Questionário

Antes da coleta das amostras sangüíneas e dos ectoparasitas foram preenchidos questionário (apêndice) para cada animal, visando obter informações como: sexo, idade, raça, tratamento contra ectoparasitas, acesso a rua e contato com animais silvestres

4.9 Análise Estatística

Os resultados foram analisados através de tabelas de contingências com as diferentes variáveis. A comparação dos dados foram realizadas pelo Teste Exato de Fisher, Teste Qui-Quadrado e cálculo das "*Odds Ratio*" para cada variável, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). As análises foram realizadas com o auxílio do programa computacional EpiInfo version 3.4.7.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da população canina da microrregião de Imperatriz-MA.

Os cães da área urbana e rural da microrregião de Imperatriz foram caracterizados de acordo com as variáveis: sexo, idade, raça, tratamento controle de ectoparasitas, acesso a rua e contato com animais silvestres.

Dos 300 animais amostrados, 173 cães eram machos (57,7%) (87 da área urbana e 86 da área rural) e 127 fêmeas (42,3%) (63 da área urbana e 64 da área rural). Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) em relação à proporção macho e fêmea. Estes resultados concordam com os resultados obtidos por Costa (2011) e difere dos resultados relatados por Dias et al. (2004) e Silva et al. (2010a). Possivelmente, nossos resultados justificam-se, pois, os proprietários não estão mais fazendo distinção sobre a preferência de machos e fêmeas.

Em relação à faixa etária, 19,7% (59/300) dos cães apresentavam idade inferior a 12 meses. Animais com idade entre um a três anos correspondiam a 51% (153/300) dos animais amostrados; e 88 cães (29,3%) apresentavam idade superior a três anos. No entanto, observamos uma frequência considerável nos animais com idade superior a três anos em relação a animais com idade inferior a 12 meses. Possivelmente essa maior longevidade observada em animais com idade acima de um ano, esteja relacionada às condições de criação destes cães, refletida pelos cuidados sanitários dos proprietários, visto que, 75% (225/300) dos cães tinham cobertura vacinal, contra raiva e/ou demais viroses que afetam os cães.

No que se refere à raça, observou-se que 90,67% (272/300) dos animais eram sem raça definida (SRD), 7,0% (21/300) eram da raça poodle, 1,33% (4/300) da raça Pincher, um (0,33%) Rottweiler, um (0,33%) Pastor Alemão, um (0,33%) Basset Hound.

Com relação ao hábito do animal ter acesso à rua, observou-se que na área urbana 62% (93/150) dos cães tinham acesso a rua, e 38% (57/150) não tinham acesso. Nos cães do ambiente rural 68,67% (103/150) tinham acesso livre à rua, enquanto que 31,33% não tinham. Observou-se que não houve

diferença significativa ($p > 0,05$) entre o hábito de ter acesso à rua e a área (urbana ou rural) (Tabela 1) que o animal se localizava. Estes resultados discordam dos resultados obtidos por Costa (2010) na microrregião de Chapadinha-MA. Possivelmente, nossos resultados justificam-se pela diferença quanto à forma de criação nestas duas microrregiões, onde os cães na microrregião de Imperatriz passam parte do dia presos, tendo acesso à rua e a ambientes diferentes do domicílio, mesmo que de maneira esporádica.

Tabela 1 - Cães da área urbana e rural da microrregião de Imperatriz-Maranhão com acesso a rua, Março de 2011

Área	Cães				Total	OR	IC	P
	Acesso a rua		Sem acesso a rua					
	N	%	N	%				
Urbana	93	62	57	38	150	0,74	0,45-1,23	0,2749041 ^a
Rural	103	68,67	47	31,33	150			

(a)- Teste qui- quadrado OR =Odds ratio IC- Intervalo de confiança

De acordo com o depoimento dos proprietários, no que se refere ao contato com animais silvestres, observou-se que 3,33% (5/150) dos animais na área urbana tiveram contato com animais silvestres e 21,33% (32/150) dos animais da área rural tiveram contato com animais silvestres que estavam em cativeiro e/ou na mata, mesmo que de forma esporádica. Estes resultados, quando comparados pelo teste do qui-quadrado, mostraram diferença significativa ($p < 0,05$) onde os cães da área urbana tiveram uma chance menor (OR= 0,13) de ter contato com animais silvestres em comparação com os cães da área rural, como mostra a tabela 2. Desta forma, os cães da área rural tiveram mais chances de ter contato com animais silvestres. Este contato poderia ser na própria residência, onde os animais silvestres eram mantidos em cativeiro, ou estes cães adentravam na mata com os proprietários.

Tabela 2- Cães da área urbana e rural da microrregião de Imperatriz-Maranhão com contato com animais silvestres, Março de 2011

Área	Cães				Total	OR	IC	P
	Contato com silvestres		Sem contato com silvestres					
	N	%	N	%				
Urbana	5	3,33	145	96,67	150	0,13	0,04-0,35	0,0000045 ^{a*}
Rural	32	21,33	117	78,67	150			

(a)- Teste qui- quadrado OR =Odds ratio IC- Intervalo de confiança (*) Diferença significativa

5.2 Presença de Ectoparasitos

Dos 300 cães inspecionados 150 (50%) estavam infestados por ectoparasitos, dos quais 53 (35,33%) eram da área urbana e 97 (64,67%) da área rural. Foram identificadas três espécies de ectoparasitos: *R. sanguineus*, *C. felis*, *Heterodoxus spiniger*.

A infestação por adultos de *R. sanguineus* e ninfas de *Rhipicephalus* foi 57,61% (87/150) e 4,63% (7/150) dos cães, respectivamente; seguido por *C. felis*, 20,54% (31/150) e 1,32% (2/150) dos cães estavam parasitados por *H. spiniger* (Tabela 3).

A infestação por *R. sanguineus* foi a mais freqüente sendo 24,67% (37/150) dos cães pertencentes a área urbana e 33,33% (50/150) da área rural. Foram coletados 369 carrapatos (150 machos, 168 fêmeas e 51 ninfas), seguidos por *C. felis*, com 4% (6/150) dos cães na área urbana e 16,67% (25/150) na área rural, totalizando 106 pulgas coletadas (83 fêmeas e 23 machos). Infestações por *H. spiniger* foram muito baixas, com dois espécimes machos, um em cada área (Tabela 3).

A coinfeção por carrapatos e pulgas foi observada em 13,91% (21/150) dos cães e a infestação por pulgas, carrapatos e piolhos foi observada em 0,66% (1/150) dos cães, como mostra na tabela 3.

Tabela 3 – Frequência de espécies de ectoparasitos encontrados nos cães das áreas urbanas e rurais da microrregião de Imperatriz, Maranhão, Brasil, Março de 2011

Ectoparasitos	Cães					
	Urbana		Rural		Total	
	N	%	N	%	N	%
<i>Ctenocephalides felis</i>	6	4	25	16,67	31	20,54
<i>Heterodoxus spiniger</i>	1	0,67	1	0,67	2	1,32
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	37	24,67	50	33,33	87	57,61
Ninfa de <i>Rhipicephalus</i>	4	2,67	3	2	7	4,63
<i>C. felis</i> + <i>H. spiniger</i>	1	0,67	-	-	1	0,66
<i>C. felis</i> + <i>R. sanguineus</i>	4	2,67	17	11,33	21	13,91
<i>C. felis</i> + <i>R. sanguineus</i> + <i>H. spiniger</i>	-	-	1	0,67	1	0,66
Total	53	35,33	97	64,67	150	100

R. sanguineus foi a única espécie de carrapato identificada tanto na área urbana quanto na área rural, sendo mais freqüente nos cães da área rural com 33,33% (50/150) (Tabela 3). Em estudo realizado por Shimada et al. (2003), o carrapato *R. sanguineus* foi mais associado a infestações em áreas urbanas e suburbanas. Szabó et al. (2001) observaram ocorrência de *R. sanguineus* tanto em cães de área urbanas quanto rurais. Isso pode estar relacionado ao número considerável de cães terem seus locais de repouso junto às residências dos proprietários, favorecendo assim infestações por *R. sanguineus* que apresenta hábito nidícola, gerando uma condição ecológica para um maior parasitismo nos cães por este carrapato, mesmo que este cão esteja em ambiente rural.

Estes resultados discordam dos encontrados por Costa (2010) na área rural da microrregião de Capadonha-MA, na qual foram identificados carrapatos *R. sanguineus*, *A. cajennense*, *A. ovale* e ninfa de *Amblyomma* sp. Diferindo também dos resultados encontrados por Szabó et al. (2010), que identificaram carrapatos da área urbana e rural de Uberlândia- MG, e encontraram *R. sanguineus* e *A. cajennense* parasitando cães de área urbana e rural e *A.*

ovale, ninfas e larvas de *Amblyomma* sp. e ninfas de *Boophilus microplus*, em cães de área rural. Essa diferença de resultados pode ser atribuída à diferença entre biomas, uma vez que a microrregião de Imperatriz encontra-se numa zona de ecótono, cuja vegetação é variada, que devido ao intenso processo de antropização, apresenta pouca vegetação remanescente, formada por vegetação secundária (SANTOS, 2011), e possivelmente, pouca presença de áreas de mata, conseqüentemente menor diversidade de carrapatos.

O *R. sanguineus* é um carrapato que tem estreita relação com o cão doméstico (SZABÓ et al., 2005). Esta espécie é responsável por infestações em áreas urbanas, o que concorda com trabalhos já descritos (SZABÓ et al., 2001; SZABÓ et al., 2010). Guerra & Brito (2004) também descreveram infestações por esta espécie de carrapato na cidade de São Luís – MA. Este carrapato é descrito no Brasil como um importante transmissor de patógenos como a *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli*, *Hepatozoon canis* e *Mycoplasma haemocanis* a cães. Além disso, há suspeitas de transmissão de *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi*, *Babesia gibsoni*, *Rangelia vitalli* e *R. rickettsii* (DANTAS-TORRES, 2008).

O único gênero de pulicídeo identificado foi *Ctenocephalides*, verificando-se a presença da espécie *C. felis* em cães da área urbana e rural, no entanto, os cães da área rural estavam mais infestados, com 16,67% (25/150) (Tabela 4). Estes resultados, quando comparados pelo teste do qui-quadrado, mostraram diferença significativa ($p < 0,05$) onde os animais da área urbana tiveram menos chance de serem infestados por pulgas em comparação com os animais da área rural, como mostra a tabela 4. Desta forma, pode-se inferir que os animais que se encontravam na área rural tiveram mais chance de serem parasitados por pulgas *C. felis*.

Tabela 4 - Infestação por pulgas *Ctenocephalides felis* em cães da área urbana e rural da microrregião de Imperatriz, Maranhão, Brasil, Março de 2011

Área	Cães				Total	OR	IC	P
	Presença de <i>Ctenocephalides felis</i>		Ausência de <i>Ctenocephalides felis</i>					
	N	%	N	%				
Urbana	6	4	144	96	150	0,21	0,07-0,56	0,0006399 ^{a*}
Rural	25	16,67	125	83,33	150			

(a)- Teste qui- quadrado OR =Odds ratio IC- Intervalo de confiança (*) Associação significativa

Em outros estudos realizados no Brasil *C. felis* também foi a única espécie encontrada (RODRIGUES et al., 2001, RODRIGUES et al., 2008). Neste estudo, observou-se que o parasitismo por pulgas foram mais freqüentes em cães da área rural. Provavelmente, isso pode estar relacionado com a proximidade do cão doméstico com animais silvestres, mesmo que de forma esporádica (AZAD e tal. 1997; LINARDI & GUIMARÃES, 2000). Esse dado acaba sendo preocupante, visto que vários agentes transmitidos pelas pulgas são mantidos em um ciclo zoonótico que envolvem mamíferos silvestres como hospedeiros naturais. Desta forma, esses vetores acabam sendo trazidos para o interior das residências por animais domésticos.

Dentre as 2000 espécies e sub-espécies de pulgas existentes no mundo, apenas algumas atuam como vetores de doenças em humanos, tais como a peste bubônica ou peste negra (*Yersinia pestis*) e tifo murino (*R. typhi*) cujo vetor é *Xenopsylla cheopis*. Outra doença importante transmitidas por pulgas é riquetsiose causada por *R. felis*, sendo transmitida pela *C. felis*.

Na microrregião de Imperatriz as infestações por *H. spiniger* foram baixas, resultados semelhantes foram observados por Torres & Figueredo (2007) na qual registraram infestação por *H. spiniger* em cães domésticos com baixa prevalência em Recife-PE. No entanto, estes resultados diferem aos observados por LOBO et al. (2002) no Estado de Pernambuco, onde realizaram um estudo em áreas urbanas e rurais, e *Trichodectes canis* foi a única espécie de piolho coletada nos cães.

Quanto ao tipo de infestações observou-se que 82,67% (124/150) dos cães tinham infestações simples e 17,33% (26/150) mistas. No que se refere área, 35,34% (53/150) dos cães era provenientes da área urbana (45 cães com infestações simples e 8 com mistas) e 64,66% (97/150) da área rural (79 cães com infestações simples e 18 com mistas). Diante destes resultados, observamos que o cão da área rural está mais sujeito ao parasitismo pela as infestações simples e mistas, em comparação aos cães da área urbana. Isso pode está relacionado com a forma de criação, uma vez que os proprietários da área urbana são mais conscientes quanto ao controle de ectoparasitos, em comparação aos cães da área rural.

Com relação ao animal controle contra ectoparasitos, observou-se que 66,67% (100/150) dos animais da área urbana e 43,33% (85/150) dos animais da área rural, receberam algum tratamento para ectoparasitas. Estes resultados, quando comparados pelo teste do qui-quadrado, verificou-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$), onde os animais da área urbana eram mais submetidos ao controle contra ectoparasitas do que os animais da área rural (Tabela 5). Possivelmente, este maior controle de ectoparasitos em cães da área urbana, esteja relacionado ao maior acesso à informação e a questão econômica dos proprietários, que acaba refletindo num maior cuidado com seu cão.

Tabela 5 - Frequência de cães submetidos ao controle de ectoparasitos na área urbana e rural da Microrregião de Imperatriz, Maranhão, Brasil, Março de 2011

Área	Cães				Total	OR	IC	P
	Controle N	%	Não controle N	%				
Urbana	100	66,67	50	33,33	150	2.62	1,59-4,30	0,0000795 ^{a*}
Rural	65	43,33	85	56,67	150			

(a)- Teste qui- quadrado (*) Diferença significativa OR =Odds ratio IC- Intervalo de confiança

5.3 Imunofluorescência indireta (RIFI) para *Rickettsia* spp.

Das 300 amostras testadas pela RIFI para *Rickettsia* spp., 1,67% (5/300) reagiram para alguma espécie de *Rickettsia*. Ao se considerar a utilização de antígenos de diferentes espécies, os animais mostraram-se reagentes para *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyommii* e *R. rhipicephali*. Nenhuma amostra de soro apresentou qualquer título para os antígenos de *R. bellii*. Conforme interpretações previamente padronizadas por Labruna et al. (2007), para uma espécie ser homóloga a uma dada espécie de *Rickettsia* o título por ela apresentado deve ser pelo menos quatro vezes maior que o título mais alto obtido para as demais espécies, diante disso, determinou-se *R. rickettsii* como provável antígeno responsável pela infecção natural em uma amostra de soro, com titulações que variaram de 1: 64 à 1: 512; e *R. amblyommii* como provável antígeno em outras duas amostras de soro com titulações que variaram de 1: 64 à 1: 128, como mostra tabela 6. No entanto, a presença de animais sororeagentes em uma determinada área, indica a circulação de *Rickettsia* do GFM pelo menos nos últimos 6 a 12 meses (PIRANDA et al., 2008) mas não necessariamente indicam uma infecção recente.

O estado do Maranhão é considerado uma área não endêmica para FMB, sem casos humanos registrados. Os resultados sorológicos encontrados neste estudo foram condizentes com dados já descritos em áreas consideradas não endêmicas. Como os resultados observados por Silva et al. (2010) em Belo Horizonte, com soro prevalência de 0,66% encontrada em cães. Cardoso et al. (2006) reavaliou o foco peri-urbano de Caratinga aparentemente silencioso para FMB, estado Minas Gerais, nenhum dos soros dos cães analisados apresentou resultado positivo na RIFI.

Contudo, estes dados diferem dos resultados encontrados por Costa (2010), em outra microrregião do estado do Maranhão, cuja soroprevalência encontrada foi de 18,9% (61/322), e *R. amblyommii* o provável antígeno responsável pela infecção natural, naquela região. Labruna et al. (2007), encontraram uma prevalência em cães da área rural de 11,6% (19/164) e 3,9%

(6/153) na área urbana de Monte Negro, Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira.

Tabela 6 - Títulos de anticorpos anti-*Rickettsia* spp. através da reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), em cães da microrregião de Imperatriz, Maranhão, Brasil, Março de 2011

Títulos finais de reatividade para antígenos de <i>Rickettsia</i> spp							
Soro de Cão	Localidade	<i>R. rickettsii</i>	<i>R. parkeri</i>	<i>R. amblyommii</i>	<i>R. rhipicephali</i>	<i>R. bellii</i>	Antígeno provável
62	ITZ/ Rural	NR	NR	256	512	NR	
83	ITZ / Rural	512	128	NR	NR	NR	<i>R. rickettsii</i>
195	DAV/ Rural	NR	NR	128	NR	NR	<i>R. amblyommii</i>
198	DAV / Rural	NR	NR	256	256	NR	
241	DAV/ Urbana	NR	NR	128	NR	NR	<i>R. amblyommii</i>

ITZ= Imperatriz; DAV= Davinópolis

No Brasil, os cães vem sendo indicados como importantes animais sentinelas da situação epidemiológica da FM em regiões endêmicas (BREITSCHWERDT et al., 1987; PADDOK K et al., 2002; SANGIONI et al., 2005). Estudos de prevalência de anticorpos anti-*Rickettsia* do GFM em cães de área endêmica registraram resultados que variam entre 4% a 69,6% nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Espírito Santo (SEXTON et al., 1933; LEMOS et al., 1994; LEMOS et al., 1996; GALVÃO et al., 2002; HORTA et al., 2004; PINTER et al., 2008).

Em relação aos três municípios estudados, dos cinco animais soropositivos na microrregião de Imperatriz, observou-se que três animais (1%) eram do município de Davinópolis e os outros dois animais (0,67%) do município de Imperatriz. Não foi observado nenhum animal soropositivo o município de Governador Edison Lobão. Pelo pequeno número de amostras positivas, não foi possível verificar diferença estatística entre os municípios.

No município de Davinópolis, dos 100 cães testados por RIFI para as cinco espécies de *Rickettsia*, 3% (3/100) foram reagentes para alguma espécie. Destes, só foi possível indicar *R. amblyommii* como provável antígeno responsável pela resposta imune em dois animais, uma vez que, estes animais reagiram soro-específico para esta espécie, sem reagir para as demais. O outro animal apresentou anticorpos que reagiram de forma cruzada para *R. amblyommii* e *R. rhipicephali*, baseando-se nos estudos de Labruna et al. (2007), não foi possível indicar um provável antígeno causador da resposta imune (Tabela 6).

No município de Imperatriz, de um total de 100 cães testados pela RIFI para cinco espécies de *Rickettsia*, 2% (2/100) dos animais apresentaram soros que reagiram para algum tipo de *Rickettsia*. Destes, um animal reagiu para *R. rickettsii* e *R. parkeri* (Tabela 6). Conforme interpretações previamente padronizadas (Labruna et al., 2007), determinou-se *R. rickettsii* como provável antígeno responsável pela infecção natural neste cão. Uma vez que o título de anticorpos (512) para essa espécie foi quatro vezes superior ao título para outra espécie (128 para *R. parkeri*). Para o outro soro reagente, não foi possível determinar qual espécie foi responsável pela resposta imune, pois este animal apresentou anticorpos que reagiram de forma cruzada para *R. amblyommii* e *R. rhipicephali* (Tabela 6).

No inquérito sorológico realizado na microrregião de Imperatriz, cinco cães apresentaram-se soros reagentes para *Rickettsia* spp., destes, dois animais tinham evidências sorológicas de infecção por *R. amblyommii* ou uma espécie geneticamente relacionada. No entanto, os outros dois animais reagentes também tiveram títulos compatíveis com *R. amblyommii*, sugerindo que esta espécie de *Rickettsia* esteja circulando na microrregião de Imperatriz, o que concorda com os resultados de Costa (2011) em outra microrregião do estado do Maranhão, que também determinou *R. amblyommii* como provável antígeno responsável pela infecção natural naquela região. Diante disso, pode-se inferir que houve contato entre os cães e as bactérias do GFM ou microrganismo antigenicamente semelhante, e que os cães, são sentinelas

eficientes para a infecção por *R. amblyommii*, ainda que se desconheça a patogenicidade desta bactéria para esta espécie animal.

Em estudos sorológicos realizados em Monte Negro, Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira, por Labruna et al. (2007) determinaram a ocorrência de pelo menos três espécies de *Rickettsia* acometendo cães nesta região: *R. parkeri*, *R. Amblyommii* e *R. rhipicephali*. Igualmente a Rondônia, a microrregião de Imperatriz faz parte da Amazônia legal, pois localiza-se em uma zona de ecótono, com características tanto de cerrado como de floresta amazônica.

Apesar da baixa prevalência de anticorpos anti-*R. rickettsii* em cães encontrados neste estudo, a presença de *R. rickettsii* como provável antígeno responsável pela infecção natural em um cão, possivelmente seja um foco pontual. No entanto, sugere a circulação de *Rickettsias* patogênicas neste local, visto que, este animal apenas apresentou títulos compatíveis com *R. rickettsii* e *R. parkeri*, não apresentando títulos para as demais espécies. Na literatura, existem relatos de casos de infecção por *R. rickettsia* em cães e seres humanos ocorrendo simultaneamente (PADDOCK et al., 2002; ELCHOS & GODDARD, 2003; ZAVALA-CASTRO et al., 2006). Entretanto, para que se confirme atividade riquetsial local, se faz necessário maiores estudos nesta área, pois de acordo com Magnarelli et al. (1981) deve haver uma correlação entre positividade nos vetores, hospedeiros e reservatórios, incluindo animais silvestres.

As reações específicas de amostras de soro canino contra *R. rickettsii* e *R. amblyommii* são de grande importância para a epidemiologia da doença no estado do Maranhão. De acordo com Silva et al. (2010) os cães são animais próximos dos humanos e podem desempenhar importante papel na cadeia epidemiológica da febre maculosa, uma vez que, estes animais podem disseminar carrapatos infectados para áreas próximas ao domicílio. Além do que, uma outra forma que permite a exposição ao agente, seja o hábito dos proprietários removerem os ectoparasitos de seus animais de estimação com as mãos (SPENCER & PARKER, 1930; PADDOCK et al., 2002). O *R. sanguineus* é principal carrapato de cães no Brasil, sendo a única espécie de

carrapato identificada neste estudo. Esta espécie de carrapato já demonstrou capacidade vetorial para *R. rickettsii* em áreas endêmicas de São Paulo (MORAES-FILHO et al., 2009) e Rio de Janeiro (CUNHA et al., 2009). Essas informações revestem a importância de trabalhos dessa natureza, pois muitas regiões do Brasil reúnem condições epidemiológicas, como a presença do (s) vetor (es), que proporcionam potencial biótico para a ocorrência da doença.

No que se refere à área da coleta 0,67% (1/150) dos cães soropositivos eram provenientes de área urbana e 2,67% (4/150) da área rural. Estes resultados, quando comparados pelo teste exato de Fisher, verificou-se não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre a soropositividade e a área coletada. Estes resultados diferem dos resultados encontrados por Costa (2011), na qual verificaram que os animais da área rural tiveram uma chance maior de se infectar com *Rickettsia* spp. em comparação aos animais da área urbana. Possivelmente, esta diferença de resultados esteja relacionada ao número pequeno de amostras positivas encontradas neste estudo.

Não foi observada diferença significativa entre a presença de anticorpos anti-*Rickettsia* spp. com as variáveis sexo e faixa etária (Tabela 7) sugerindo que essas variáveis não constituem fatores de risco para a infecção, concordando Saito et al. (2008) e Costa (2011).

Com relação ao contato com animais silvestres, observou-se que os cães que tiveram contato com animais silvestres, tiveram mais chance (OR= 31,76) de adquirir infecção por *Rickettsia* em relação aos que não tiveram contato direto (Tabela 7). Esses resultados concordam com Saito et al. (2008) e Costa (2011) que também encontraram diferença significativa entre animais soropositivos para *Rickettsia* e cães que são usados para pastoreio ou caça tendo, portanto, contato com animais silvestres, estes dados sugerem que o possível vetor de *Rickettsia* spp. esteja presente em áreas rurais, contribuindo para que esta bactéria esteja sendo mantida em um ciclo silvestre.

Tabela 7 - Distribuição da frequência das variáveis sexo, faixa etária e contato com animais silvestres em cães soropositivos para *Rickettsia* spp. da microrregião de Imperatriz, Março de 2011

Variável	Reagente		Não reagente		Total	OR	IC	P	
	N	%	N	%					
Sexo	M	3	1,73	170	98,27	173	1,10	0,15-9,58	0,6424382 ^(a)
	F	2	1,57	125	98,43	127			
Faixa etária	< 1 ano	1	1,69	58		59	0,64	0,03-6,29	0,5727155 ^(a)
	1 - 3 anos	4	2,61	149	97,39	153			
	> 3 anos	-	-	-	-	88			
Contato com animais silvestres	Sim	4	10,81	33	89,19	37	31,76	3,19-769,47	0,0009093 ^{a*}
	Não	1	0,38	262	99,62	263			

(M) machos (F) fêmeas (a) Exato de Fisher (*) Associação significativa OR=Odds ratio IC= Intervalo de Confiança

5.4 PCR dos carrapatos para *Rickettsia* spp.

Dos 369 carrapatos *R. sanguineus* identificados, 235 espécimes foram submetidas a PCR para pesquisa do gene *gltA*, revelando que nenhuma amostra foi positiva. Estes resultados concordam com resultados obtidos por Costa (2011) na microrregião de Chapadinha, que não observou amostras positivas para a pesquisa do gene *gltA* em amostras de *R. sanguineus*. Contudo, Costa (2011) em amostra de *A. ovale* observou que a mesma estava positiva para a pesquisa do gene *gltA* e *ompA*, que após o sequenciamento apresentou similaridade com as sequências de nucleotídeos de *R. bellii*.

No Brasil, o *R. sanguineus* tem sido relatado infectado com *R. felis* num foco peri-urbano que aparentemente estava silencioso em Caratinga, Minas Gerais (CARDOSO et al., 2006); e também infectado com *R. rickettsii* em áreas endêmicas de São Paulo e Rio de Janeiro (MORAES-FILHO et al., 2009; CUNHA et al., 2009).

Diversos estudos tem sido realizados com várias espécies de carrapatos no Brasil, nos quais houve isolamento ou caracterização de espécies patogênicas de *Rickettsia*: *A. cajennense* infectado com *R. felis* (SANGIONI et al., 2005) e com *R. rickettsii* (GUEDES et. al., 2005), *A. triste* infectado com *R. pakeri* (SILVEIRA et al., 2007), *A. aureolatum* infectado com *R. rickettsii* (PINTER & LABRUNA, 2006).

5.5 PCR das pulgas para *Rickettsia* spp.

Dos 300 animais amostrados, foram coletados 106 pulgas *C. felis*, e todas foram individualmente submetidas a PCR. Destas, 78,30% (83/106) estavam positivas para pesquisa do gene *gltA*, e quando testadas para o gene *ompA2*, 38,55% (31/83) estavam negativas e 61,45% (51/83) revelaram-se positivas.

Das 51 amostras positivas no *ompA2*, 11,77% (6/51) eram provenientes da área urbana e 88,23% (45/51) eram da área rural. Destas 51 amostras, foram escolhidas 17 amostras para sequenciamento, baseando-se no critério de maior intensidade da banda (Fig. 2). Todos os produtos amplificados tiveram as duas fitas do DNA sequenciadas e apresentaram similaridade com as seqüências de nucleotídeos de *R. felis*.

Vale ressaltar que 31 amostras (38,55%) foram positivas para pesquisa do gene *gltA* e negativas para o *ompA2*. Os resultados deste estudo revelaram a presença de outra espécie de *Rickettsia* além de *R. felis*, provavelmente, pertencente a (aos) outro(s) grupo(s) de riquetsia ou até mesmo uma espécie ainda não descrita.

Este é primeiro relato da presença de *R. felis* em pulgas *C. felis* no Estado do Maranhão e no nordeste Brasileiro, através do seqüenciamento genético, visto que, *R. felis* só tinha sido relatada infectando pulgas do gênero Ctenocephalides em áreas endêmicas para a febre maculosa nos estados de Minas Gerais e São Paulo (OLIVEIRA et al., 2002, HORTA et al., 2005, HORTA et al., 2007).

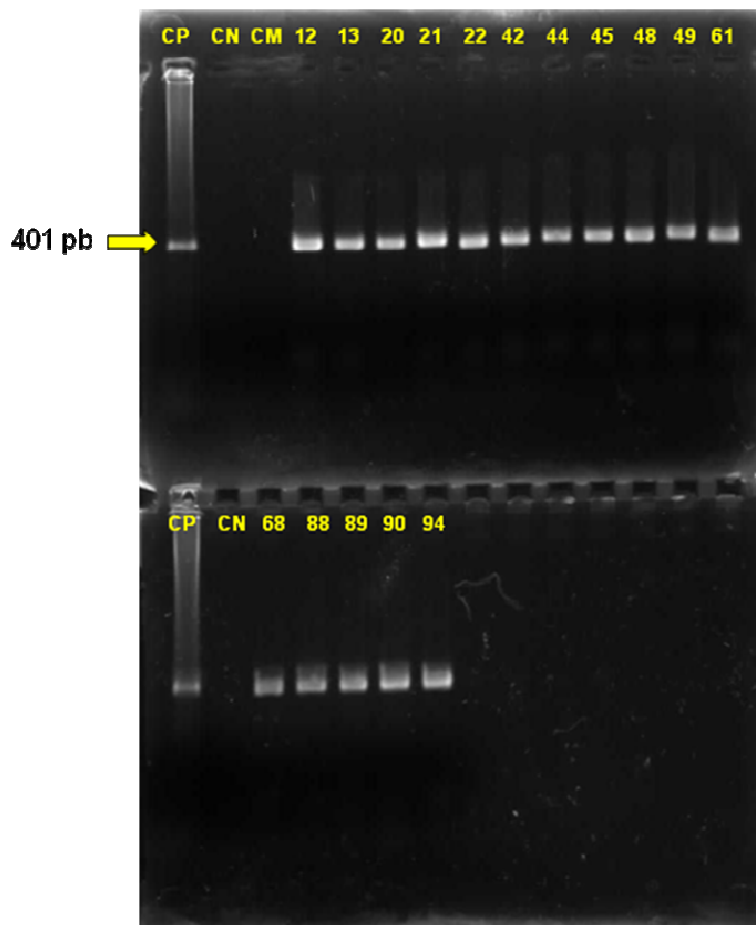


Figura 2: Gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo de amostras selecionadas para sequenciamento, com produto amplificado de PCR usando os *primers* CS62 e CS462 que amplificam fragmentos do gene citrato sintase (*gltA*). CP: controle negativo. CN: controle negativo. CM: controle do mix. Amostras 12 a 94: amostras positivas para *Rickettsia* spp.

A transmissão transovariana implica em um importante mecanismo de manutenção da *R. felis* na natureza por sucessivas gerações, visto que a *R. felis* não é patogênica para o seu vetor (WEDINCAMP & FOIL, 2002), o que pode justificar a alta frequência encontrada neste estudo (61,45%). O mesmo foi relatado por Horta et al. (2006), que observaram uma prevalência de infecção por *R. felis* em 70,8% de *C. felis* e 29,2% de *Ctenocephalides canis*, coletadas de cães em aldeias indígenas situadas no município de São Paulo.

Observamos uma maior frequência (88,23%) de pulgas positivas para *R. felis* nos cães coletados na área rural, provavelmente, os animais da área rural estivessem mais infestados por pulgas em comparação aos animais

da área urbana. No entanto, de acordo com AZAD et al. (1997) não deve ser descartada a possibilidade de que vários agentes transmitidos pelas pulgas são mantidos em um ciclo zoonótico que envolvem mamíferos silvestres como hospedeiros naturais. Esses vetores são trazidos para o interior das residências por animais domésticos. Sendo este, principal motivo de preocupação, principalmente quando há diminuição populacional dos hospedeiros naturais, fazendo com que as pulgas passem a procurar outras fontes de alimento, como por exemplo, o homem, que passa a ser um hospedeiro acidental.

Horta et al., (2007) verificou associação significativa entre pulgas infectadas por *R. felis* e áreas com a presença de casos confirmados de febre maculosa, estas pulgas tinham sido coletadas de cães e gambás. Em estudos semelhantes, verificou-se a presença de *R. felis* em carrapatos *Haemaphysalis flava*, *Haemaphysalis kitasatoe* e *Ixodes ovatus* no Japão (ISHIKURA et al., 2003), em *Haemaphysalis sulcata* na Croácia (DUH et al., 2005), *R. sanguineus* (CARDOSO et al., 2006) e em larvas e ninfas de *Amblyomma* sp. e *Ixodes loricatus* no Brasil (HORTA et al., 2007).

A ocorrência de pulgas *C. felis* infectadas com *R. felis*, detectadas por meio de PCR, evidenciam a importância epidemiológica desta espécie para a microrregião de Imperatriz. Os dados aqui apresentados dão suporte aos trabalhos anteriores (OLIVEIRA et al., 2002, HORTA et al., 2005, HORTA et al., 2007), comprovando que a presença de *R. felis* em pulgas *C. felis*, reforça a hipótese sobre a potencial participação destes artrópodes no ciclo desta riquetsia, necessitando de mais estudos sobre a capacidade e competência vetorial destes artrópodes, visto que, o agente e o vetor encontram-se amplamente distribuídos no país.

6 CONCLUSÕES

No presente estudo foi possível concluir que:

- Os cães da Microrregião de Imperatriz apresentaram parasitismo por *Rhipicephalus sanguineus*, *Ctenocephalides felis*, *Heterodoxus spiniger*.
- Cães residentes em áreas urbana e rural da microrregião de Imperatriz-MA apresentaram-se soro reagentes para antígenos de *Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia amblyommii*.
- O contato com animais silvestres constitui um fator de risco para a infecção natural em cães por *Rickettsia* spp.
- O sequenciamento do fragmento da PCR amplificado, baseada no gene *gltA* confirmou pela primeira vez a detecção de *Rickettsia felis* em pulgas *C. felis* coletadas de cães da Microrregião de Imperatriz- MA.

REFERÊNCIAS

ADAMS, J.R.; SCHMIDTMAN, E.T.; AZAD, A.F. Infection of colonized cat fleas *Ctenocephalides felis* (Bouché) with a *Rickettsia*-like microorganism. **Am JTrop Med Hyg**, v.43, p.400-409, 1990.

ANGERAMI, R.N., RESENDE, M.R., FELTRIN, A.F., KATZ, G., NASCIMENTO, E.M., STUCCHI, R.S., SILVA, L.J. Brazilian spotted fever: a case series from an endemic area in Southeastern Brazil: clinical aspects. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1078, p. 252-254, 2006.

ARAGÃO, H.; FONSECA, F. Notas de ixodologia. VIII Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.59, n.2, p.115-129, 1961.

APPERSON, C.S.; ENGBER, B.; NICHOLSON, W.L.; MEAD, D.G.; ENGEL, J.; YABSLEY, M.J.; DAIL, K.; JOHNSON, J.; WATSON, D.W. Tick-Borne Diseases in North Carolina: Is "*Rickettsia amblyommi*" a Possible Cause of Rickettsiosis Reported as Rocky Mountain Spotted Fever. **Vector-Borne and Zoon Dis**, v.8, n.5, p.597-606, 2008.

AZAD, A. F.; RADULOVIC, S.; HIGGINS, J. A.; NODEN, B. H.; TROYER, J. M. Fleaborne Rickettsioses: ecologic considerations. **Emerg Infect Diseases**, v. 3, n. 3, p. 319-327, 1997.

BILLETER, S.A.; BLANTON, H.L.; LITTLE, S.E. *et al.* Detection of "*Rickettsia amblyommi*" in association with a tick bite rash. **Vector-Borne Zoo Dis**, v.7, n.4, p.607-610, 2007.

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. **J of Med Entomol**, n.35, p.474-8, 1998.

BOOSTROM, A.; BEIER, M.S.; MACALUSO, J.A. *et al.* Geographic association of *Rickettsia felis*-infected opossums with human murine typhus, Texas. **Emerg. Infect. Dis.**, v.8, p.549-554, 2002.

BOUYER, D.H.; STENOS, J.; VALDES, P.C. *et al.* *Rickettsia felis*: Molecular characterization of a new member of the spotted fever group. **Int J Syst Evolut Microbiol**, v.51, p.339-347, 2001.

BRASIL. Portaria Nº. 1943/GM, de 18/10/2001. Define a relação de doenças de notificação compulsória para todo território nacional. Ministério da Saúde. Brasília: **DOU**, n. 204, seção 1, pág.35, de 24 de outubro de 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 6ed. Brasília: Ministério da Saúde, 816p, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Casos confirmados de Febre maculosa. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas**. 1997 a 2008*.

Disponível em:

<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_conf_febre_maculosa.pdf>. Acesso em: 21 jul. 2010.

BREITSCHWERDT, E. B.; MONCOL, D. J.; CORBETT, W. T.; MacCORMACK, J. N.; BURGDORFER, W.; LEVY, M. G. Antibodies to spotted fever-group rickettsiae in dogs in North Carolina. **Am J Vet Res**, v. 48, n. 10, p. 1436-1440, 1987.

BROUQUI, P. F.; BACELAR, F.; BARATON, G. BIRTLES, R.J.; BJOERSDORFF, A.; BLANCO, J. R.; CARUSO, G.; CINCO, M.; FOURNIER, P. E.; FRANCAVILLA, E.; MAURIN, M.; OTEO, J. A.; PAROLA, P. PEREZ-EID, C., PETER, O.; POSTIC, D.; RAOUT, D. TELLEZ, A., TSELENTIS, Y., WILSKE, B. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. **Clin Microbiol Infect**, v.10, n. 12, p.1108-1132, 2004.

BURGDORFER, W. A review of Rocky Mountain spotted fever (tickborne typhus), its agent, and its tick vectors in the United States. **J Med Entomol**, v. 12, n.3, p.269-272, 1975.

BURGDORFER, W. **Ecological and epidemiological considerations of Rocky Mountain spotted fever and scrubs typhus**. In: WALKER, D. H. (Ed.). *Biology of Rickettsial Diseases*, Boca Raton, FL: CRC Press, 1988. p. 33-50.

BURGDORFER, W. The hemolinf test. **Am J Trop Med Hyg**, v.19, n.6, p. 1010-1014,1970.

CALIC, S. B.; GALVÃO, M. A. M.; CHAMONE, C. B. **Inquérito sorológico para febre maculosa em Belo Horizonte, Minas Gerais no ano de 1997**. In:

CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 34, 1998, Manaus. *Anais...* Manaus, 1998, p. 34.

CARDOSO, L. D.; FREITAS, R. N.; MAFRA, C. L.; NEVES, C. V. B.; FIGUEIRA, F. C. B.; LABRUNA, M. B.; GENNARI, S. M.; WALKER, D. H.; GALVÃO, M. A. M. Caracterização de *Rickettsia* spp. circulante em foco silencioso de febre maculosa brasileira no Município de Caratinga, Minas Gerais, Brasil. **Cad Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.22, n.3, p.495-501, 2006.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Diagnosis and Management of Tickborne Rickettsial Diseases: Rocky Mountain Spotted Fever, Ehrlichioses, and Anaplasmosis - United States; a practical guide for physicians and other health-care and public health professionals. **Morb Mort Week Rep**, CDC, Atlanta, GA. v.55, n.RR-4, 36p, 2006.

CHAPMAN, A. S.; MURPHY, S. M.; DEMMA, L. J.; HOLMAN, R. C.; CURNS, A. T.; M.C.; QUISTON, J. H.; KREBS, J.W.; SWERDLOW, D. L.; Rocky Mountain spotted fever in the United States, 1997-2002. **Ann N Y Acad Sci**, v.1078, p.154-155. 2006.

CHOMEKZYNSK, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **BioTechniques**, v. 153, n. 3, p. 532-537, 1993.

COMER, M. K. Rocky mountain spotted fever. **Vet Clin North Am**, v. 21, n. 1, p. 27-44, 1991.

COSTA, A. P. Aspectos epidemiológicos da infecção por *Ehrlichia*, *Babesia* e *Rickettsia* em cães de ambiente urbano e rural da mesorregião do Leste Maranhense, microrregião de Chapadinha, estado do Maranhão. 2011. 104p. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 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. **Pesq Vet Bras**, v. 29, n. 2, p. 105-108, 2009.

DANTAS-TORRES, F., The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Vet Parasitol**, v.152, p. 173–185, 2008.

DEMMA, L. J.; EREMEEVA, M. E.; NICHOLSON, C. D.; TRAEGER, M. S.; BLAU, D. M.; PADDOCK, C. D.; LEVIN, M. L.; DASCH, G. A.; CHEEK, J. E.; SWERDLOW, D. L.; McQUISTON, J. H. An outbreak of Rocky Mountain Spotted Fever associated with a novel tick vector, *Rhipicephalus sanguineus*, in Arizona, 2004: preliminary report. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1078, p. 342-343, 2006.

DIAS, E.; MARTINS A.V. Spotted fever in Brazil: a summary. **Am J Trop Med** v.19, p.103-8, 1939.

DIAS, R.A.; GARCIA, R.C.; SILVA, D.F. et al. Estimativa de populações canina e felina domiciliadas em zona urbana do Estado de São Paulo. **Rev Saúde Pública**, v.8, p.565-570, 2004.

DUH, D.; PUNDA-POLIC, V.; PETROVEC, M.; TRILAR, T.; BRADARIC, N.; AVSICZUPANA, T. Molecular identification of flea-transmitted *Rickettsia felis*-like bacteria in *Haemaphysalis sulcata* ticks collected from domestic animals in southern Croatia. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON RICKETTSIAE AND RICKETTSIAL DISEASES, 4, 2005, Logroño, Espanha. **Anais...** res. P-123.

DUMLER, J.S. Laboratory diagnosis of Rickettsial and Ehrlichial infections. **Clin Microbiol News**, v.15, p.57-60, 1996.

ELCHOS, B. N.; GODDARD, J. Implications of presumptive fatal Rocky Mountain spotted fever in two dogs and their owner. **J Am Vet Med Assoc**, v. 223, n. 10, p. 1450-1452, 2003.

EREMEEVA, M. E.; DASCH, G. A.; SILVERMAN, D. J. Interaction of rickettsiae with eukaryotic cells: Adhesion, entry, intracellular growth, and host cell responses. **Sub Cell Bioch**, v. 33, p. 479-516, 2000.

EREMEEVA, M. E.; YU, X.; RAOULT, D. Differentiation among Spotted Fever Group *Rickettsiae* species by analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR amplified DNA. **J Clin Microbiol**, v. 32, n. 3, p. 803-810, 1994.

EVANS, D. E.; MARTINS, J. R.; GUGLIELMONE, A. A. A review of the ticks (Acari, Ixodida) of Brazil, their hosts and geographic distribution. 1. The State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 4, p. 453-470, 2000.

FORTES F. S.; BIONDO A. W.; MOLENTO M. B. Febre maculosa brasileira em cães. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 32, n. 1, p. 339-354, jan./mar. 2011

FURMAN, D.P.; CATTS, E.P. **Manual of Medical Entomology**. Mayfield Publication Company. California: 163p. 1977.

FREITAS, M. O. Detecção de Rickettsias do grupo febre maculosa em cães e eqüinos em São José dos Pinhais, PR. 2007. 95f. **Dissertação**. (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

FREITAS, M. O.; MOLENTO, M. B.; LABRUNA, M. B.; SILVEIRA, I.; BIONDO, A. W. Pesquisa de anticorpos específicos anti-*rickettsia rickettsii* em cavalos carroceiros em São José dos Pinhais, PR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 14.; SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 2., 2006, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: CBPV, 2006. p. 361.

GALVÃO, M. A.; LAMOUNIER, J. A.; BONOMO, E.; TROPIA, M. S.; REZENDE, E. G.; CALIC, S. B.; CHAMONE, C. B.; MACHADO, M. C.; OTONI, M. E.; LEITE, R. C.; CARAM, C.; MAFRA, C. L.; WALKER, D. H. Rickettsioses emergentes e reemergentes numa região endêmica do Estado de Minas Gerais, Brazil. **Cad Saúde Pública**, v. 18, n. 6, p. 1593-1597, 2002.

GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C. L.; MORON, C.; ANAYA, E.; WALKER, D. H. Rickettsiosis of Genus *Rickettsia* in South America. **Ann NY Acad Sci**, v. 990, p. 57-61, 2003.

GALVÃO, M. A.; SILVA, L. J.; NASCIMENTO, E. M.; CALIC, S. B.; SOUSA, R.; BACELLAR, F. Rickettsial diseases in Brazil and Portugal: occurrence, distribution and diagnosis. **Rev Saude Publica**, v.39,p. 850-85, 2005.

GALVÃO, M. A. M., SILVA, L. J., NASCIMENTO, E. M. M., CALIC, SIMONE, B., SOUSA, R.; BACELLAR, F. Rickettsial diseases in Brazil and Portugal: occurrence, distribution and diagnosis. **Rev. Saúde Pública**, v.39, n.5, p. 850-856, 2005a.

GASSER, A. M.; BIRKENHEUER, A. J.; BREITSCHWERDT, E. B. Canine Rocky Mountain spotted fever: a retrospective study of 30 cases. **J Am Anim Hosp Assoc**, v. 37, n. 1, p. 41-48, 2001.

GEPLAN, 2002. Atlas do Maranhão/Gerência de Planejamento e Desenvolvimento Econômico, Laboratório de Geoprocessamento-UEMA. São Luís-MA

GILLESPIE, J. J.; BEIER, M. S.; RAHMAN, M. S.; AMMERMAN, N. C.; SHALLOM, J. M.; PURKAYASTHA, A.; SOBRAL, B. S.; AZAD, A. F. Plasmids and rickettsial evolution: insight from *Rickettsia felis*. **PLoS One**, v. 2, n. 3, p. 266, 2007.

GIMÉNEZ, D.F. Staining rickettsiae in yolksac cultures. **Stain Techn.**, v.39, p.135-140,1964.

GRECA, H.; LANGONI, H.; SOUZA, L. C. Brazilian spotted fever: a reemergent zoonosis. **J Venom Anim & Tox Includ Trop Dis**, v. 14, n. 1, p. 3-18, 2008.

GREENE, C. E.; BREITSCHWERDT, E. B. **Rocky Mountain spotted fever, murine typhus-like disease, rickettsialpox, typhus, and Q Fever**. In: GREENE, C. E. Infectious Diseases of the Dog and Cat. 3rd ed., St Louis: Saunders Elsevier, 2006. p. 232-245.

GRINDEM, C. B.; BREITSCHWERDT, E. B.; PERKINS, P. C.; CULLINS, L. D.; THOMAS, T. J.; HEGARTY, B. C. Platelet-associated immunoglobulin (antiplatelet antibody) in canine Rocky Mountain spotted fever and ehrlichiosis. **J Am Anim Hosp Assoc**, v. 35, p. 56-61, 1999.

GUEDES, E.; LEITE, R. C.; PRATA, M. C. A.; PACHECO, R. C.; WALKER, D. H.; LABRUNA, M. B. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 841-845, 2005.

GUERRA, R. M. S. N. C.; BRITO, D. R. B. Ixodofauna de mamíferos domésticos da Ilha de São Luís, estado do Maranhão, Brasil. **Entom y Vect**, v. 11, n. 3, p. 435-444, 2004.

HORTA, M.C.; LABRUNA, M.A.; SANGIONI, L.A. VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C. L.; VIDOTTO, O.; SCHUMAKER, T. T. S.; WALKER, D. H. Prevalence of antibodies to Spotted Fever Group Rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian Spotted Fever-Endemic area in the State of São Paulo, Brazil: Serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group Rickettsia. **Am J Trop Med Hyg**, v.71, p.93-7, 2004.

HORTA, M. C.; PINTER, A.; CORTEZ, A.; SOARES, R. M.; GENNARI, S. M.; SCHUMAKER, T. T. S.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia felis* (Rickettsiales:Rickettsiaceae) in *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae) in the State of São Paulo, Brazil. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v. 57, n. 3, p. 321-325, 2005.

HORTA, M. C.; LABRUNA, M. B.; DURIGON, E. L.; SCHUMAKER, T. T. S. Isolation and Cultivation of *Rickettsia felis* in the mosquito cell line C6/36. **App Environ Microb**, v. 72, n. 2, p. 1705-1707, 2006.

HORTA, M. C.; LABRUNA, M. B.; PINTER, A.; LINARDI, P. M.; SCHUMAKER, T. T. S. *Rickettsia* infection in five areas of the state of São Paulo. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.102, n. 7, p. 793–801, 2007.

HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; CASAGRANDE, R. A.; SAITO, T. B.; ROSA, S. C.; OGRZEWALSKA, M.; MATUSHIMA, E. R.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of opossums *Didelphis aurita* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. **Vector-Borne and Zoon Dis**, v. 9, n. 1, p. 109-118, 2009.

HORTA M. C.; SCOTT F. B.; CORREIA T. R.; FERNANDES J. I.; RICHTZENHAIN L. J. ; LABRUNA M. B.. *Rickettsia felis* infection in cat fleas *Ctenocephalides felis felis*. Brazilian. **J Microbiol**, v.41, n.3, p. 813-818, 2010.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), **Censo demográfico**, 2010. Disponivel no site:

<<http://www.censo2010.ibge.gov.br/sinopse/index.php?dados=27&uf=21>>
Acesso em 12 Jan. 2012.

ISHIKURA, M.; ANDO, S.; SHINAGAWA, Y.; MATSUURA, K.; HASEGAWA, S.; NAKAYAMA, T.; FUJITA, H.; WATANABE, M. Phylogenetic analysis of spotted fever group Rickettsiae based on *gltA*, 17-kDa, and *rOmpA* genes Amplified by nested PCR from ticks in Japan. **Microbiol Immunol**, v. 47, n. 11, p. 823-832, 2003.

KENNY, M. J; BIRTLES, R. J.; DAY, M.J.; SHAW, S. E. *Rickettsia felis* in the United Kingdom. **Emerg Infect Dis**, v.9, p.1023-1024, 2003.

KIDD, L.; MAGGI, R.; DINIZ, P. P.; HEGARTY, B.; TUCKER, M.; BREITSCHWERDT, E. Evaluation of conventional and real-time PCR assays for detection and differentiation of spotted fever group *Rickettsia* in dog blood. **Vet Microbiol**, v. 129, n. 3/4, p. 294-303, 2008.

LABRUNA, M.B. Epidemiologia da Febre Maculosa no Brasil e nas Américas. In: I SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ACAROLOGIA, 2006, Viçosa-MG. **ANAIS...Viçosa: 2006**, p.63-78.

LABRUNA, M.B. Ecology of *Rickettsia* in South America. Rickettsiology and Rickettsial Diseases-Fifth International Conference: **N Y Acad Sci**, 11p. 2009.

LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; TERRASSINI, F. A.; FERREIRA, F.; SCHUMAKER, T. T. S.; CAMARGO, E.P. Ticks (Acari: Ixodidae) from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. **Syst Appl Acarol**, n.10, p.17-32, 2005.

LABRUNA, M.B.; HORTA, M.C.; AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.T.; PINTER, A.; GENNARI, S.M.; CAMARGO, L.M.A. Prevalence of *Rickettsia* Infection in Dogs from the Urban and Rural Areas of Monte Negro Municipality, Western Amazon, Brazil. **Vector-Borne and Zoon Dis**, v.7, n.2, p.249-255, 2007.

LABRUNA, M. B.; KAMAKURA, O.; MORAES-FILHO, J.; HORTA, M.C.; PACHECO, R. C. **Emerg Infect Diseases**, v. 15, n. 3, p. 458-460, 2009.

LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C. Carrapato em cães no Brasil. **Clin Vet**, v. 6, n. 30, p. 24-32, 2001.

LABRUNA, M.B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M.C.; BOUYER, D.H.; MCBRIDE, J.W.; PINTER, A.; POPOV, V.; GENNARY, 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. **J Clin Microbiol**, v.42, n.01, p.90-98, 2004.

LA SCOLA, B.; RAOULT, D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. **J Clin Microbiol**, v. 35, n. 11, p. 2715-2727, 1997.

LEMONS, E. R. S.; MACHADO, R. D.; COURA, J. R. Rocky Mountain spotted fever in an endemic área in Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 4, p. 497-501, 1994.

LEMONS, E. R. S.; MACHADO, R. D.; COURA, J. R.; GUIMARÃES, M. A. A.; CHAGAS, N. Epidemiological aspects of the Brazilian spotted fever: serological survey of dogs and horses in an endemic area in the state of São Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 38, n. 6, p. 427-430, 1996.

LEMONS, 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. **Am J Trop Med Hyg**, v.65, n. 4, p.329–334. 2001.

LINARDI, P. M.; GUIMARÃES, L. R. **Sifonápteros do Brasil**. São Paulo: Museu de Zoologia USP/FAPESP, 2000. 291p.

LOBO, A. P.; BOTÊLHO, M. C. N.; ANDERLINI, G. A.; CAVALCANTI, M. D. B.; OLIVEIRA, J. B. Ectoparasitos em cães de áreas urbanas e rurais do Estado de Pernambuco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 12., Rio de Janeiro, 2002. **Anais...** Rio de Janeiro: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2002.

LOFTIS, A. D.; REEVES, W. K; SZUMLAS, D. E; ABBASSY, M.M.; HELMY, I. M.; MORIARITY, J.R. Surveillance of Egyptian fleas for agents of public health significance: *Anaplasma*, *Bartonella*, *Coxiella*, *Ehrlichia*, *Rickettsia*, and *Yersinia pestis*. **Am J Trop Med Hyg**, v.75, p.41–48, 2006.

MACALUSO, K.R.; SONESHINE, D.E.; CERAUL, S.M. Rickettsial infection in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) inhibits transovarial transmission of a second rickettsia. **J Med Entomol.**, v.39, n.6, p.809-813, 2002.

MAGNARELLI, L. A.; ANDERSON, J. F.; PHILIP, R. N.; BURGDORFER, W.; CASPER, E. A. Endemicity of spotted fever group rickettsiae in Connecticut. **Am J Trop Med Hyg**, v. 30, n.239,p.52, 1981.

McDADE, J. E.; NEWHOUSE, V. F. Natural history of *Rickettsia rickettsii*. **Annu Rev Microbiol**, v. 40, p. 287-309, 1986

MÁRQUEZ, F. J.; MUNIAIN, M. A.; PÉREZ, J. M.; PACHÓN, J. Presence of *Rickettsia felis* in the cat flea form southwestern Europe. **Emerg Infect Dis**, v. 8, p.89-91, 2002.

MARTINS, M. E. P. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA FEBRE MACULOSA NO MUNICÍPIO DE QUIRINÓPOLIS, GOIÁS, BRASIL. 2009. 108f.**Tese** (Doutorado em Ciência Animal) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2009.

MELLES, H. H. B.; COLOMBO, S.; SILVA, M. V. Febre maculosa: isolamento de Rickettsia em amostra de biópsia de pele. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 34, p. 37-41, 1992.

MORAES-FILHO, J.; PINTER, A.; PACHECO, R. C.; GUTMANN, T. B.; BARBOSA, S. O.; GONZÁLES, M. A. R. M.; MURARO, M. A.; CECÍLIO, S. R. M.; LABRUNA, M. B. New epidemiological data on brazilian spotted fever in an endemic area of the State of São Paulo, Brazil. **Vector-Borne and Zoon Dis**, v. 9, n. 1, p. 73-78, 2009.

MOREIRA, J. A.; MAGALHAES, O. Typho exanthematico em Minas Gerais. **Brasil-Medico**, v. 21, p. 465-470, 1935.

NICE, C. S. The dissemination of human infectious diseases by birds. **Rev Med Microbiol**, v.5, n.3, p.191-198, 1994.

NIEBYLSKI, M. L.; PEACOCK, M. G.; SCHWAN, T. G. Lethal effect of *Rickettsia rickettsii* on its tick vector (*Dermacentor andersoni*). **Appl Environm Microbiol**, v. 65, n. 2, p. 773-338, 1999.

OLIVEIRA, R. P.; GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C. L.; CHAMONE, C. B.; CALIC, S. B.; SILVA, S. U.; WALKER, D. H. *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides* spp fleas, Brazil. **Emerg Infect Diseases**, v. 8, n. 3, p. 317-319, 2002.

OPAS - **Organização Pan-Americana da Saúde. Organização Mundial da Saúde.** Consulta de especialistas OPAS/OMS sobre rickettsioses nas Américas - Relatório Final. Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil, 18 - 19 de setembro de 2004. Disponível no site: <<http://bvs.panaftosa.org.br/textoc/Reuniao-rickett-port-rev.pdf>> Acesso em 20 JUL 2010.

PACHAS, P.; MORON, C.; HOYOS, A. *Rickettsia felis* identified in *Ctenocephalides canis* fleas from the Peruvian Andes. In: American Society for Rickettsiology - *Bartonella* as an emerging pathogen group – 2001, Joint Conference, Big Sky, Montana, USA, 2001.

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. **Rev M V Z Córdoba**, v. 13, n. 2, p.1273-1279, 2008.

PADDOCK, C. D.; BRENNER, O.; VAID, C.; BOYD, D. B.; BERG, J. M.; JOSEPH, R. J.; ZAKI, S. R.; CHILDS, J. E. Short report: concurrent Rocky Mountain spotted fever in a dog and its owner. **Am JTrop Med Hyg**, v. 66, n. 2, p. 197-199, 2002.

PADDOCK, C.D.; SUMMER, J.W.; COMER, J.A. et al. *Rickettsia parkeri*: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. **Clin Infect Dis**, v.38, p.805-11, 2004.

PAROLA, P.; LABRUNA, M. B.; RAOULT, D. Tick-Borne Rickettsioses in America: Unanswered Questions and Emerging Diseases. **Cur Infec Dis Rep**, v.11, p.40-50, 2009.

PAROLA, P.; PADDOCK, C. D.; RAOULT, D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, n. 4, p. 719-756, 2005.

PAROLA, P.; SANOGO, O. Y.; LERDTHUSNEE, K.; ZEAITER, Z.; CHAUVANCY, G.; GONZALEZ, J. P.; MILLER, R. S.; TELFORD III, S. R.; WONGSRICHANALAI, C.; RAOULT, D. Identification of *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. in fleas from the Thai-Myanmar border. **Ann N Y Acad Sci**, v. 990, p. 173-181, 2003.

PHILIP, R. N.; CASPER, E. A. Serotypes of spotted fever group rickettsiae isolated from *Dermacentor andersoni* (Stiles) ticks in Western Montana. **Am JTrop Med Hyg**, v. 230-238, 1981.

PHILIP, R. N.; CASPER, E. A.; BURGDORFER, W.; GERLOFF, R. K.; HUGHES, L. E.; BELL, E. J.; Serologic typing of *Rickettsiae* of the spotted fever group by microimmunofluorescence. **J Immunol**, v. 121, n. 5, p. 1961-1968, 1978.

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

PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Ann NY Acad Sci**, v. 1078, p. 523-529, 2006.

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

PIRANDA, E. M.; FACCINI, J. L.; PINTER, A.; SAITO, T. B.; PACHECO, R. C.; HAGIWARA, M. K.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical and laboratory findings. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 7, p. 696-701, 2008.

PIRANDA, E. M.; PINTER, A.; PACHECO, R. C.; FACCINI, J. L. H.; LABRUNA, M. B. Avaliação preliminar do cão doméstico como fonte de infecção por *Rickettsia rickettsii* para carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* Laitreille, 1806 (Acari: Ixodidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA; 14., SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 2., 2006, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: CBPV, 2006. p. 366-366.

PLANK, S.J. TEIXEIRA, R.S.; MILANESI, M.L. Febre maculosa em Salvador: descrição de um caso. **Rev Med Bahia**. v.25, p.330-4, 1979.

PRATT, HARRY D. **Chave pictórica para identificação de gêneros de carrapatos adultos do Brasil, Modificada de Harry Pratt** (Departamento of Health, Education and Welfare, Public Health Service-CDC Atlanta, 1961).

PUNG OJ, DURDEN LA, BANKS CW, JONES DN. Ectoparasites of opossums and raccoons in Southeastern Georgia. **J Med Entomol**, v. 31, p.15–19,1994.

RAOULT, D.; FOURNIER, P. E.; ABOUD, P.;CARON, F. First documented human *Rickettsia aeschlimannii* infection. **Emerg Infect Dis**, v. 8, n. 7, p. 748-749, 2002.

RAOULT, D.; LA-SCOLA, B.; ENEA, M.; FOURNIER, P. E.; ROUX, V.; FENOLLAR, F.; GALVÃO, M. A. M.; LAMBALLERIE, X. D. A flea-associated *Rickettsia* pathogenic for humans. **Emerg Infect Dis**, v. 7, n. 1, p. 73-81, 2001.

RAOULT, D.; PAROLA, P. ***Rickettsial diseases***. New York, London: CRC Press, 2007.

RAOULT, D.; PAROLA, P.; PADDOCK, C. D. Tick-bourne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. **Am Soc Microbiol**, v. 18, n. 4, p. 719-756, 2005.

RAOULT, D.; ROUX, V. Rickettsioses as paradigms of news or emerging infectious diseases. **Clin Microbiol Rev**, v. 10, n. 4, p. 694-719, 1997.

REHACEK, J.; TARASEVICH I.V. Ecological questions concerning Rickettsiaae. *European Journal of Epidemiology*. v.7, n.3, p.229-236. 1991
RICKETTS, H.T. Some aspects of Rocky Mountain spotted fever as shown by recent investigations. **Medical Record**. v.76, p. 843-855, 1909.

REGNERY, R.L.; SPRUILL, C.L.; PLIKAYTIS B.D. et al. Genotypic identification of Rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. **J Bacteriol**, v.173, p.1576-1589, 1991.

RICHTER, J.; FOURNIER, P. E.; PETRIDOU, J.; HAUSSINGER, D.; RAOULT, D. *Rickettsia felis* infection acquired in Europe and documented by Polymerase Chain Reaction. **Emerg Infect Dis**, v. 8, n. 2, p. 207-208, 2002.

ROLAIN, J. M.; BOURRY, O.; DAVOUST, B.; RAOULT, D. *Bartonella Quintana* and *Rickettsia felis* in Gabon. **Emerg Infect Dis**, v. 11, n. 11, p. 1742-1744, 2005.

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. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 17, n. 4, p.185-188, 2008.

RODRIGUEZ, A. F. S. F.; DAEMON, E.; D'AGOSTO, M. Investigação sobre alguns ectoparasitos em cães de rua no município de Juiz de Fora, Minas Gerais. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 10, n. 1, p. 13-19, 2001.

SAITO, T. B.; CUNHA-FILHO, N. A.; PACHECO, R. C. Canine infection by *Rickettsiae* and *Ehrlichiae* in southern Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v. 79, p. 102-108, 2008.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory Manual**. 2. Ed. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANGIONI, L. A.; HORTA, M. C.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. M.; GALVÃO, M. A. M.; SCHUMAKER, T. T. S.; FERREIRA, F.; VIDOTTO, O.; LABRUNA, M. B. *Rickettsial* infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. **Emerg Infect Dis**, v. 11, n. 2, p. 265-270, 2005.

SANTOS, J. P. Geomorfologia em Sub-Bacia Hidrográfica. Disponível no site <http://www.geo.ufv.br/simposio/simposio/trabalhos/resumos_expandidos/eixo3/019.pdf> Acesso em: 24 Nov. 2011.

SCHRIEFER, M. E.; SACCI-JR; J. B.; DUMLER, J. S.; BULLEN, M. G.; AZAD, A. F. Identification of a novel *Rickettsial* infection in a patient diagnosed with murine typhus. **J Clin Microbiol**, v. 32, p. 949-954, 1994.

SEXTON, D. J.; MUNIZ, M.; COREY, G. R.; BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARDTY, B. C.; DUMLER, S.; WALKER, D. H.; PECANHA, P. M.; DIETZE, R. Brazilian spotted fever in Espirito Santo, Brazil: description of a focus of infection in a new endemic region. **Am J Trop Med Hyg**, v. 49, n. 2, p. 222-226, 1993.

SHIMADA, Y.; BEPPU, T.; INOKUMA, H.; OKUDA, M.; ONISHI, T. Ixodid tick species recovered from domestic dogs in Japan. **Med Vet Entomol**, v. 17, n. 1, p. 38-45, 2003.

SILVA, L.J.; GALVÃO, M.A.M. Epidemiologia das rickettsioses do gênero *Rickettsia* no Brasil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v.13, supl.1, p.197-8, 2004.

SILVA, N.; EREMEEVA, M. E.; ROZENTAL, T.; RIBEIRO, G. S; PADDOCK, C. D.; RAMOS, E. A. G.; FAVACHO, A. R.M.; REIS, M. G.; DASCH, G. A.; LEMOS, E. R.S.; KO, A. I. Eschar-associated Spotted Fever Rickettsiosis, Bahia, Brazil. **Emerg Infect Diseases**, v. 17, n. 2, 2011.

SILVA, M.E.; RIBEIRO, R.R.; COSTA J.O.; MORAES-FILHO, J.; PACHECO, R.C.; LABRUNA M.B. Prevalência de anticorpos anti-*Rickettsia* spp. em cães da cidade de Belo Horizonte, MG. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.62, n.4, p.1007-1010, 2010.

SILVA, M. H. S.; SILVA, J. A.; MAGALHÃES, D. F.; SILVA, M. X.; MENESES, J. N. C.; MOREIRA, E. C. Caracterização demográfica e epidemiológica de cães e gatos domiciliados em Barbacena, MG. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.62, n.4, p.1002-1006, 2010a.

SILVEIRA, I.; PACHECO, R. C.; SZABÓ, M. P. J.; RAMOS, H. G. C.; LABRUNA, M.B. *Rickettsia parkeri* in Brazil. **Emerg Infect Diseases**, v. 13, n. 7, p. 1111-1113, 2007.

SPENCER, R. R.; PARKER, R. R. Infection by means other than ticks bites. **Hygienic Lab Bull**, v. 154: p. 60-63, 1930.

SUCEN. Superintendência de Controle de Endemias-SP. **Febre Maculosa**: informações para profissionais da saúde. Disponível no site: <<http://www.sucen.sp.gov.br>> Acesso em 20 JUL 2010.

SZABÓ, M. P. J.; CUNHA, T. M. PINTER, A.; VICENTINI, F. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil, **Exp Appl Acarol**, v. 25, p. 909–916, 2001.

SZABÓ, M. P.; MANGOLD, A. J.; JOÃO, C. F.; BECHARA, G. H.; GUGLIELMONE, A. A. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. **Vet Parasitol**, v.130,p. 131–140, 2005.

SZABÓ, M. P. J.; SOUZA, L. G. A; OLEGÁRIO, M. M. M; FERREIRA, F. A; PAJUABA NETO, ALBUQUERQUE, Ticks (Acari: Ixodidae) on Dogs from Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Trans Emerg Dis**, v. 57, p. 72–74, 2010

TAMEKUNI, K.; FILHO, M. F. S.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B.; VIDOTTO, O. Soroprevalência de *Rickettsia* spp. do grupo da febre maculosa em humanos, cães e eqüinos na região rural de Londrina-PR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 15., 2008, Curitiba. *Anais eletrônicos...*

TORRES, F. D. ; FIGUEREDO, L. A. *Heterodoxus spiniger* (Enderlein, 1909) on domestic dogs (*Canis familiaris*, L. 1758) from the city of Recife, Pernambuco State, Brazil. **Braz J Vet Res Anim Sci**, v. 44, n. 2, p. 77-80, 2007.

TRAVASSOS, J.; VALLEJO, A. Comportamento de alguns cavídeos (*Cavia aperea* e *Hydrochoerus capybara*) às inoculações experimentais do vírus da Febre Maculosa. Possibilidade desses cavídeos representarem o papel de depositários transitórios do vírus na natureza. **Mem Inst Butantan**, v. 15, p. 73-86, 1942.

VITALE, G. MANSUETO, S. ROLAIN, J.M.; RAOULT, D. *Rickettsia massiliae* Human Isolation. **Emerg Infect Diseases**, v. 12, n. p. 174-175, 2006.

WEBB, L.; CARL, M.; MALLOY, D.C. et al. Detection of murine typhus infection in fleas by using the polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol**, v.28, p.530-534, 1990.

WEDINCAMP, J.; FOIL, L. D. Vertical Transmission of *Rickettsia felis* in the cat flea (*Ctenocephalides felis* Bouché). **J Vector Ecol**, v. 27, n. 1, p. 96-101, 2002.

WHO. World Health Organisation. Laboratory diagnosis of Rickettsial diseases. **B World Health Organ**, v.66, p. 283-420, 1988.

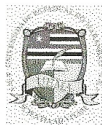
YU, X. J.; WALKER, D. H. The Order Rickettsiales. *In*: DWORKIN, M. (Ed.) The Prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiology community. 3rd ed. New York: Springer-Verlag, 2003. Disponível no site: <<http://link.springer.ny.com/link/service/books/10125>> Acesso em 22 de JUL de 2010.

ZAVALA-CASTRO, J. E.; ZAVALA-VELÁZQUEZ, J. E.; WALKER, D. H.; RUIZ ARCILA, E. E.; LAVIADA-MOLINA, H.; OLANO, J. P.; RUIZ-SOSA, J. A.; SMALL, M. A.; DZUL-ROSADO, K. R. Fatal human infection with *Rickettsia rickettsii*, Yucatán, México. **Emerg Infect Diseases**, v. 12, n. 4, p. 672-674, 2006.

ZAVALA-VELAZQUEZ, J. E.; RUIZ-SOSA, J.A.; VADO-SOLIS, I. R. A.; BILLINGS, N. A.; WALKER, D. H. Serologic study of the prevalence of rickettsiosis in Yucatan: evidence for a prevalent spotted fever group rickettsiosis, **Am J Trop Med Hyg**; v. 61, p.405-8,1999.

ZAVALA-VELÁZQUEZ, J. E.; ZAVALA-CASTRO, J. E.; VADO-SOLÍS, I.; RUIZSOSA, J. A.; MORON, C. G.; BOUYER, D. H.; WALKER, D. H. Identification of *Ctenocephalides felis* fleas as a host of *Rickettsia felis*, the agent of a spotted fever rickettsiosis in Yucatán, Mexico. **Vector-Borne and Zoon Dis**, v. 2, n. 2, p. 69-75, 2002.

APÊNDICE I




Universidade Estadual do Maranhão

COMISSÃO DE ÉTICA E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

DECLARAÇÃO

Declaramos para devidos fins que o projeto intitulado **“Estudo Soro-Epidemiológico e Molecular da Infecção por *Rickettsia* spp em cães de ambiente urbano e rural na mesorregião do Oeste Maranhense, microrregião de Imperatriz, Brasil”** foi aprovado pela Comissão de Ética e Experimentação Animal-CEEA do Curso de Medicina Veterinária da Uema, conforme protocolo nº 29/2010, para a execução da pesquisa, pela pós-graduanda do Mestrado em Ciência Animal/UEMA, Arannadia Barbosa Silva por atender as normas de Bem Estar Animal da Resolução do CFMV nº 879 de 15/02/2008

São Luís-Ma, 28 de fevereiro de 2012.


Prof. Dra. Alana Lislea de Sousa
Presidente do CEEA/CMV/UEMA
(Matrícula 9357)

APÊNDICE II

FICHA Nº _____

Data: / / 2011.

QUESTIONÁRIO INVESTIGATIVO

Este questionário pretende conhecer alguns aspectos das condições de criação dos cães nos Municípios de Imperatriz, Governador Edson Lobão e Davinópolis.

MUNICÍPIO: _____ **Zona Urbana** () **Zona rural** () **POVOADO:** _____

LATITUDE: _____ **LONGITUDE:** _____

1-Identificação do Proprietário

Nome:.....Telefone:.....

Endereço: Rua.....Bairro:.....

Tipo de residência: () Casa () Apartamento () Outros:.....

2-Identificação do Animal

Nome:.....

Raça:.....

Sexo: () Macho () Fêmea

Idade: () ≤1ano () 1 a 3 anos () > 3 anos

Pelagem: () curta () longa

3- Aspectos Sanitários

Seu animal é vacinado?

() sim, viroses () sim, viroses e raiva () Apenas a de raiva () outras () não

Seu animal já ectoparasitas? () Sim () Não () Não sei

Qual (is)? () Pulga () Carrapato () Piolho () outros Qual? _____

Ele foi tratado? () Sim () Não

O que foi utilizada para acabar com os carrapatos? () Banhos com Carrapaticidas () Sabão comum associado a extração manual ou com pinça () Banhos com remédios caseiros

() Uso de plantas () outros Qual? _____

4- Habitat

O cão tem contato com a mãe? () Sim () Não

O animal tem acesso à rua? () Sim () Não

Se positivo, com qual frequência? () Diário () Semanal () Esporádico

O cão tem contato com espécies silvestres (em fazendas, sítios, etc.)? () Sim () Não

Se positivo, quais animais?.....

Onde o cão passa a maior parte do tempo? () Rua () Quintal () Interior da residência

O cão tem contato com roedores? () Sim () Não

O cão tem contato com gatos? () Sim () Não

Possui outros animais em casa? () Sim () Não

Se positivo, quais? () Cães () Gatos () Aves () Outros Qual? _____

Proximidade de mata? () sim () não

5- Parâmetros Clínicos

Estado Geral do Animal: () bom () ruim () caquético

Conjuntivas () normal () ictérica () pálida () hiperêmica () cianótica

Mucosa Oral () normal () ictérica () pálida () hiperêmica () cianótica

Apresentou doenças reprodutivas? () Não () Sim

Qual (is) () aborto () sem cio () outros

Apresenta ou apresentou manifestações neurológicas? () Não () Sim Petéquias ()

Equimoses () Epixtasia ()