

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO - UEMA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL - PPGCA/UEMA

**PESQUISA DE *RICKETTSIA* EM EQUINOS DO GRUPAMENTO RACIAL
“CAVALO BAIXADEIRO” E EM ECTOPARASITAS POTENCIALMENTE
VETORES DE PATÓGENOS, NA MICRORREGIÃO DA BAIXADA
MARANHENSE, MARANHÃO, BRASIL**

Edvaldo Franco Amorim Filho

SÃO LUÍS, MA
2013

Edvaldo Franco Amorim Filho

**PESQUISA DE *RICKETTSIA* EM EQUINOS DO GRUPAMENTO RACIAL
“CAVALO BAIXADEIRO” E EM ECTOPARASITAS POTENCIALMENTE
VETORES DE PATÓGENOS, NA MICRORREGIÃO DA BAIXADA
MARANHENSE, MARANHÃO, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão como pré-requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Área: Medicina Veterinária Preventiva.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rita de Maria Seabra Nogueira de Candanedo Guerra

SÃO LUÍS, MA

2013

Pesquisa de *Rickettsia* em equinos do grupamento racial “cavalo baixadeiro” e em ectoparasitas potencialmente vetores de patógenos, na microrregião da Baixada Maranhense, Maranhão, Brasil

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em ____/____/____ pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Marinete Amorim - FIOCRUZ

1^o Membro

Prof^a. Dr^a. Ana Clara Gomes dos Santos - UEMA

2^o Membro

Prof^a Dr^a Rita de Maria Seabra Nogueira de Candanedo Guerra - UEMA

Orientadora

A Deus fonte inesgotável de saber. Aos cavalos, objeto de estudo, admiração e paixão. Aos meus pais Edvaldo e Maria de Jesus. Por tantas vezes que abriram mão de seus anseios para que os meus fossem alcançados; minha eterna gratidão. À minha esposa Patrícia, pelo companheirismo, compreensão, incentivo e dedicação. Por me agraciarem com o maior de todos os presentes, João Eduardo, meu filho, minha maior motivação para enfrentar e vencer tudo. Meu galardão de Deus. Minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, sabedoria e fé, por me sustentar nas horas difíceis. A ti Pai toda honra e toda glória.

A minha família, meus pais Edvaldo e Maria de Jesus, meu irmão Euryclides. A minha esposa Patrícia e meu filho João Eduardo. Às minhas tias Silene, Ândria e Concita que sempre acreditaram em mim. A minha mãe Vanusa pela prontidão e cuidados dispensados nas horas mais difíceis a quem sempre recorro confiante de ser atendido.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Rita de Maria Seabra Nogueira de Candanedo Guerra, pela confiança, dedicação, paciência e competência, por ser pra mim um exemplo de profissional, o qual me espelho. Por ser essa pessoa generosa e atenciosa em todos os momentos de dificuldades, pela amizade construída ao longo desses anos de trabalho. Minha estima.

À minha co-orientadora, Prof^a Dr^a Ana Clara Gomes dos Santos, pela amizade, respeito e carinho. Pela atenção a mim dispensada ao longo desta jornada, por todas as dicas, conselhos e sugestões. Por ser uma profissional exemplar comprometida e dedicada na qual me inspiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal/UEMA e aos docentes que participaram desta caminhada através da transmissão de conhecimento e experiências, na qual extrai seus ensinamentos.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão - FAPEMA pela concessão da bolsa de mestrado e financiamento do projeto que permitiram a execução do mesmo, possibilitando a concretização deste importante passo em minha vida.

Ao Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna VPS/FMVZ/USP, pela oportunidade concedida de poder estagiar em uma das mais conceituadas Universidades do país, pelas conversas e ensinamentos, por compartilhar suas experiências e dicas em várias técnicas.

Aos doutorandos Francisco Borges Costa e Andrea Pereira Costa (VPS/FMVZ/USP), pela amizade, companheirismo e profissionalismo. Por me

abrirem as portas, pela ajuda e transmissão de conhecimento. Minha estima, a estes que sem dúvida, tranquilizaram minhas horas de aflição e saudade longe da minha casa, nos passeios, jantares e horas de diversão, mas principalmente nas batalhas diárias e noturnas no laboratório.

A toda equipe do projeto “Sanidade do Cavalo Baixadeiro” em especial ao prof. Danilo Brito que muito contribuiu nas coletas, pela amizade, apoio e incentivo, assim como seus alunos Ivan e Eduardo pela ajuda.

A todos os colegas do Laboratório de Parasitologia Veterinária/UEMA Natália, Carol, Giovane, Ronald, Vanessa, Paula e Tamires, em especial a Tássia Lopes do Vale e Francineto Silva Reis pela ajuda e força durante as árduas caminhadas, pela colaboração e auxílio nas viagens, coletas e processamento de material.

À minha turma de mestrado, pela convivência harmoniosa e pacífica. Pelo carinho e companheirismo que compartilhamos ao longo dessa difícil jornada. Pelas horas de alegria, descontração e diversão, mas também pelas lamentações, dificuldades e ajuda mútua que recebi dos nobres colegas de mestrado; sucesso.

A todos os amigos que contribuíram nesta jornada, em especial Adriana Vívian Costa Araújo pela imensa ajuda nas coletas, nas viagens e pelo empenho em conseguir os animais para execução deste experimento. A Elizvânia Gomes da Silva pelo apoio, incentivo e toda colaboração recebida. Ao Inaldo Macedo Sobrinho pelo apoio e prontidão, pela ajuda recebida ao longo dessa caminhada.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular/UEMA Joyce, Alessandra, especialmente a Larissa e Iara pela ajuda no processamento de material e incentivo.

Aos colegas do Laboratório de Doenças Parasitárias-VPS/FMVZ/USP Tiaguinho, Jonas, João, Danilo, Herbeth, Amália, Ricardo, Julia, Juliana, Gi, Tati e Fernanda. Dr^a Hilda, Dr. Arlei e a Prof^a Solange Gennari pela colaboração, pelas dicas e instruções para meu aprimoramento nas técnicas utilizadas. Ao Renatinho e Pedrinho pela ajuda na integração com a equipe e pelos momentos de descontração.

E principalmente a todos os criadores e tratadores de cavalo baixadeiro que cederam os animais e abraçaram este estudo, tornando viável a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Histórico	17
2.2 Etiologia.....	19
2.3 Epidemiologia	21
2.4 Vetor.....	22
2.5 Reservatórios e hospedeiros amplificadores	24
2.6 Patogenia	25
2.7 Diagnóstico.....	27
3. OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo geral	30
3.2 Objetivos específicos.....	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Local.....	31
4.2 Animais.....	32
4.3 Coleta de sangue e diagnóstico indireto de <i>Rickettsia</i>	33
4.4 Coleta e PCR de carrapatos	33
4.5 Sequenciamento de DNA	34
4.6 Análise estatística.....	35
4.7 Comitê de Ética	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS	52
ANEXOS	71

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Distribuição dos iniciadores utilizados nos testes de PCR para diagnóstico de *Rickettsia* sp. em carrapatos coletados de equinos amostrados no período de maio de 2011 a maio de 2012 na região da Baixada Maranhense, MA 34
- Tabela 2. Distribuição das amostras sororreagentes considerando os municípios pesquisados no período de maio de 2011 a maio de 2012 na região da Baixada Maranhense, MA 41
- Tabela 3. Distribuição quanto a infestação por carrapatos considerando o tipo de parasitismo em equinos no período de maio de 2011 a maio de 2012 na região da Baixada Maranhense, MA 46
- Tabela 4. Quantitativo de carrapatos coletados em equinos da Baixada Maranhense, no período de maio de 2011 a maio de 2012, submetidos à Reação em Cadeia de Polimerase..... 46

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Áreas de Preservação Ambiental do Estado do Maranhão. 32
- Figura 2. Caracterização da exploração, quanto à utilidade, de 258 equinos amostrados no período de maio de 2011 a maio de 2012 na região da Baixada Maranhense, MA 36
- Figura 3. Determinação do provável antígeno de *Rickettsia* pela Reação de Imunofluorescência Indireta em amostras sororreagentes de equinos da Baixada Maranhense, MA..... 40
- Figura 4. Titulação máxima e mínima para as três espécies de *Rickettsia* sp. testadas pela Reação de Imunofluorescência Indireta em amostras sororreagentes de equinos da Baixada Maranhense, MA 42
- Figura 5. A – *Amblyomma cajennense* macho e seu escudo ornamentado (seta); B – *Rhipcephalus (Boophilus) microplus* macho, observa-se os dois pares de placas adanais (seta preta) e capítulo em forma de hexágono (seta vermelha); C – *Dermacentor nitens* macho, placa espiracular característica (seta)..... 44
- Figura 6. Gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. Leitura da PCR utilizando os iniciadores CS-78 e CS-323 para fragmento de 410pb do gene citrato sintase (*gltA*) de *Rickettsia* spp. sob luz ultravioleta. Reação positiva para amostras 49, 167 e 168. Sendo C+: controle positivo; C-: controle negativo; C-e.: controle de extração; C-m: controle do mix. 47
- Figura 7. Gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. Leitura da PCR utilizando os iniciadores Rs190.70p e Rs 190.602n para fragmentos do gene *outer membrane protein (OmpA)*, de *Rickettsia* sp. do GFM sob luz ultravioleta. Reação positiva para amostras 49, 167 e 168. Sendo C+: controle positivo; C-: controle negativo; C-m: controle do mix. 48

LISTA DE ABREVIATURAS

- APA = Área de Preservação Ambiental
- CS = Citrato Sintase
- DNA = *Deoxyribonucleic Acid* - Ácido Desoxirribonucleico
- EUA = Estados Unidos da América
- FC = Fixação de Complemento
- FM = Febre Maculosa
- FMB = Febre Maculosa Brasileira
- FMMR = Febre Maculosa das Montanhas Rochosas
- GA = Grupo Ancestral
- GFM = Grupo da Febre Maculosa
- glfA* = Gene que codifica a enzima citrato sintase
- GT = *Guanidine Isothiocyanate* – Isotiocianato de Guanidina
- GT = Grupo do Tifo
- GTr = Grupo de Transição
- IgG = Imunoglobulina tipo G
- IgM = Imunoglobulina tipo M
- LPS = Lipopolissacarídeo
- OmpA* = *Outher Membrane Protein A*
- OmpB* = *Outher Membrane Protein B*
- OMS = Organização Mundial da Saúde
- pb = Pares de Base
- PCR = *Polymerase Chain Reaction* - Reação em Cadeia da Polimerase
- RIFI = Reação de Imunofluorescência Indireta
- RMSF = *Rocky Mountain Spotted Fever*
- S = *South* - Sul
- Taq = *Thermus aquaticus*
- W = *West* - Oeste

RESUMO

AMORIM-FILHO, E. F. **Pesquisa de *Rickettsia* em equinos do grupamento racial “cavalo baixadeiro” e em ectoparasitas potencialmente vetores de patógenos, na microrregião da Baixada Maranhense, Maranhão, Brasil.** 2013. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luis, 2013.

Os cavalos nativos da microrregião da Baixada Maranhense, denominados “cavalos baixadeiros” são criados predominantemente soltos nos campos, sem manejo nutricional e sanitário, predispondo-os ao surgimento de diversas enfermidades, principalmente as doenças parasitárias. Objetivou-se detectar *Rickettsia* e identificar os principais ectoparasitas potencialmente vetores de patógenos em cavalos baixadeiros. Para pesquisa de *Rickettsia* foram amostrados 258 equinos submetidos ao mesmo manejo, sendo 37 (14,34%) do município de Santa Helena, 60 (23,26%) de Viana e 191 (62,40%) de Pinheiro. Destes 64,34% fêmeas e 35,66% machos. Do total de amostras submetidas à Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), 152 (58,91%) reagiram a pelo menos um dos antígenos testados (*Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia amblyommii* e *Rickettsia bellii*). Constatou-se somente infestação por carrapatos em 220 (85,27%) animais que apresentaram infestação por uma ou mais espécies. Identificou-se carrapatos das espécies, *Dermacentor nitens* (98,64%), *Amblyomma cajennense* (4,55%) e *Rhipcephalus (Boophilus) microplus* (1,82%). Realizou-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em 115 carrapatos, sendo 92 espécimes de *D. nitens*, 18 de *A. cajennense* e cinco de *R. (B.) microplus*. Três amostras de *A. cajennense* foram positivas para o gene *gltA* e *OmpA*. As amostras foram sequenciadas e apresentaram 100% de similaridade para *R. amblyommii*.

Palavras – chave: *Rickettsia*, Febre Maculosa, ectoparasitas, equinos e Maranhão.

ABSTRACT

AMORIM-FILHO, E. F. **Search of *Rickettsia* in the equine group "Cavalo Baixadeiro" and ectoparasites potentially vectors of pathogens in the microregion of the Baixada Maranhense, Maranhão, Brazil.** 2013. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luis, 2013.

Native horses from the microregion of the “Baixada Maranhense” are called “cavalo baixadeiro” and are created predominantly in the fields, without health and nutritional management, predisposing them to variety diseases, especially parasitic diseases. The aim of the present study was to detect *Rickettsia* and identify ectoparasites which have potential in transmitting of the pathogens to “cavalo baixadeiro”. To search *Rickettsia* were sampled 258 horses subjected to the same management, 37 (14.34%) of the municipality of Santa Helena, 60 (23.26%) of Viana and 191 (62.40%) of Pinheiro. Of these 64.34% were females and 35.66% were males. Of the total samples submitted to IFA, 152 (58.91%) reacted at least to one of the antigens tested (*Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia amblyommii* and *Rickettsia bellii*). It was found only tick infestation in 220 (85.27%) animals by one or more species. The following species were identified, *Dermacentor nitens* (98.64%), *Amblyomma cajennense* (4.55%) and *Rhipcephalus (Boophilus) microplus* (1.82%). A Polymerase Chain Reacti

on (PCR) was performed in 115 ticks as follows: 92 specimens of *D. nitens*, 18 *A. cajennense* and five of *R. (B.) microplus*. Three samples of *Amblyomma cajennense* were positive for the *gltA* and *OmpA* genes. The samples were sequenced and showed 100% similarity to *R. amblyommii*.

Keywords: *Rickettsia*, Spotted Fever, ectoparasites, horses and Maranhão.

1 INTRODUÇÃO

A América do Sul possui um rebanho estimado em 19.695.112 equídeos, sendo sua maioria constituída por equinos com 14.197.740 cabeças. O Brasil possui papel de destaque, com uma população estimada em 7.752.282 equídeos (FAO, 2011), representando assim 39,36% do efetivo total da América do Sul. Destes aproximadamente 5.508.550 são equinos totalizando 71% do rebanho equídeo nacional, o que torna o Brasil detentor do maior rebanho equino da América do Sul e terceiro do mundo. A região Nordeste destaca-se com um efetivo de 1.340.921 equinos, atrás apenas da região Sudeste que detém um efetivo de 1.344.229 animais. O rebanho maranhense constitui o segundo maior rebanho do Nordeste, com um efetivo de 173.739 equinos, ultrapassado somente pela Bahia que possui um rebanho de 555.905 animais (IBGE, 2011).

A Baixada Maranhense, por sua vez, possui uma população equina estimada em 22.127 cabeças, das quais 2.200 encontram-se no município de Pinheiro, 2.022 em Anajatuba, 1.867 em Viana, 1.730 em Penalva e 1.490 em São João Batista (IBGE, 2011). Do rebanho equino da baixada maranhense, chama atenção um grupamento genético localizado nessa região denominado pela população de cavalo baixadeiro, notado pela sua resistência, rusticidade e adaptabilidade às condições climáticas da região.

O cavalo baixadeiro é criado predominantemente solto nos campos, de forma extensiva alimentando-se basicamente de pastagem nativa *Paratheria próstata* (capim-marreca). Serra (2004) destacou que a criação do cavalo baixadeiro faz-se nos campos assim como o gado bovino, no período seco nos baixos e durante o período chuvoso nas áreas mais altas não sujeitas a inundação.

O sistema extensivo a que cavalo baixadeiro é submetido, bem como a falta de manejo sanitário e assistência médica-veterinária são fatores que podem predispor ao surgimento de doenças parasitárias, quer sejam elas causadas por endoparasitos ou aquelas transmitidas por artrópodes ectoparasitos, com conseqüente impacto a saúde dos animais.

Os artrópodes desempenham um papel importante na transmissão e manutenção de determinadas enfermidades parasitárias, especialmente os ectoparasitos como os carrapatos e os piolhos que infestam equinos. De igual importância registram-se também os tabanídeos. O conhecimento desse parasitismo e medidas apropriadas de controle podem auxiliar os criadores a prevenir doenças graves como a babesiose, tripanossomíase e entre outras (ENGLISH et al., 2005), assim como a riquetsiose.

As riquetsioses são doenças causadas por bactérias Gram-negativas, parasitas intracelulares obrigatórias pertencentes ao sub-grupo α -Proteobacteria, família Rickettsiaceae e ordem Rickettsiales. As riquetsioses mantêm caráter endêmico estando presente em quase todos os continentes (OPAS, 2004).

As riquetsias causadoras de Febre Maculosa (FM) estão classificadas no Grupo da Febre Maculosa (GFM) e atualmente são reconhecidas mais de 15 espécies de riquetsias do GFM patogênicas ao homem. Sendo *Rickettsia rickettsii* a representante mais patogênica e letal do grupo. São zoonoses transmitidas por artrópodes, que tem em seu hospedeiro silvestre a manutenção do agente funcionando como animais amplificadores no ambiente, promovendo a infecção dos artrópodes através do repasto sanguíneo e conseqüentemente sua transmissão ao homem e animais domésticos (LABRUNA, 2009).

As ações do homem e os impactos ambientais por eles causados, através do desmatamento, queimadas entre outros, tem promovido o desequilíbrio do ciclo silvestre das riquetsias, predispondo o homem ao risco de contrair tal enfermidade, principalmente em virtude da exposição deste aos vetores e hospedeiros amplificadores das riquetsioses.

Os gêneros de Ixodides, como *Dermacentor*, *Amblyomma* e *Rhipicephalus* são importantes reservatórios de *R. rickettsii* (BURGDORFER, 1988). Vários estudos tem relatado que estas três espécies de carrapatos infestam os equinos no Brasil: *Dermacentor nitens*, *Amblyomma cajennense* e menos comumente *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (FALCE et al., 1983;

GUERIM & SERRA-FREIRE, 2001; LABRUNA et al., 2001, 2002). Sendo *A. cajennense* apontado como o principal vetor da *R. rickettsii* no Brasil.

A. cajennense ocorre em abundância sendo amplamente distribuído nos estados das regiões Sudeste e Centro-Oeste do país (LABRUNA, 2009). Os equinos e capivaras (*Hydrochoerus hydrochoerus*) são considerados os principais hospedeiros primários do *A. cajennense* (GUEDES et al., 2005; VIANNA et al., 2008; SOUZA et al., 2009; LABRUNA, 2009).

Os equinos, assim como as capivaras, são considerados hospedeiros amplificadores em áreas endêmicas, pois além de serem hospedeiros primários do principal vetor, apresentam baixa sintomatologia clínica. Lemos et al. (1996) destacam os equinos com quadro clínico assintomático, apesar de apresentar títulos acima de 1:1024. Consequentemente predispõe ao aumento de casos de FM nessas áreas.

O primeiro registro de FM ocorreu por volta de 1896 no vale do rio Snake, estado de Idaho, nos Estados Unidos (WALKER, 1989). A FM foi primeiramente descrita no Brasil, no estado de São Paulo e atualmente é reportada em quase todas as regiões do país, sendo endêmica para região Sudeste e recebe o nome de Febre Maculosa Brasileira (FMB). Além destes países, *R. rickettsii* ocorre, em caráter endêmico, na Colômbia, México, Panamá e Costa Rica (PATINO et al., 1937; BUSTAMANTE & VARELA, 1947; RODANICHE, 1953; FUENTES, 1986).

Segundo dados do Ministério da Saúde, entre os anos de 1997 e 2011 houve a notificação no Brasil de 968 casos confirmados da doença, dentre os quais 227 óbitos registrados, distribuídos entre São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Bahia, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Distrito Federal.

Sendo o equino, comumente considerado hospedeiro primário do *A. cajennense*, e este por sua vez o principal vetor da FMB, e associados aos recentes estudos realizados no Maranhão que tem demonstrado a ocorrência de *Rickettsia* é que se propôs este estudo, a pesquisa de *Rickettsia* em equinos e artrópodes ectoparasitas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

FEBRE MACULOSA

2.1 Histórico

Os primeiros casos de Febre Maculosa (FM), denominada sarampo preto (*black measles*) datam dos anos de 1896 no vale do rio Snake, Idaho, nos Estados Unidos quando em 1899 Maxey descreveu os relatos clínicos iniciais da doença, caracterizada como uma enfermidade febril com erupções de cor avermelhada que progressivamente tornam-se enegrecidas (WALKER, 1989; PAROLA et al., 2005).

No início do século XX, ocorreram as primeiras tentativas de elucidar a enfermidade. Wilson e Chowning (1904) apontaram as possíveis causas e mecanismos de transmissão envolvendo os carrapatos. Entretanto, coube ao pesquisador Dr. Howard Taylor Ricketts identificar o agente etiológico, quando efetuou o isolamento de uma bactéria, a partir da inoculação de sangue de pessoas infectadas em cobaias, descrevendo ainda as características epidemiológicas da doença, quando também estabeleceu o papel do carrapato *Dermacentor* spp. na transmissão da enfermidade que posteriormente fora denominada *Rocky Mountain Spotted Fever* (RMSF) e que no Brasil é traduzida como Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (FMMR) (RICKETTS, 1906; RICKETTS, 1909; WALKER, 1989; PACHECO, 2007).

Entre 1916 e 1919, Wolbach visualizou, pela primeira vez, a bactéria no interior de células endoteliais humanas lesadas, descrevendo, também, a presença do patógeno em todas as fases evolutivas dos carrapatos, inclusive os ovos (WALKER, 1989; PAROLA et al., 2005; DANTAS-TORRES, 2007). Nesse período a bactéria foi denominada *Rickettsia rickettsii* em homenagem ao Dr. Ricketts, que faleceu em 1910 no México de outra riquetsiose, o tifo (WEISS & STRAUSS, 1991; SANGIONI, 2003).

Em 1937, um organismo semelhante ao identificado por Dr. Ricketts foi isolado por Ralph Robinson Parker, provenientes de carrapatos da espécie *Amblyomma maculatum* do estado do Texas, Estados Unidos, responsável por sintomas semelhantes em cobaias, entretanto mais brandos e de menor mortalidade (PARKER, 1939). Anos mais tarde o agente etiológico isolado do *A. maculatum*, relatado por Parker tem sua patogenicidade confirmada em humanos e recebe o nome científico de *Rickettsia parkeri* (PADDOCK et al., 2004).

Nos Estados Unidos a FMMR tem essa denominação devido aos primeiros casos reportados da doença ocorrerem nas regiões montanhosas, cujo vetor, o carrapato *Dermacentor andersoni*, serem encontrados nessas regiões. Contudo o termo utilizado para a FM nos Estados Unidos é erroneamente empregado, pois desde a década de 30, sabia-se que a FMMR estava amplamente distribuída no território estadunidense. Sendo que entre 1981 a 1996 somente os estados de Alasca, Havaí, Maine e Vermont não apresentaram casos de doença (CDC, 2006).

Além dos Estados Unidos, *R. rickettsii* ocorre endemicamente na Colômbia, denominada de Fiebre de Tobia (PATINO et al., 1937), no México cuja doença recebe o nome de Fiebre Manchada (BUSTAMANTE & VARELA, 1947), além de Panamá (RODANICHE, 1953) e Costa Rica (FUENTES, 1986) transmitida por carrapatos do gênero *Amblyomma* (McDADE & NEWHOUSE, 1986).

No Brasil a enfermidade é denominada de Febre Maculosa Brasileira (FMB) e teve seu primeiro registro datado do fim da década de 30, quando fora denominada “typho exanthemático de São Paulo”, por Piza, quando este relatou o primeiro caso em São Paulo no ano de 1929 (PIZA et al., 1932; ANGERAMI et al., 2004; LABRUNA, 2009).

Em 1988 foi realizado o primeiro isolamento de *Rickettsia* do Grupo da Febre Maculosa (GFM) no Brasil em humano com comprovação sorológica e caracterização do isolado por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (DEL GUERCIO et al., 1997; SANGIONI, 2003). Posteriormente sucessivos casos de FMB foram diagnosticados, sendo a maioria dos agravos registrados na região

Sudeste, principalmente nos estados de São Paulo e Minas Gerais (VRANJAC, 2003). Entretanto, a FMB em cães só foi descrita recentemente no país, a partir da confirmação de enfermidade em dois animais oriundos do município de Itu, no estado de São Paulo (LABRUNA et al., 2009).

A partir de 2001, a doença passou a ser incluída na lista de agravos de notificação compulsória pelo Ministério da Saúde regulamentada pela Portaria nº 1943 de 18 de outubro de 2001. Novos casos de FMB passaram a ser notificados em outros estados, inclusive com casos na região Nordeste, sendo dois casos na Bahia nos anos de 2007 e 2009, e um caso no estado do Ceará, todos sem óbitos e o mais recente registro aponta dois casos em 2011 também neste estado (BRASIL, 2011).

2.2 Etiologia

As riquetsias são bactérias Gram-negativas intracelulares obrigatórias pertencentes ao sub-grupo α -Proteobacteria, família Rickettsiaceae e ordem Rickettsiales (RAOULT & ROUX, 1997) descritas com tamanho entre 0,3 a 0,8 μm comprimento por 0,5 a 2,0 μm de largura (FOURNIER & RAOULT in: RAOULT & PAROLA, 2009), que adere fucsina básica quando corado pelo método de Giménez (GIMÉNEZ, 1964) permite observação em microscopia óptica em aumento de 1000X.

Possuem predileção por células do endotélio em animais vertebrados, onde o agente se multiplica, causando vasculites e exantema com a ativação de plaquetas e do sistema de coagulação (GREENE & BREITSCHWERDT, 2006). Já nos vetores diversos autores tem reportado a bactéria, alojando-se em células intestinais, túbulos de Malpighi, hemolinfa, glândulas salivares e ovários (GIMÉNEZ, 1964; BURGDORFER, 1970; BILLINGS et al., 1998; YU & WALKER, 2003; RAOULT et al., 2005).

O gênero *Rickettsia* está tradicionalmente subdividido em dois grupos: o Grupo do Tifo (GF) que compreende duas espécies *Rickettsia prowazekii* causadora do tifo epidêmico transmitida por piolhos e *Rickettsia typhi* agente

etiológico do tifo endêmico ou tifo murino, cujo vetor é a pulga (EREMEEVA & DASCH, 2000); e o GFM constituído por mais de 30 espécies, das quais aproximadamente 15 causam diferentes doenças ao homem, a saber *Rickettsia aeschlimannii*, *Rickettsia africae*, *Rickettsia akari*, *Rickettsia australis*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia felis*, *Rickettsia helvitica*, *Rickettsia honei*, *Rickettsia japonica*, *Rickettsia marmionii*, *Rickettsia mongolotimonae*, *R. parkeri*, *R. rickettsii*, *Rickettsia sibirica*, *Rickettsia slovacica*. Além de *Rickettsia amblyommii* que já tem sua patogenicidade comprovada em humanos. A maioria das espécies do GFM tem sua transmissão veiculada por carrapatos, com exceção de *R. akari* e *R. felis* que são transmitidas por ácaros e pulgas, respectivamente (RAOULT & ROUX, 1997; SEKEYOVA et al., 2001; RAOULT et al., 2002; BROUQUI et al., 2004; PAROLA et al., 2005; HORTA, et al., 2007).

Um terceiro grupo, Grupo Ancestral (GA) compreendido pelas espécies *Rickettsia canadensis* e *Rickettsia bellii*, de patogenicidade ainda desconhecida (RAOULT & ROUX, 1997), foi proposto por Sekeyova et al. (2001). Um quarto grupo tem sido discutido, o Grupo de Transição (GTr), que seria compreendido por *R. akari* e *R. felis*, que são as únicas no GFM que não são transmitidas por carrapatos (GILLESPIE et al., 2007).

Estudos realizados por Gillespie et al. (2007) tem sugerido o reagrupamento de *R. felis* para o GTr em virtude do seu genoma, que é maior em relação as outras riquetsias, concordando ainda com a classificação das riquetsias em quatro linhagens distintas, ou seja, GA, GTr, GT e GFM.

Yu & Walker (2003) destacaram que algumas espécies pertencentes ao GFM possuem comprovada patogenicidade para humanos, assim como espécies de patogenicidade moderada, outras sem patogenicidade comprovada e por sua vez algumas ainda desconhecidas.

A bactéria *R. rickettsii* constitui-se como principal agente da FM. A FMB, causada por este agente é considerada como uma das doenças de maior letalidade no estado de São Paulo (PACHECO, 2007). Tem sido reportada em diversas regiões do mundo.

Paddock et al. (2004) relataram o primeiro caso de infecção por *R. parkeri* em humanos nos Estados Unidos, no estado de Virgínia,

posteriormente o segundo caso de infecção por esse agente em humanos foi relatado por Whitman et al. (2007) também nesse país.

R. amblyommii foi isolada inicialmente de *Amblyomma americanum*, no ano de 1970, no estado de Tennessee, Estados Unidos. Parola et al. (2005) sugeriram, pela primeira vez, este agente como causador de doenças em humanos, quando observaram um grupo composto por 12 militares que apresentou febre mediana e soropositividade para riquetsias do GFM, sendo que cinco destes exibiram perfil específico com reatividade maior para o antígeno de *R. amblyommii* (MEDEIROS, 2010). Este mesmo agente também é suspeito de causar doenças na Carolina do Norte, Estados Unidos (APPERSON et al., 2008).

2.3 Epidemiologia

Rickettsia do GFM foi descrita em diversas regiões do mundo. Nas Américas está amplamente difundida, registrando-se casos da América do Norte à América do Sul. Relatos de FM nos Estados Unidos, Canadá, México, Panamá, Costa Rica, Colômbia, Brasil e Argentina já foram descritos.

Até antes de 2002, todos os casos confirmados de FM nas Américas eram atribuídos a um único agente, *R. rickettsii*. Entretanto, *R. rickettsii* contribuía com a minoria dos isolados do GFM (PACHECO, 2007).

No Brasil, a FMB é endêmica nos estados de São Paulo e Minas Gerais. Antes de 1980, os casos de FMB eram restritos a estes dois estados, quando no ano de 1981 registrou-se um caso de FMB no estado do Rio de Janeiro por Gonçalves et al. (1981). Posteriormente sendo notificado em todos os estados da região Sudeste (DIAS & MARTINS, 1939; SEXTON et al., 1993; ROZENTAL et al., 2002).

Com a inclusão da FMB na lista de doenças de notificação compulsória pelo Ministério da Saúde em 2001, sucessivos casos da enfermidade foram relatados em Santa Catarina, Distrito Federal, Paraná, Rio Grande do Sul, Bahia, Ceará e Goiás (BRASIL, 2011). Nos Estados Unidos a

doença tem sido notificada desde 1920 pelo sistema de vigilância do país (PADDOCK et al., 1999; ANGERAMI, 2011).

Casos confirmados de FMB entre os anos de 1997 a 2011 foram registrados em quase todas as regiões do Brasil totalizando 968 casos, excetuando a Região Norte, onde não foram constatados casos da doença até o momento (BRASIL, 2011). Ainda de acordo com os dados do Ministério da Saúde, somente no ano de 2011 foram notificados dois casos no Ceará, seis casos em Minas Gerais, dois casos no Espírito Santo e quatro no Rio de Janeiro e 39 registros no estado de São Paulo. Além desses foram confirmados um caso no Paraná, dez casos em Santa Catarina e um caso no Distrito Federal, totalizando 65 casos confirmados de FMB até o mês de outubro de 2011.

Lim et al. (2012) destacaram a especial atenção dispensada às riquetsioses em todo o mundo, sendo consideradas doenças de ameaça emergente global.

2.4 Vetor

Nos Estados Unidos a FMMR é reportada sendo veiculada pelos carrapatos *D. andersoni* na costa Oeste e *Dermacentor variabilis* na costa Leste. Demma et al. (2006) incriminaram carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* como possível vetor da FMMR no estado do Arizona, Estados Unidos, a partir de relatos de pacientes que tiveram contato com cães que apresentavam alta infestação por *R. sanguineus*, dos quais foram obtidos isolados de *R. rickettsii*.

A. cajennense é o principal veiculador de *R. rickettsii* no Brasil (DIAS & MARTINS, 1939; GUIMARÃES et al., 2001), sendo também considerado como principal vetor da bactéria na Colômbia (PATINO et al., 1937), no México (BUSTAMANTE & VARELA, 1947) e no Panamá (RODANICHE, 1953).

Lemos-Monteiro et al. (1932) foram os primeiros a demonstrar a capacidade de *A. cajennense* se infectar por *R. rickettsii*, através de infecção

experimental com cobaias infectadas. Outros estudos análogos testaram a capacidade de carrapatos dos gêneros *Argas* e *Ornithodoros*, obtendo resultados satisfatórios apenas para o segundo (SANTOS, 2007).

A. cajennense possui baixa especificidade parasitária, principalmente nos estágios iniciais, larva e ninfa, podendo parasitar inclusive o homem (ARAGÃO, 1911; ARAGÃO & FONSECA, 1953; SANGIONI, 2003). E em todos os estágios evolutivos, tanto a larva, a ninfa, quanto o adulto são capazes de transmitir *Rickettsia* sp. durante o repasto sanguíneo (COMER, 1991; SANGIONI, 2003).

Além de *A. cajennense*, mais duas espécies foram incriminadas como vetor da FMB, onde *R. rickettsii* foi isolada de *Amblyomma aureolatum* (PINTER & LABRUNA, 2006; LABRUNA, 2009). e *Amblyomma dubitatum* comum em capivaras, sendo apontado como possível vetor, embora isso ainda não tenha sido comprovado (SUCEN, 2012). Há registros de detecção, através da PCR, de infecção de *R. parkeri* em *Amblyomma triste*, porém há poucos relatos de ocorrências de *A. triste* no Brasil; e ainda não se tem casos registrados de picada deste carrapato em seres humanos (SILVEIRA et al., 2007).

Além dos Estados Unidos, *R. sanguineus* também foi incriminado como vetor da FM, na região de Sonora, México (MARIOTE & BUSTAMANTE, 1944).

Estudos realizados por Moraes-Filho et al. (2009) identificaram no estado de São Paulo *R. rickettsii* em carrapatos *R. sanguineus*, assim como Rozental et al. (2009), demonstraram estes carrapatos albergando *Rickettsia* sp. *R. sanguineus* é o principal carrapato de cães no Brasil, principalmente em áreas urbanas (LABRUNA et al., 2004). Moraes-Filho et al. (2009) relataram ainda o frequente parasitismo por parte destes carrapatos em cães de área urbana, gerando questionamentos a respeito da possível participação de *R. sanguineus* no ciclo da FMB, assim como os casos descritos nos Estados Unidos (WALKER, 2007; CHEN & SEXTON, 2008; ANGERAMI, 2011).

2.5 Reservatórios e Hospedeiros amplificadores

Os carrapatos dos gêneros *Dermacentor*, *Rhipicephalus* e *Amblyomma* são considerados importantes reservatórios de *R. rickettsii* na natureza (BURGDORFER, 1998). A capacidade de transmissão da bactéria via transovariana e transestadial são características que os incluem na categoria de potenciais vetores reservatórios, uma vez que o carrapato infectado pode transmitir tanto horizontal como verticalmente o agente para outras gerações e em todos os estágios de vida.

Entretanto, apenas esses mecanismos não seriam suficientes para disseminar a bactéria por longos períodos, haja vista, o efeito patogênico que a mesma causa aos carrapatos, embora em proporções inferiores, *R. rickettsii* também é patogênica ao hospedeiro invertebrado que a alberga (McDADE & NEWHOUSE, 1986). O que torna necessário a existência de outras fontes de contaminação, para que populações de carrapatos não infectados contraiam a bactéria e possam dar continuidade ao ciclo, isto é, os hospedeiros amplificadores, que em sua maioria são hospedeiros naturais do carrapato vetor.

Labruna (2006) descreve que para ser um hospedeiro competente, o animal dever ocorrer em abundância na área endêmica, ser um hospedeiro natural do vetor em condições naturais, ser susceptível à infecção, manter a parasitemia em níveis suficientes para infecção do vetor e ter uma alta taxa de renovação populacional.

Ao manter a riquetsemia durante dias ou semanas, o hospedeiro amplificador possibilita a infecção do carrapato não exposto anteriormente, aumentando a taxa de infecção da população do vetor (BURGDORFER, 1988).

Na América do Norte o papel de amplificador de algumas espécies de pequenos roedores (*Microtus pensilvanicus*, *Pitymus pinetorum*, *Peromyscus leucopus* e *Sigmodon hispidus*) já foi descrito (McDADE & NEWHOUSE, 1986; BURGDORFER, 1988). No Brasil os principais hospedeiros amplificadores reportados foram *H. hydrochoerus*, *Didelphis marsupialis* (MOREIRA & MAGALHÃES, 1935; TRAVASSOS & VALLEJO,

1942; LABRUNA, 2006; HORTA et al., 2009). 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*) também foram incriminados como hospedeiros amplificadores de *R. rickettsii* (MOREIRA & MAGALHÃES, 1935). Demma et al. (2006) sugeriram o papel de hospedeiro amplificador do cão doméstico, a partir de estudos realizados, quando identificaram *R. rickettsii* em *R. sanguineus* que infestavam os cães.

Além desses animais, os equinos também figuram na lista de possíveis hospedeiros amplificadores, uma vez que apresentam altos títulos de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii*, são assintomáticos e constituem-se como hospedeiros primários de *A. cajennense* (LEMOS et al., 1996; SANGIONI et al., 2005). Tais características corroboram com as descrições de Labruna (2006) para o hospedeiro amplificador competente.

Estudos realizados no estado de São Paulo com cães, humanos e equinos, apontaram este último como um potencial animal sentinela, demonstrando que equinos sororreagentes são forte indicadores de FM em áreas onde os humanos estão expostos ao vetor (SANGIONI et al., 2005).

2.6 Patogenia

Para desenvolver um quadro de FM além de entrar em contato com o carrapato infectado é necessário que o artrópode passe de cinco a dez horas fixado ao homem para que ocorra a transmissão (COMER, 1991; SANGIONI, 2003). Isso se deve a uma reativação das riquetsias presentes na glândula salivar do vetor, que se encontra em um estado de baixa virulência e passa para outro de alta patogenicidade (WALKER, 1989; PAROLA et al., 2005; CHEN & SEXTON 2008; ANGERAMI, 2011).

O período de incubação da FM varia de dois a 14 dias, com média de sete dias após a fixação do carrapato. A disseminação da bactéria se dá pela rede linfática e hematogênica para os principais tecidos e órgãos incluindo

pele, músculos esqueléticos, cérebro, pulmões, coração, rins, baço, fígado e segmentos do trato gastrointestinal (WALKER, 1989; ANGERAMI, 2011). Onde as células do endotélio vascular constituem o principal sítio de infecção.

A bactéria multiplica-se nas células endoteliais, produzindo enzimas tóxico-celulares, causando distúrbios vasculares e tissulares (MARTINS, 2009). Observa-se um quadro de vasculite generalizada, resultado da destruição das células endoteliais dos vasos sanguíneos devido a ação das riquetsias (WALKER & MATTERN, 1980).

Dentre as espécies de riquetsias do GFM, *R. rickettsii* destaca-se por sua alta patogenicidade, seguida pela *R. parkeri*, com patogenicidade moderada, seguida pelas demais com patogenicidade baixa ou indefinida, além daquelas apatogênicas como é o caso da *Rickettsia peacockii* e *Rickettsia montanensis* (WALKER et al., 2008).

Burgdorfer (1970) destacou que, em linhas gerais, as riquetsias patogênicas não são distinguíveis das não patogênicas pelos aspectos morfológicos e bioquímicos. Contudo tanto as riquetsias não patogênicas como as de patogenicidade indefinida apresentam um papel fundamental na epidemiologia da doença, pois carrapatos infectados por riquetsia não patogênica se tornam incapazes de transmitir via transovariana a infecção por outra espécie patogênica (BURGDORFER, 1988; MACALUSO et al., 2002; PACHECO, 2007).

Na FMB causada por *R. rickettsii*, os sintomas iniciais incluem febre, náuseas, cefaléias, mialgias e máculas (GUIMARÃES et al., 2001) que se não instituído o tratamento com antecedência, evolui para infecção generalizada com complicações pulmonares, vasculares, ocorrendo desidratação, choque, coma e óbito do paciente (GALVÃO, 1993). Quando não tratada imediatamente, a FMB por este agente tem letalidade de 30% (ANGERAMI et al., 2006).

Já a FMB causada por *R. parkeri* apresenta-se de forma mais branda e sem letalidade. Alguns estudos têm demonstrado ocorrer variação na sintomatologia da FMB, principalmente pela variedade de agentes. A associação entre febre, cefaléia e exantema compõe a tríade clínica clássica

da FM, sendo descrita nos Estados Unidos com frequência entre 44 e 70% dos casos (DANTAS-TORRES, 2007).

A natureza semelhante das riquetsias confere-lhes um alto grau de dificuldade de identificação, sobretudo quanto à composição da parede celular apresentando grande quantidade de lipopolissacarídeos (LPS); entretanto, a presença das proteínas de membrana externas *OmpA*, específica das bactérias do GFM, e a *OmpB* presente em *R. rickettsii* conferindo-lhe seu potencial patogênico, características antigênicas e imunogênicas, são fundamentais para o diagnóstico sorológico e caracterização gênica (PAROLA et al., 2005; DANTAS-TORRES, 2007; CHEN & SEXTON, 2008; ANGERAMI, 2011).

Em virtude da similaridade entre as espécies e o retardo no diagnóstico e conseqüentemente no tratamento, a taxa de letalidade da doença é alta, principalmente em áreas não endêmicas.

As taxas de letalidade e mortalidade da FM variam entre 10-40% e 20-30%, no Brasil, respectivamente, em virtude principalmente das dificuldades em concluir o diagnóstico com rapidez e estabelecer o tratamento imediato relacionada à sintomatologia pouco específica (GALVÃO et al., 2005; ANGERAMI et al., 2006; CHAPMAN et al., 2006).

2.7 Diagnóstico

O diagnóstico clínico da FM baseia-se na sintomatologia clínica apresentada pelo paciente, tais como os descritos na patogenia, associado à anamnese relacionada sobretudo à exposição do paciente ao vetor e a áreas de riscos como áreas rurais e zonas de mata. O histórico de exposição a carrapatos devem ser levados em consideração, uma vez que são os principais transmissores da bactéria (GASSER et al., 2001).

Contudo a aproximação do *A. cajennense* das áreas urbanas e a demonstração científica da infecção de espécies de “carrapatos urbanos”, como o *R. sanguineus*, tem dificultado a conclusão do diagnóstico, uma vez que torna a FMB uma enfermidade não só de zona rural, mas também do meio

urbano, o que torna necessário a prova laboratorial rápida e eficaz para auxiliar e fechar o diagnóstico.

O diagnóstico laboratorial da FMB se fundamenta principalmente em provas sorológicas (CHEN & SEXTON, 2008). A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda desde 1987 a utilização da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) com antígenos específicos. Constituindo assim, este método como o padrão ouro dentre os métodos sorológicos (WHO, 1988).

A RIFI baseia-se na detecção de imunoglobulinas das classes IgM e IgG, com uma sensibilidade entre 94 a 100% (DUMLER, 1996; PAROLA et al., 2005) e especificidade próxima de 100% quando utilizado antígenos específicos (WALKER, 1989; PAROLA et al., 2005). A IgM é um anticorpo que sugere evidências recentes de exposição a antígenos, contudo seu uso rotineiro é limitado no Brasil, sendo comumente empregado a IgG, anticorpo de memória tardia, que possibilita detectar anticorpos anti-riquétsiais após a segunda semana do início da doença. Portanto, o diagnóstico definitivo poderá ser tardio em alguns casos (LA SCOLA & RAOULT, 1997).

A confirmação do diagnóstico é feito a partir da interpretação da titulação, onde titulações iguais ou superiores a 1:64 em única amostra, ou uma diferença mínima de quatro vezes o título entre amostras de soro pareadas, coletadas com intervalo de duas a quatro semanas, confirmam o diagnóstico (BRASIL, 2005). 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).

Galvão et al. (2005) ressalta que a RIFI apesar de ser um teste altamente sensível, não distingue as espécies testadas, em virtude da possibilidade de reação cruzada. Entretanto, quando utilizado antígeno específico, o título resultante é mais elevado (PHILIP et al., 1978).

Outros métodos sorológicos, como Fixação de Complemento (FC), hemaglutinação indireta (HI) e *Western-blot* (WB) já foram padronizados, mas

tem seu uso limitado à pesquisas científicas (WAKLER, 1998; PAROLA et al., 2005; CHEN & SEXTON, 2008; ANGERAMI, 2011).

Os métodos de diagnóstico direto empregados são Isolamento em Cultura de Células e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

O isolamento de riquetsias é considerado o exame mais apropriado para identificação da espécie infectante (PAROLA et al., 2005; CHEN & SEXTON, 2008; ANGERAMI, 2011); entretanto, as características intrínsecas do agente predispõe as dificuldades técnicas e operacionais comprometendo seu emprego no cotidiano. Ainda mais, não são cultivadas em meios artificiais rotineiramente empregados na microbiologia, sendo viável seu cultivo apenas em meios de culturas de células ou inoculação em animais (PAROLA et al., 2005).

Para realizar o isolamento do patógeno, utiliza-se plasma, triturado de coágulo, biópsia de pele, tecidos de necropsia e mesmo os artrópodes (LABRUNA, 2006). O isolamento em cultivo celular é realizado em células Vero geralmente associada à técnica de “Shell Vial”, que favorece a penetração da bactéria para o interior da célula. Este procedimento tem permitido alcançar bons índices de isolamento. A desvantagem é que este procedimento pode levar algumas semanas (RAOULT & PAROLA, 2007).

O emprego da biologia molecular, através de PCR e sequenciamento para detecção e identificação de riquetsias, tem sido utilizado em diversos laboratórios. O método se baseia na amplificação dos genes Citrato sintase, *OmpA* e *OmpB*.

A PCR fornece resultados rápidos e é a prova de eleição para um diagnóstico precoce, fornecendo resultado antes da soroconversão (LA SCOLA & RAOULT, 1997). Entretanto, a utilização desta técnica para detecção de *Rickettsia* spp. em sangue de animais vertebrados normalmente é rara, pois o período de riquetsemia dura poucos dias, resultando na migração da bactéria para seu sítio de ação, as células do endotélio vascular (BURGDORFER, 1988). Em contrapartida a detecção de *Rickettsia* spp. através da PCR em espécies de carrapatos tem sido amplamente utilizada em estudos epidemiológicos ou em surtos de riquetsioses.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Detectar e caracterizar *Rickettsia*, e identificar os principais ectoparasitas potencialmente vetores de patógenos em equinos do grupamento racial “cavalo baixadeiro” da região da Baixada Maranhense.

3.2 Específicos

Verificar o manejo sanitário e nutricional dos cavalos baixadeiros;

Detectar *Rickettsia* em cavalo baixadeiro através de RIFI;

Identificar os principais ectoparasitas de equinos da Baixada Maranhense;

Detectar, por meio de PCR, *Rickettsia* em ectoparasitas potencialmente vetores de patógenos;

Sequenciar e caracterizar *Rickettsia* em ectoparasitas de cavalos;

Fornecer dados epizootiológicos aos órgãos de defesa e saúde animal.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local

A microrregião da Baixada Maranhense está inserida na Mesorregião Norte Maranhense, sob as coordenadas 01°59'-04°00'S; 44°00'-45°33'W, abrangendo uma área total de 17.579,366 Km², com uma população total estimada de 518.241 habitantes distribuídas em 21 municípios (IBGE, 2011). A Baixada Maranhense caracteriza-se por possuir um relevo plano suavemente ondulado, com extensos campos rebaixados inundáveis durante o período chuvoso, constituindo o maior conjunto de bacias lacustres da região Nordeste do Brasil. Constitui-se ainda, como área de preservação ambiental (APA) (Figura 1), banhada pelos rios Mearim, Pindaré, Pericumã, Turiaçu, Grajaú e Aurá. A região possui extensos conjuntos de lagos e lagoas naturais, denominados também de pantanal amazônico, que incorpora uma complexa interface de ecossistemas, abrigando rica fauna e flora aquática e terrestre (PINHEIRO et al., 2005). Apresenta temperatura média anual de 26 a 27 °C, com proximidade marítima que exerce grande influência na temperatura do ar contribuindo para os elevados valores anuais de umidade relativa do ar em torno de 79 a 82% e índices pluviométricos que variam de 2000 a 2400 mm durante o ano.

Foram coletadas amostras em equinos dos municípios de Santa Helena, Pinheiro e Viana. O processamento das amostras foi realizado no Laboratório da Fazenda Escola de São Bento/UEMA, no Laboratório de Parasitologia Veterinária do Curso de Medicina Veterinária/UEMA e no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP).

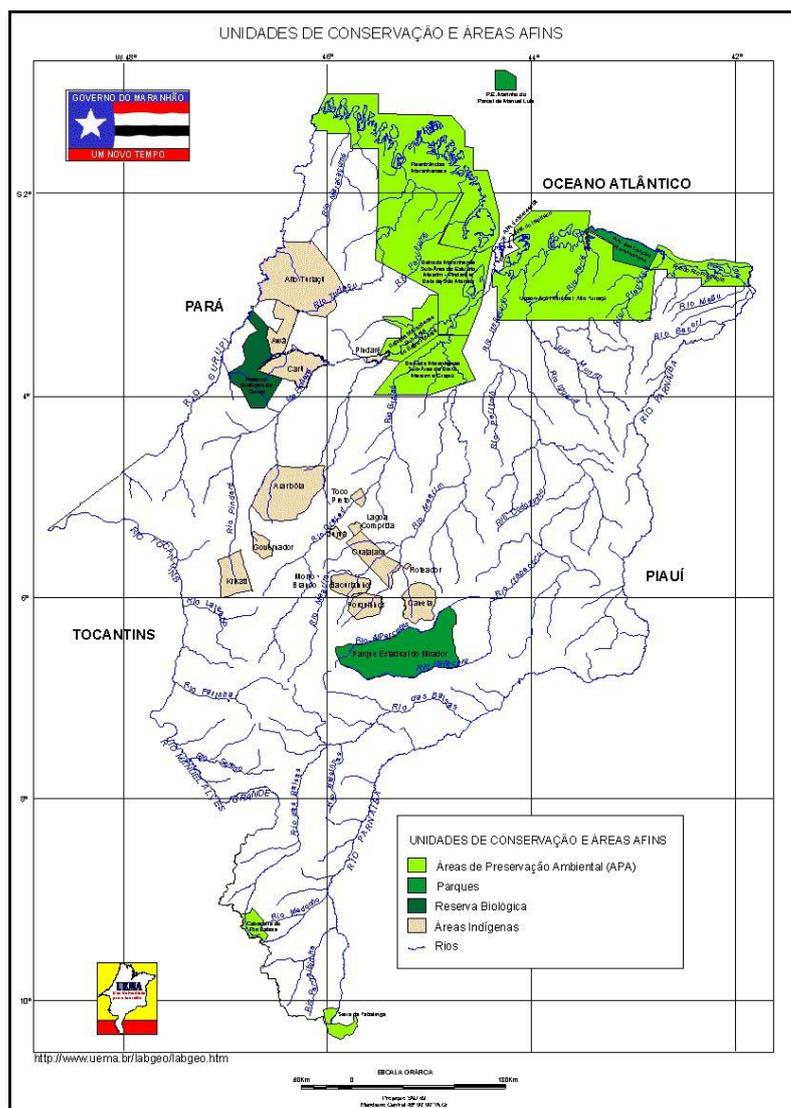


Figura 1. Áreas de Preservação Ambiental do Estado do Maranhão. Fonte: [HTTP://www.uema.br/labgeo/labgeo.htm](http://www.uema.br/labgeo/labgeo.htm)

4.2 Animais

No período de maio de 2011 a maio de 2012 foram amostrados 258 equinos do grupamento racial “cavalo baixadeiro”, independente de sexo, idade e estado fisiológico e submetidos ao mesmo sistema de manejo. Para cada animal amostrado foi preenchido um questionário individual contendo informações sobre manejo sanitário e nutricional fornecidas pelos criadores. Os

cavalos baixadeiros são popularmente conhecidos pela sua baixa estatura, porte físico pequeno, grande força e ao mesmo tempo leveza.

4.3 Coleta de sangue e diagnóstico indireto de *Rickettsia*

Foram coletados diretamente da veia jugular 5mL de sangue utilizando agulha hipodérmica para tubo a vácuo. As amostras foram centrifugadas a 3600 giros por cinco minutos para obtenção do soro sanguíneo e, em seguida, aliquotados em microtubos do tipo eppendorf, em duplicata, previamente identificados e acondicionados a -20°C até a realização da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para o gênero *Rickettsia*.

Para a pesquisa de *Rickettsia* utilizou-se os antígenos das espécies *Rickettsia rickettsii* (cepa Taiaçu), *Rickettsia amblyommii* (cepa Ac37) e *Rickettsia bellii* (cepa Mogi) Labruna et al. (2007). Na triagem os soros foram testados inicialmente na diluição de 1:64 contra antígenos das espécies acima descritas e, no caso de reação positiva, diluições seriadas foram realizadas até a obtenção da titulação final segundo protocolo descrito por Horta et al. (2004).

4.4 Coleta e PCR dos carrapatos

Os animais amostrados foram inspecionados visual e manualmente para a pesquisa de ectoparasitas e quando presentes eram coletados e acondicionados em frascos contendo álcool a 70% como conservante e identificados de acordo com o animal amostrado, para posterior identificação morfológica. Para identificação dos carrapatos foi utilizada lupa estereoscópica seguindo critérios morfológicos da chave descrita por Barros-Battesti et al. (2006).

Após a identificação os espécimes de carrapatos foram preservados em álcool isopropílico para conservação até o momento da extração do ácido

desoxirribonucleico (DNA) pelo método de Isotiocianato de Guanidina (GT) descrito por Chomekzynski (1993), adaptado por Sangioni et al. (2005).

Os carrapatos foram processados individualmente, considerando espécie, sexo e estágio, e testados por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) com os seguintes iniciadores CS-78 e CS-323 para fragmento de 410pb do gene Citrato Sintase (*gltA*) de *Rickettsia* spp. segundo Labruna et al. (2004).

As amostras de DNA positivas para o gene *gltA* foram submetidas ao segundo teste de PCR, utilizando os iniciadores Rs190.70p e Rs 190.602n para fragmentos do gene *outer membrane protein A (OmpA)* (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição dos iniciadores utilizados nos testes de PCR para diagnóstico de *Rickettsia* sp. em carrapatos coletados de equinos amostrados no período de maio de 2011 a maio de 2012 na região da Baixada Maranhense, MA

Gene alvo	Especificidade	Sequência dos iniciadores (5' → 3')	Fragmento amplificado (pb)	Referência
<i>gltA</i>				
CS-78	Gênero <i>Rickettsia</i>	GCAAGTATCGGTGAGGATG	401	Labruna et al., 2004
CS- 323		TAAT GCTTCCTTAAAATTCAATAA ATCAGGAT		
<i>OmpA</i>				
Rr 190.70	Grupo da Febre Maculosa	ATGGCGAATATTTCTCCAAA A	632	Regnery et al., 1991
Rr 190.701		GTTCCGTTAATGGCAGCAT CT		

4.5 Sequenciamento de Nucleotídeos

Os fragmentos de PCR positivos sugestivos para riquetsias foram purificados utilizando o kit ExoSAP-IT (USB[®] Corporation), seguindo instruções

do fabricante (2µl de ExoSAP e 5 µl de DNA amplificado) em seguida as amostras foram colocadas no termociclador nas temperaturas de 37°C por 15 minutos e 80°C por mais 15 minutos. Posteriormente os fragmentos de PCR purificados submetidos ao seqüenciamento direto de DNA, utilizando o kit “Big Dye 3.1”, de acordo com instruções do fabricante (4 µl de DNA purificado – concentração máxima de 100ng, 1 µl de água miliQ, 0,75 µl de “Big Dye”, 1 µl de iniciadores específicos e 3,25 µl de “save money”) em sequenciador automático ABI 377 (Applied Biosystem, Foster, CA). As seqüências obtidas foram submetidas a análise sistêmica do *software* BLAST *analysis* (ALTSCHUL et al., 1990) para determinação da homogeneidade com outras espécies de riquetsias.

4.6 Análise Estatística

Os resultados foram analisados através de tabelas de contingências com as diferentes variáveis. A comparação dos dados foi feita pelo teste Qui-Quadrado e cálculo de “*Odds Ratio*” para cada variável. Para os testes estatísticos foi utilizado o programa computacional Epilnfo versão 6 de 1993 e versão 3.4.3 de 2007.

4.7 Comitê de Ética

Esta pesquisa foi desenvolvida dentro dos padrões e normas do Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Estadual do Maranhão, sob o número de protocolo 011/2012, sendo aprovado, por atender as normas da Resolução do CFMV nº1000/2012 e a Lei nº 11794/2008. Segue em anexo a declaração do CEEA/UEMA.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de 258 equinos amostrados, 37 animais, representando 14,34%, eram do município de Santa Helena, 60 (23,26%) do município de Viana e 161 (62,40%) de Pinheiro.

Com base no questionário aplicado aos criadores e tratadores dos animais pesquisados, o rebanho de cavalo baixadeiro criado no sistema extensivo é predominantemente formado por fêmeas com 64,34% em relação aos machos, que representaram 35,66% dos animais amostrados, 166 e 92, respectivamente. Isso se deve ao tipo de exploração praticada na região, em que geralmente as fêmeas são retidas no plantel para reprodução, como matrizes e as potranças para reposição, enquanto os potros nascidos, em sua maioria são comercializados para auxiliar no manejo do rebanho bovino e bubalino, de modo que, uma pequena parcela dos machos remanescentes ao lote é destinada a reprodução e reposição de garanhão. A caracterização da exploração dos equinos é demonstrada na figura 2.

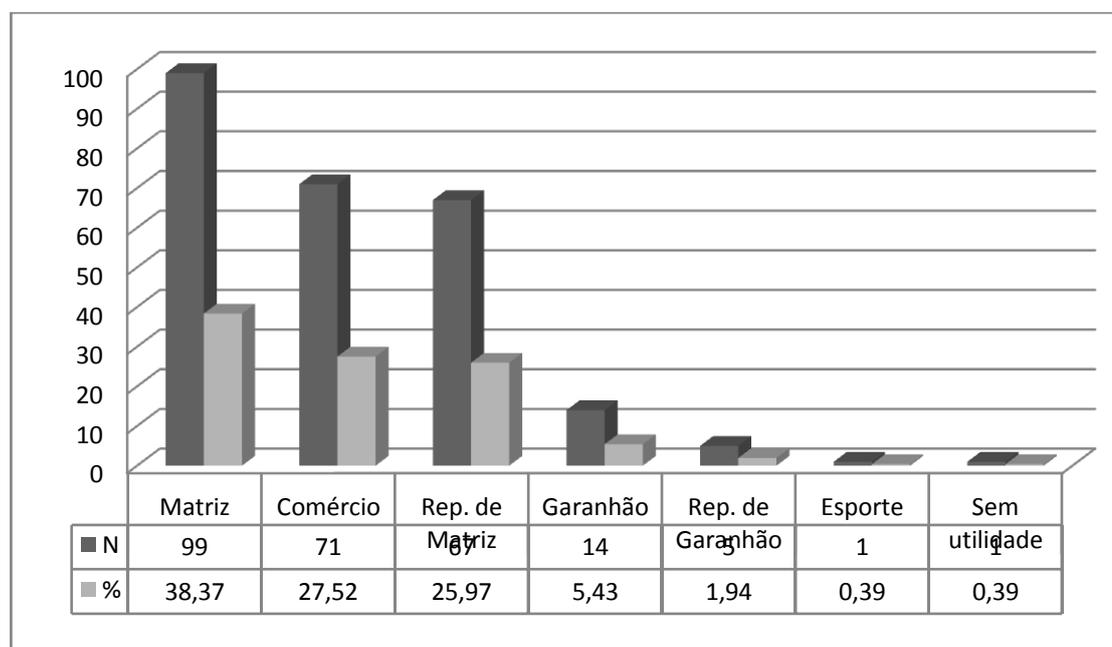


Figura 2. Caracterização da exploração, quanto à utilidade, de 258 equinos amostrados no período de maio de 2011 a maio de 2012 na região da Baixada Maranhense, MA.

O sistema de criação do cavalo baixadeiro é predominantemente extensivo, onde os animais são divididos em lotes liderados por um garanhão cada, convivendo livres nos campos inundáveis da baixada, com escassez de manejo nutricional e deficiência no manejo sanitário. Verificou-se que os 258 (100%) cavalos amostrados alimentavam-se basicamente de pastagem nativa *Paratheria próstata* (capim-marreca), uma pequena parte, cerca de 3,88% (10) e 3,49% (9) alimentavam-se concomitantemente de milho e capim quicuío (*Pennisetum clandestinum*), respectivamente.

Quanto ao manejo sanitário, 231 (89,53%) equinos não eram vacinados para nenhum patógeno, e somente 27 (10,47%) animais receberam algum tipo de vacina, dos quais 100% dos animais vacinados recebiam doses de imunógenos para toxóides de *Clostridium botulinum*.

Quanto às doenças parasitárias, o manejo sanitário caracterizou-se pelo emprego de endoparasiticidas e ectoparasiticidas. Um total de 94 equinos, compreendendo 36,43% do rebanho foram vermifugados, sendo a Doramectina injetável e azeite de andiroba (*Carapa guianensis Aubl.*) por via oral empregados em 41 e 37 animais (43,62 e 39,36%), respectivamente. Relatou-se administração de pasta oral a base de Febendazol em 16 animais (17,02%) do rebanho vermifugado. Todavia, 164 (63,57%) equinos não eram vermifugados. Estes dados ratificam a deficiência e inadequação do manejo sanitário empregado e ignora a aplicação da vermifugação estratégica, predispondo os animais a várias enfermidades.

Santos et al. (2005) obtiveram taxas de 80 e 100% de vermifugação, em propriedades de criação de cavalo pantaneiro no estado de Mato Grosso, no sistema extensivo e semi-intensivo, respectivamente. Estes autores realizaram inquérito investigativo considerando apenas as propriedades, diferindo dessa pesquisa na qual foi investigado por animal amostrado. Além disto, o sistema de criação do cavalo baixadeiro difere-se do cavalo pantaneiro, embora haja semelhança no ambiente dos campos inundáveis, uma vez que as propriedades no pantanal mato-grossense são delimitadas. Os autores relatam ainda que a maioria das fazendas amostradas possuíam entre 5.000 e 25.000 hectares. Diferindo-se dos campos da baixada maranhense, onde os cavalos

baixadeiros são criados soltos, sem delimitações físicas, ou seja, animais de vários proprietários coabitam no mesmo espaço em constante contato, característica intrínseca do manejo da Baixada Maranhense.

Quanto ao uso de drogas ectoparasiticidas, 60,85% dos animais amostrados foram submetidos à aplicação de produtos com esta finalidade, e em 39,15% não foram administradas quaisquer drogas. Valores semelhantes foram observados por Santos et al. (2005) em fazendas do Pantanal, Mato Grosso, onde obtiveram taxas de 60 e 80% para o sistema extensivo e o semi-intensivo, respectivamente. Um dos fatores que sugerem o alto índice de aplicação de produtos ectoparasiticidas comparado à vacinação e a vermifugação, é a visualização macroscópica do ectoparasita associada ao baixo custo do tratamento empregado.

As drogas químicas empregados no controle de ectoparasitas compreendiam basicamente os concentrados a base de Cipermetrina para pulverização e Fosforados associados à Violeta Genciana, representando 28,66% para ambos; além do endectocida Doramectina. A maioria dos criadores utilizava como controle de ectoparasitas uma formulação empírica a base de solução tópica de duas partes de óleo queimado para uma parte de cresol (2:1), aplicada no pavilhão auricular e região perianal, totalizando 67,52% (106) dos casos investigados. O que demonstra a deficiência do manejo associada à falta de informações técnicas e assistência veterinária, uma vez que o uso desta formulação além de não possuir resultados científicos comprovados, pode causar sérios danos à saúde do animal, como alergias, dermatites, intoxicações ou até mesmo otites graves.

Ressalta-se que a região anatômica utilizada nessa forma de tratamento sugere não apresentar efeito sob o ixodídeo *A. cajennense*, haja vista, que este é mais frequente na região peitoral, inguinal e cabeça, sendo ocasionalmente encontrado no pavilhão auricular, microhabitat este característico do *Dermacentor nitens*.

Em virtude da falta de um manejo adequado para controle de carrapatos, e, sendo estes veiculadores de vários patógenos, tais como *Babesia* e *Rickettsia*, estes animais estão sempre expostos ao risco de

contraírem diversas infecções. As riquetsias são consideradas uma doença de ameaça de emergência global (LIM et al., 2012).

Das 258 amostras de soro submetidas à RIFI, 152 amostras foram sororreagentes, representando assim, 58,91% das amostras testadas para o gênero *Rickettsia*. Recentes estudos realizados no estado do Piauí apontaram 52,3% de equídeos sororreagentes (LOPES, 2012). Demonstrando assim uma similaridade na ocorrência de *Rickettsia* sp. no Maranhão e Piauí com alta prevalência em áreas não endêmicas, sugerindo, portanto a circulação da bactéria nesses estados. Medeiros (2010), detectando anticorpos anti-riquetsias do GFM em equinos do estado de Santa Catarina obtiveram taxa de 18,66% de animais soropositivos.

As 152 amostras reagiram a pelo menos um dos antígenos testados (*R. rickettsii*, *R. amblyommii* e *R. bellii*), desse modo 77 (50,66%) das reações foram inconclusivas para a determinação do provável antígeno. Já em 39 amostras (25,66%) as reações apontaram para *R. amblyommii* como provável antígeno. Enquanto, em 36 amostras (23,68%) as reações determinaram *R. bellii* como provável antígeno reagente. Desta forma duas espécies foram sugestivas através da RIFI com títulos quatro vezes maior em relação às outras espécies testadas (Figura 3).

Recentes estudos direcionados a investigação sorológica de *Rickettsia* sp. foram desenvolvidas no Maranhão. Costa (2011), pesquisando a soroprevalência de *Rickettsia* em cães da microrregião de Chapadinha obteve 18,9% (61/322) das amostras sororreagentes e *R. amblyommii* como provável antígeno responsável pela infecção natural, naquela região. Enquanto, Silva (2012), também em cães, obteve 1,67% (5/300) das amostras reagentes para alguma espécie de *Rickettsia*, onde determinou *R. rickettsii* como provável antígeno em uma amostra de soro, *R. amblyommii* em duas amostras de soro e as outras duas inconclusivas para determinação do provável antígeno.

Ao considerar o papel epidemiológico das espécies já estudadas no Maranhão, os equinos são considerados reservatórios e quase não apresentam sinais de FMB quando comparado aos cães, Haydon et al. (2008) não observaram manifestações clínicas por *Rickettsia* em equinos, além disto, os

animais amostrados nessa pesquisa possuem um importante papel de reservatório de *Rickettsia*. Em cães os casos clínicos de FM por *R. rickettsii* já foram descritos nos Estados Unidos (McDADE & NEWHOUSE, 1986). No Brasil, Piranda et al. (2008) descreveram os sintomas clínicos em cães após infecção experimental por *R. rickettsii*. Posteriormente, Labruna et al. (2009) reportaram os primeiros casos de infecção natural em cães provenientes do estado de São Paulo. Tais relatos elucidam a maior prevalência de animais soropositivos em equinos em detrimento dos cães, uma vez que os equinos não sofrem alterações clínicas aparente, demonstrando assim maior resistência a infecção por riquetsias.

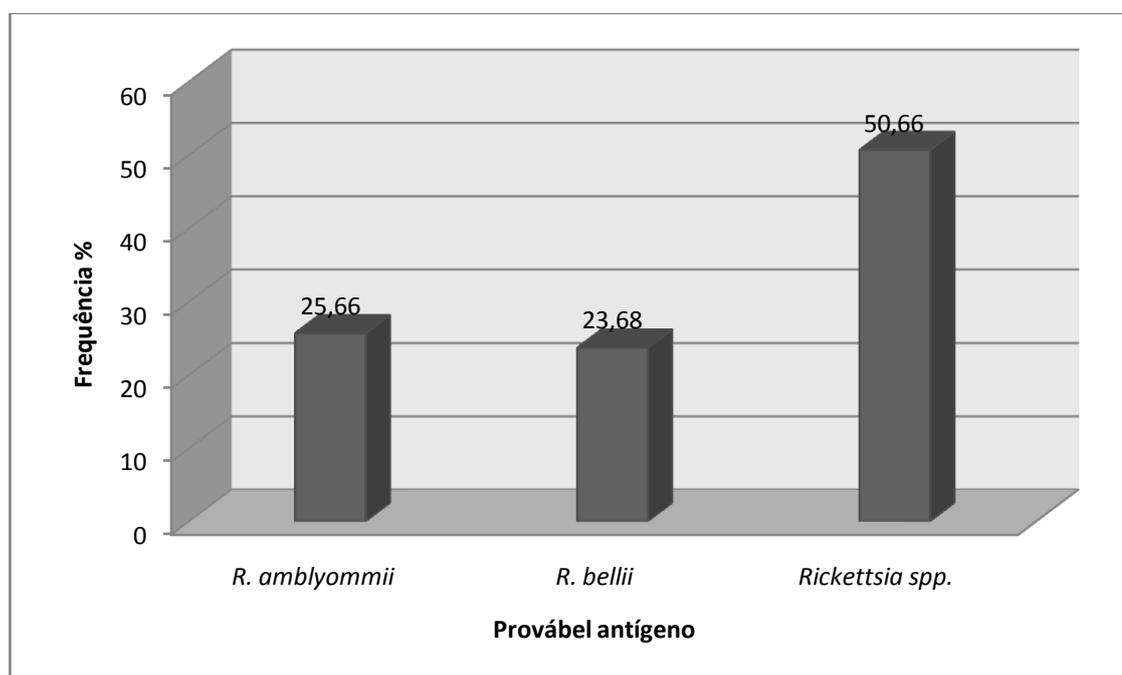


Figura 3. Determinação do provável antígeno de *Rickettsia* pela Reação de Imunofluorescência Indireta em amostras sororreagentes de equinos da Baixada Maranhense, MA

Considerando os três municípios amostrados, dos 152 soros que reagiram, 15,79%, das amostras eram do município de Santa Helena que apresentou ocorrência de 64,86% (24/37), 65,79%, com 100 amostras de Pinheiro que apresentou ocorrência de 62,11% (100/161) e 18,42% (28

amostras) oriundos de Viana, cuja ocorrência foi de 46,66% (28/60), considerando o número de amostras sororreagentes e o número de animais amostrados no município. Desta forma, não foi observado diferenças estatísticas entre os municípios ($p>0,05$) (Tabela 2). Demonstrando, portanto, a semelhança das áreas pesquisadas quanto à exposição do equino e o risco uniforme que este animal possui para contrair riquetsias, em virtude principalmente do manejo e do ambiente que se encontra.

Tabela 2. Distribuição das amostras sororreagentes considerando os municípios pesquisados no período de maio de 2011 a maio de 2012 na região da Baixada Maranhense, MA

Município	Amostras reagentes por município pesquisado		Amostras reagentes considerando total de amostras positivas	
	N	%	N	%
Santa Helena ^a	24	64,96	24	15,79
Pinheiro ^a	100	62,11	100	65,79
Viana ^a	28	46,66	28	18,42

1. Santa Helena X Pinheiro: $p>0,99$

2. Santa Helena X Viana: $p>0,43$

3. Pinheiro X Viana: $p>0,33$

a. Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si.

A maior titulação observada foi de 1:2048 em uma amostra de soro de Pinheiro, com provável antígeno da espécie *R. amblyommii*. A titulação mais frequente foi de 1:256 para *R. bellii* em 41 amostras. Ainda para esta espécie, a maior titulação registrada foi 1:512 em 27 oportunidades. Já para *R. amblyommii* as titulações 1:128 e 1:256 se repetiram 36 vezes. Observou-se em *R. rickettsii* titulação de 1:64 em quatro amostras e 1:128 em cinco amostras (Figura 4).

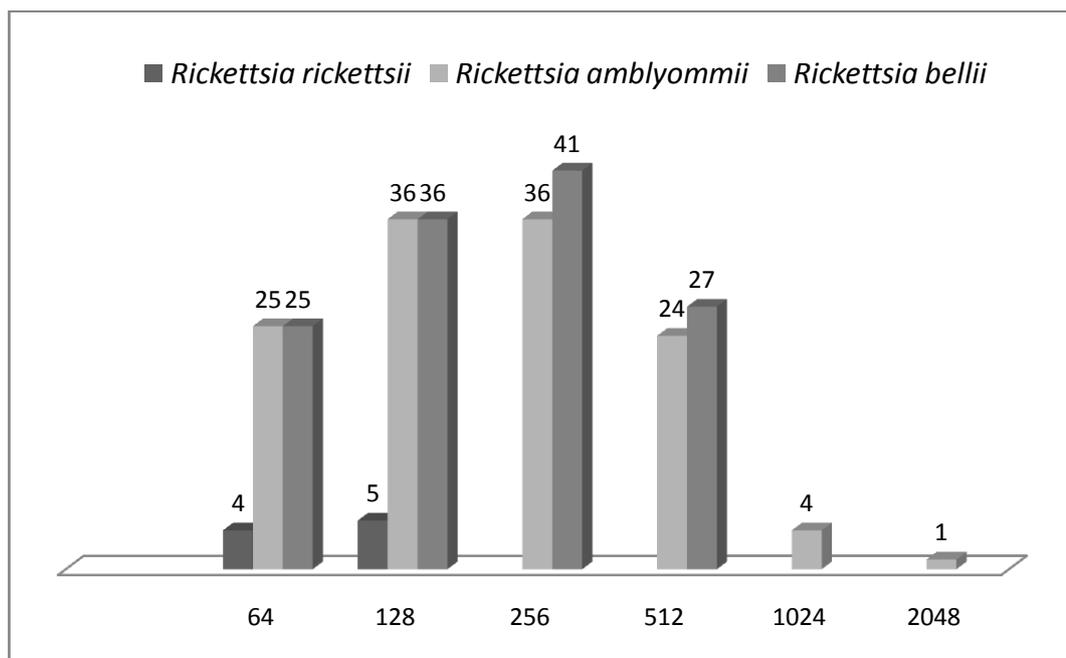


Figura 4. Titulação máxima e mínima para as três espécies de *Rickettsia* sp. testadas pela Reação de Imunofluorescência Indireta em amostras sororreagentes de equinos da Baixada Maranhense, MA

Observando isoladamente a titulação encontrada nas 152 amostras sororreagentes, considerando as três espécies testadas, verificou-se ocorrência de 5,92% (9/152) para *R. rickettsii*, 82,89% (126/152) para *R. amblyommii* e 84,87% (129/152) para *R. bellii*, sendo o primeiro registro de titulação positiva para estas espécies em equinos no Maranhão. Ressalta-se que não há evidências de que *R. bellii* seja patogênica para homem e animais, entretanto possui grande importância na epidemiologia da FMB, uma vez que infectando os carrapatos não permite que os mesmos transmitam via transovariana uma outra espécie patogênica (BURGDORFER, 1988), garantindo assim níveis baixos de transmissão vertical da bactéria nos carrapatos.

Diversos estudos realizados em áreas endêmicas tem demonstrado o papel do equino como reservatório de riquetsias causadoras da FMB. Horta et al. (2004), estudando a soroprevalência da FMB em áreas endêmicas de São Paulo, registraram taxas de 77% para *R. rickettsii* com títulos variando entre 64 a 4.096. Os valores reportados pelo autor considerando áreas

endêmicas possuem similaridade com outros trabalhos nessa mesma região. Sangioni et al. (2005), avaliando a soroprevalência da FMB em propriedades de áreas endêmicas e não endêmicas do estado de São Paulo registraram variação entre 57 a 90% em propriedades de áreas endêmicas. Tais resultados sugerem a integração hospedeiro, vetor e agente etiológico com o ambiente, resultando em taxas mais elevadas em áreas endêmicas quando comparada com áreas não endêmicas. Uma vez que o mesmo Estudo realizado por Sangione et al. (2005) não registraram equinos sororreagentes nas propriedades de áreas não endêmicas. Além disto, a titulação reportada nesta pesquisa apontam valores muito abaixo dos relatados por Horta et al. (2004), que permite implicar que o cavalo no Maranhão não é um eficiente hospedeiro amplificador para este patógeno.

Moraes-Filho et al. (2009), avaliando a soroprevalência de *R. rickettsii* em equinos do Centro de Controle de Zoonoses do municípios de São Paulo, observaram taxas de 17,5%. Achado bastante inferior a outros estudos de áreas endêmicas, todavia os animais amostrados por estes autores são oriundos de centros urbanos, que por sua vez, são áreas com menor frequência de *A. cajennense*, onde o carrapato mais abundante é o *Amblyomma aureolatum*, que tem como principal hospedeiro os cães, sugerindo portando a redução da infecção em equinos.

Quanto à presença de ectoparasitas, constatou-se somente infestação por carrapatos. Sendo que 220 (85,27%) dos animais estavam infestados por uma ou mais espécies, enquanto 38 animais (14,73%) não foram observados infestação por ectoparasitas. Foram identificados carrapatos das espécies, *D. nitens*, *A. cajennense* e *R. (B.) microplus* (Figura 5).

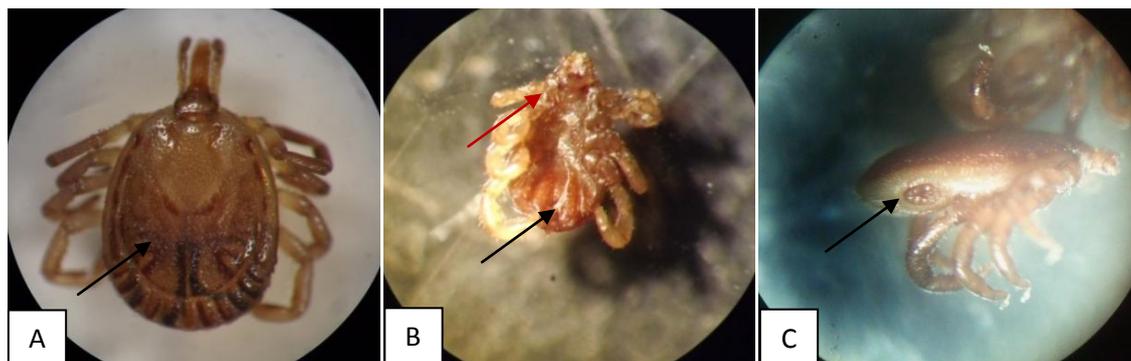


Figura 5. A – *Amblyomma cajennense* macho e seu escudo ornamentado (seta); B – *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* macho, observa-se os dois pares de placas adonais (seta preta) e capítulo em forma de hexágono (seta vermelha); C – *Dermacentor nitens* macho, placa espiracular característica (seta).

D. nitens destacou-se com parasitismo em 217 animais (98,64%) fato este já esperado, uma vez que este carrapato possui completa especificidade com o hospedeiro, sendo este encontrado não só em seu micro habitat, o pavilhão auricular, como também em outras regiões do corpo, tais como chanfro, crina, peito, região perianal e pélvica, em alta infestação. A alta taxa de infestação por ixodídeos demonstra a ineficiência do controle de carrapatos realizado no cavalo baixadeiro.

Verificou-se também parasitismo em quatro animais (1,82%) por *R. (B) microplus*. Ressalta-se ainda, que em nenhum dos casos de infestação por *R. (B) microplus* foi verificado o monoparasitismo, e em todos os eventos, estava associado ao *D. nitens* com índice de afinidade parasitária de 0,036 (SERRA-FREIRE, 2002), sugerindo, portanto uma baixa afinidade parasitária com os equinos.

O primeiro relato, no Brasil, do parasitismo natural de *R. (B) microplus* em equinos foi realizado por Rohr (1909). O parasitismo por esse carrapato ocorre em diversos estados do Brasil (ARAGÃO, 1936). Contudo em equinos, o parasitismo por esta espécie sugere alterações em seu ciclo biológico. Em estudos experimentais verificando o parasitismo de *R. (B) microplus* em equinos, Franque et al. (2009) concluíram que este carrapato apresenta alterações em sua biologia, caracterizada principalmente pelo

aumento do período parasitário e pela diminuição na taxa de recuperação de teleóginas. Este achado corrobora aos trabalhos reportados por Bittencourt et al. (1990) que não obtiveram recuperação de teleóginas a partir da inoculação de larvas de *R. (B.) microplus* em equinos.

Verificou-se ainda que 10 animais (4,55%) apresentaram infestação por *A. cajennense*. Em apenas três animais (1,36%) ocorreram monoparasitismo por apenas esta espécie de carrapato (Tabela 3).

Diversos estudos tem reportado o parasitismo em equinos pelas três espécies de carrapatos identificadas neste estudo. Martins et al. (2008) estudando o ectoparasitismo em éguas da raça Mangalarga Machador no Rio de Janeiro, obteve a frequência de 82,5 e 17,% para as espécies *A. cajennense* e *D. nitens*, respectivamente. No entanto, Labruna et al. (2001 e 2002) encontraram 50 e 95%, respectivamente, para as espécies *A. cajennense* e *D. nitens*. Esses resultados demonstram a especificidade entre *A. cajennense* e os equinos, que em muitos trabalhos é reportado como principal hospedeiro desse carrapato, colocando-os como os principais hospedeiros amplificadores da FMB em áreas endêmicas.

Contudo, no Maranhão Guerra & Brito (2004) encontraram apenas as espécies *D. nitens* e *R. (B.) microplus* em equinos da Ilha de São Luis e esta última em apenas um equino. Os resultados aqui apresentados corroboram com os achados de Guerra & Brito (2004), embora o presente estudo tenha registrado a ocorrência de *A. cajennense* na taxa 4,55%, esses dois estudos no Maranhão sugerem que *A. cajennense* se comporta diferente nesta região. Ressalta-se ainda que o registro desse carrapato em um estudo e a ausência em outra é reportada em virtude da origem dos animais, Guerra & Brito (2004) amostraram animais da Microrregião da Aglomeração Urbana de São Luis, enquanto a presente pesquisa foi realizada em equinos da Microrregião da Baixada Maranhense, onde os animais são criados extensivamente, livres nos campos com maior contato com zonas de mata, ambiente este favorável ao *A. cajennense*.

Tabela 3. Distribuição quanto a infestação por carrapatos considerando o tipo de parasitismo em equinos no período de maio de 2011 a maio de 2012 na região da Baixada Maranhense, MA

Tipo de parasitismo		
Espécie de carrapato	Monoparasitismo	
	N	%
<i>D. nitens</i>	206	93,64
<i>A. cajennense</i>	3	1,36
Espécie de carrapato	Associações	
	N	%
<i>D. nitens</i> e <i>A. cajennense</i>	7	3,18
<i>D. nitens</i> e <i>R. (B.) microplus</i>	4	1,82

Utilizou-se um total de 115 carrapatos adultos machos e fêmeas, sendo 92 de *D. nitens*, 18 de *A. cajennense* e cinco de *R. (B.) microplus* os quais foram processados individualmente para obtenção do DNA (Tabela 4) para pesquisa de *Rickettsia* sp. nos carrapatos foi realizada a PCR das três espécies de carrapato identificadas.

Tabela 4. Quantitativo de carrapatos coletados em equinos da Baixada Maranhense, no período de maio de 2011 a maio de 2012, submetidos à Reação em Cadeia de Polimerase

Ixodideos				
Município	<i>D nitens</i>	<i>A. cajennense</i>	<i>R. (B.) microplus</i>	TOTAL
Pinheiro	50	4	2	56
Viana	27	10	0	37
Santa Helena	15	4	3	22
TOTAL	92	18	5	115

Todas as amostras 115 de DNA obtidas pelo método de extração com o GT, foram submetidas à PCR com os seguintes iniciadores CS-78 e CS-323 para fragmento de 410pb do gene citrato sintase (*gltA*) presente em *Rickettsia* spp. Estes iniciadores são utilizados para triagem, pois os mesmos selecionam todas as espécies de *Rickettsia*, tanto as do GT quanto as do GFM. As 92 amostras de *D. nitens* testadas não tiveram reação, indicando que estes carrapatos não albergavam as riquetsias, assim como os cinco exemplares de *R. (B) microplus*. Contudo das 18 amostras de DNA de *A. cajennense* três estavam positivas para *Rickettsia* sp. (Figura 6).

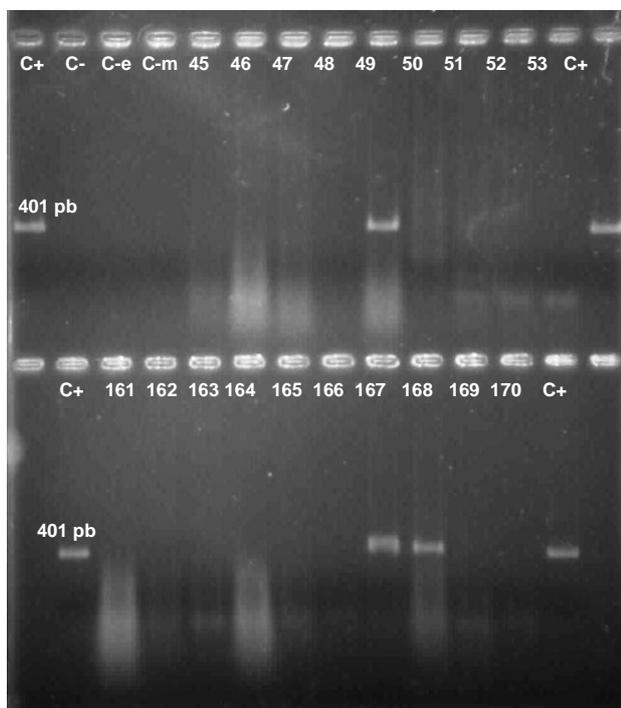


Figura 6. Gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. Leitura da PCR utilizando os iniciadores CS-78 e CS-323 para fragmento de 410pb do gene citrato sintase (*gltA*) de *Rickettsia* spp. sob luz ultravioleta. Reação positiva para amostras 49, 167 e 168. Sendo C+: controle positivo; C-: controle negativo; C-e.: controle de extração; C-m: controle do mix.

As amostras positivas para os iniciadores CS-78 e CS-323 foram submetidas ao segundo teste de PCR utilizando os iniciadores Rs 190.70p e Rs 190.602n para fragmentos do gene *OmpA*, segundo Labruna et al. (2004) iniciadores específicos para riquetsias do GFM. Em cada teste, foram utilizados controles negativos à base de água miliQ livre de DNA e controles positivos de *R. parkeri* cepa NOD. As três amostras submetidas ao novo teste de PCR foram positivas (Figura 7), sendo, portanto estes oligonucleotídeos submetidos ao sequenciamento genético para determinação da espécie das três amostras testadas.

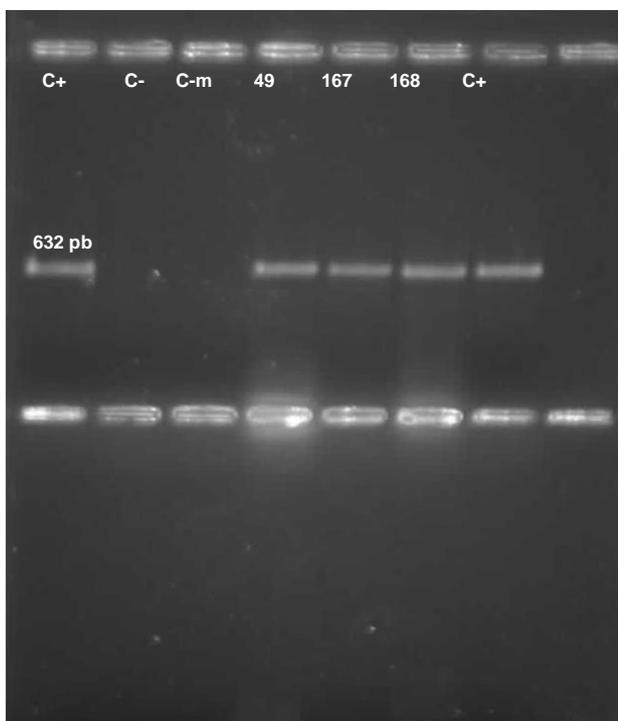


Figura 7. Gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. Leitura da PCR utilizando os iniciadores Rs190.70p e Rs 190.602n para fragmentos do gene *outer membrane protein (OmpA)*, de *Rickettsia* sp. do GFM sob luz ultravioleta. Reação positiva para amostras 49, 167 e 168. Sendo C+: controle positivo; C-: controle negativo; C-m: controle do mix.

Os fragmentos de PCR das três amostras positivas tanto para os genes *gltA* e *OmpA* foram submetidos ao sequenciamento genético. Todas as amostras sequenciadas obtiveram 100% de grau de similaridade com *R. amblyommii*.

A amostra 1 apresentou 100% de similaridade com “*Candidatus Rickettsia amblyommii strain AcaIII citrate synthase (gltA) gene, partial cds*” (GenBank accession nº AY375163) (LABRUNA et al., 2004a) e “*Candidatus Rickettsia amblyommii str. GAT-30V, complete genome*” (GenBank accession nº CP003334.1) para o gene *gltA*, no entanto, para o gene *OmpA* identificou-se as cepas “*Candidatus Rickettsia amblyommii str. GAT-30V, complete genome*” (GenBank accession nº CP003334.1) e “*Candidatus Rickettsia amblyommii outer membrane protein A (OmpA) gene, partial cds*” (GenBank accession nº GQ891955) (OGRZEWALSKA et al., 2010), com grau de similaridade de 100% e 99%, respectivamente; entretanto a cobertura de consulta foi de 99% em ambas. As divergências quanto as cepas registradas baseia-se na quantidade de pares de bases identificados depositadas no *GenBank*, uma vez que quanto maior a quantidade de pares de bases, mais fiel será o resultado da similaridade entre as mesmas.

A amostra 2 apresentou 100% de identidade com “*Candidatus Rickettsia amblyommii strain. GAT-30V complete genome*” (GenBank accession nº CP003334.1) para o gene *gltA*; enquanto, para o gene *OmpA* identificou-se “*Candidatus Rickettsia amblyommii outer membrane protein A (OmpA) gene, partial cds*” (GenBank accession nº GQ891955.1) (OGRZEWALSKA et al., 2010) com 100% de similaridade.

Resultado semelhante foi registrado na amostra 3 que apresentou 100% de similaridade para “*Candidatus Rickettsia amblyommii strain. GAT-30V complete genome*” (GenBank accession nº CP003334.1) e “*Candidatus Rickettsia amblyommii outer membrane protein A (OmpA) gene, partial cds*” (GenBank accession nº GQ891955.1) (OGRZEWALSKA et al., 2010), para os genes *gltA* e *OmpA*, respectivamente, sendo as únicas cepas que registraram 100% de identidade nesta amostra.

Ressalta-se que a amostra 1 é oriunda do município de Santa Helena e as amostras 2 e 3 do município de Viana, o que sugere a circulação de uma mesma cepa nesta região da baixada.

Em estudos realizados na região Leste da Amazônia brasileira, objetivando descrever os ixodídeos de aves silvestres, Ogrzewalska et al. (2010) encontraram *R. amblyommii* em *Amblyomma longirostre* e *Amblyomma geayi*, 56,7 e 57,1%, respectivamente. Embora observada em carrapato de outra espécie, a cepa encontrada no presente estudo para o gene *OmpA* das amostras 2 e 3, corresponde com similaridade de 100%, aos achados dos autores. Ao analisar a amostra 1 o grau de identidade é de 99%. A proximidade geográfica entre as regiões, assim como as características de manejo das mesmas, em que no período chuvoso, com os campos alagados, os animais são transportados e alocados em outros municípios, cujo relevo é mais elevado, são fatores que podem contribuir com a similaridade desses achados.

6. CONCLUSÃO

Relata-se a presença de *Rickettsia bellii* e *Rickettsia amblyommii* em equinos do grupamento racial “cavalo baixadeiro”, da Baixada Maranhense, como o primeiro registro de ocorrência dessas espécies de riquetsias em equinos no Maranhão.

Primeiro registro de *Rickettsia amblyommii* em *Amblyomma cajennense* coletado de equinos da baixada maranhense, através de ensaio biomolecular, por meio de PCR.

Os cavalos baixadeiros apresentam parasitismo por *Dermacentor nitens*, *Amblyomma cajennense* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

REFERÊNCIAS

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

ANGERAMI, R. N. Febre maculosa brasileira no estado de São Paulo: aspectos clínicos e epidemiológicos. 2011. 202f. **Tese** (Doutorado em Clínica Médica) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, São Paulo. 2011.

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. **Annals of the New York Academy Sciences**, v. 1078, p. 252-254, 2006.

ANGERAMI, R. N.; RESENDE, M. R.; STUCHI, R. S. B.; SILVA, I. J. Febre Maculosa Brasileira: aspectos epidemiológicos dos casos atendidos no Hospital das Clínicas – UNICAMP, período de 1993 a 2003. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Ouro Preto, v. 13, supl. 1, p.360-360, 2004.

APPERSON, C. S.; ENGBER, B.; NICHOLSON, W. L.; MEAD, D. G.; ENGEL, J.; YABSLEY, M. J.; DAIL, K.; JHONSON, J.; WATSON, D. W. Tick-borne diseases in North Carolina: Is "*Rickettsia amblyommii*" a possible cause of rickettsiosis reported as Rocky Mountain Spotted Fever. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 8, n. 5, p. 597-606, 2008.

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

ARAGÃO, H. B. Notas ixódidas brasileiros. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n.3, p.145-195, 1911.

ARAGÃO, H. B.; FONSECA, F. Notas de Ixodologia: propósito da validade de algumas espécies do gênero *Amblyomma* do continente Americano (Acari:Ixodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 51, p. 485-492, 1953.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. **Carrapatos de importância médico veterinário da região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. Modelos Biológicos.** Rio de Janeiro: Editora Instituto Butantan, 2006.

BILLINGS, A. N.; YU, X. J.; TEEL, P. D.; WALKER, D. H. Detection of a spotted fever group *Rickettsia* in *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in South Texas. **Journal of Medical Entomology**, n.35, p.474-8, 1998.

BITTENCOURT, A. J; FONSECA, A. H.; FACCINI, J. L. H; BUENO, B. H. Comportamento do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari) em infestações artificiais e naturais em diferentes hospedeiros. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v. 13, p. 173-182, 1990.

BROUQUI, P.; BACELLAR, F.; BARATON, G.; BIRTLES, R. J.; BJOERSDORFF, A.; BLANCO, J. R.; CARUSO, G.; CINCO, M.; FOURNIER, P. E.; FRANCAVILLA, E.; JENSENIUS, M.; KAZAR, J.; LAFERL, H. LAKOS, A.; LOTRIC-FURLAN, S.; MAURIN, M.; OTEO, J. A.; PAROLA, P.; PEREZ-EID, C.; PETER, O.; POSTIC, D.; RAOULT, D.; TELLEZ, A.; TSELENTIS, Y.; WILSKE, B. Guideline for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n. 12, p. 1108-1132, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. 2011. Acessado em 20 de janeiro 2013. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1555.

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

BURGDORFER, W. Ecological and epidemiological considerations of Rocky Mountain spotted fever and scrub typhus. In: WALKER, D. H. **Biology of rickettsial diseases**, Boca Raton: Editora CRC, p. 33-50. 1988.

BURGDORFER, W. The hemolinf test. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.19, n.6, p. 1010-1014,1970.

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

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. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, 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. **Annals of the New York Academy Sciences**, v.1078, p.154-155. 2006.

CHEN, L. F.; SEXTON, D. J. What's new in Rocky Mountain spotted fever? **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 22, p. 415-32, 2008.

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

COMER, M. K. Rocky mountain spotted fever. **Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, 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.

DANTAS-TORRES, F. Rocky Mountain spotted fever. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, p. 724-32, 2007.

DEL GUERCIO, V. M. F.; ROCHA, M. M. M.; MELLES, H. H. B.; LIMA, V. C. L.; PIGNATTI, M. G. Febre maculosa no município de Pedreira, São Paulo, Brasil. Inquérito sorológico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 1, p. 47-52, 1997.

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. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 342-343, 2006.

DEMMA, L. J.; TRAEGER, M. S.; NICHOLSON, W. L.; PADDOCK, C. D.; BLAU, D. M.; EREMEEVA, M. E.; DASCH, G. A.; LEVIN, M. L.; SINGLETON, J. JR.; ZAKI, S. R.; CHEEK, J. E.; SWERDOLOW, D. L.; McQUISTON, J. H. Rock

Mountain Spotted Fever from Arizona an Unexpected Tick Vector in Arizona. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n.6, p. 587-594, 2005.

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

DUMLER, J. S. Laboratory diagnosis of Rickettsial and Ehrlichial infections. **Clinical Microbiology Newsletter**, v.15, p.57-60, 1996.

ENGLISH, L. M.; BYFORD, R. L.; CRAIG, M. E. Controlling Ectoparasites on Horses. 2005. Disponível em: <www.cahe.nmsu.edu> Acesso em 23 de janeiro de 2013.

EREMEEVA, M. E.; DASCH, G. A. Rickettsiae. In. LEDERBERG, J. **Encyclopedia of microbiology**, New York: Academic Press, v. 4, p. 140-180, 2000.

FALCE, H. C.; FLECHTMANN, C. H. W.; FERNANDES, B. C. Ixodidae (Acari) on horses, mules and asses in the State of Paraná, Brazil. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Universidade de São Paulo, v. 20, p. 103-106, 1983.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. FAOSTAT 2011. Disponível em:<www.faostat.fao.org> Acesso em 21 de janeiro de 2013.

FOURNIER, P. E.; RAOULT, D. Bacteriology, taxonomy and phylogeny of *Rickettsia*. In RAOULT, D.; PAROLA, P. **Rickettsial Diseases**. New York, London. Editora Informa Health Care, cap. 1, p. 1-13, 2009.

FRANQUE, M. P.; HUARRISSON, A. S.; LINAREZ, F. F. M.; MASSARD, C. L. Infestação experimental de equinos por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 39, n. 7, p. 2117-2122, 2009.

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.

FUENTES, L. Ecological study of Rock Mountain spotted fever in Costa Rica. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.35, p. 192-196, 1986.

GALVÃO, M. A. M. Febre Maculosa. In: PEDROSO, E. R. P.; ROCHA, M. O. C.; SILVA, O. A. **Clínica Médica: os princípios da prática ambulatorial**. São Paulo: Atheneu, p. 1374-1388, 1993.

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

GASSER, A. M.; BIRKENHEUER, A. J.; BREITSCHWERDT, E. B. Canine Rocky Mountain spotted fever: a retrospective study of 30 cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 37, n. 1, p. 41-48, 2001.

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 yolk-sac culture. **Stain Technology**, n. 39, p. 135-140, 1964.

GONÇALVES, A. J. R.; LOPES, P. F. A.; MELO, J. C. P.; PEREIRA, A. A.; PINTO, A. M. M.; LAZERA, M. S. - Rickettsioses: a propósito de quatro casos diagnosticados no Rio de Janeiro de febre maculosa brasileira. **Folha Médica**, v. 82, p. 127-134, 1981.

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**. 3ª ed., St Louis: Saunders Elsevier, p. 232-245, 2006.

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

GUERIM, L. SERRA-FREIRE, N. M. Diversidade parasitária de ixodidae (Acari) em mamíferos domésticos da zona fisiográfica de Resende, Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 45, p. 95-97, 2001.

GUERRA, R. M. S. N. C.; BRITO, D. R. B.; Ixodofauna de mamíferos domésticos da Ilha de São Luis, Estado do Maranhão, Brasil. **Entomologia y Vectores**, v. 11, p. 435-444, 2004.

GUIMARÃES, J. H.; TUCCI, E. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. **Ectoparasitos de Importância Médico Veterinária**. São Paulo: Plêiade/FAPESP, 213p, 2001.

HAYDON, D.T.; CLEVELAND, S; TAYLOR, L.H.; LAURENSEN, M. K. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. **Emerging Infectious Diseases Journal Homepage**. 2008. Disponível em:< <http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol8no12/01-0317.htm>> Acesso em: 23 de janeiro 2013.

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

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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, n. 7, p. 793–801, 2007.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE, Pecuária 2011. Disponível em: <www.ibge.gov.br> Acesso em 21 de janeiro de 2013.

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

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

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, M. C.; HORTA, D. H. BOUYER, D. H.; McBRIDE, J. W.; PINTER, A.; POPOV, V.; GENNARI, S. M.; WALKER, D. H.

Rickettsia species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an endemic area for Brazilian spotted fever in the state of São Paulo, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n. 01, p.90-98, 2004.

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

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

LABRUNA, M. B. Ecology of *Rickettsia* in South America. **Annals of the New York Academy Sciences**, v. 11, p. 156-66 2009.

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

LABRUNA, M. B.; KAMAKURA, O.; MORAES-FILHO, J.; HORTA, M. C.; PACHECO, R. C. Rocky mountain spotted fever in dogs, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, p. 458-60, 2009.

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

LEMOS, 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. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, n. 6, p. 427-430, 1996.

LEMOS-MONTEIRO, J.; FONSECA, F.; PRADO, A. Typho Exantemático de São Paulo – Pesquisa sobre a possibilidade da transmissão experimental do vírus oir <Ixodidae>. **Brasil-Médico**, v. 16, n. 3, p. 49-53, 1932.

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

LOPES, M. G. Evidências sorológicas e moleculares da infecção por *Rickettsia* spp. em carrapatos e equídeos do centro norte do Piauí. 2012. **Dissertação** (Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2012.

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

MARIOTTE, C.D.; BUSTAMANTE, M. E. Hallazgo del *Rhipicephalus sanguineus* infectado naturalmente con fiebre manchada en Sonora (México). **Revista Instituto de Salud en Enfermedades Tropicales**, v. 5, p. 297-300, 1944.

MARTINS, I. V. F.; VEROCAI, G. G.; CORREA, T. R.; MELO, R. M. P. S.; SCOTT, F. B. Frequência de ectoparasitos em éguas da raça Mangalarga

Machador na Região Médio Parnaíba, Estado do Rio de Janeiro. **Revista Ceres**, v. 55, n. 4, p. 170-272, 2008.

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 da Universidade Federal de Goiás. 2009.

MAXEY, E. E. Some observations on the so-called spotted fever of Idaho. **Medical Sentinel**, v. 7, p. 433-438, 1899.

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

MEDEIROS, A. P. Detecção de *Rickettsia* spp. em ixodídeos e de anticorpos contra *Rickettsia* spp. em equinos no estado de Santa Catarina, Brasil. 2010. 81f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal). Centro de Ciências Agroveterinárias. Universidade do Estado de Santa Catarina, Santa Catarina, 2010.

MORAES-FILHO, J.; PINTER, A.; PACHECO, R. C.; GUTMANN, T. B.; BARBOSA, S. O.; GONZÁLEZ MARM et al. New epidemiological data on Brazilian spotted fever in an endemic area of the state of São Paulo, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, p. 73-78, 2009.

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

OGRZEWALSKA, M.; UEZU, A.; LABRUNA, M. B. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds in the eastern Amazon, northern Brazil, with notes on rickettsial infection in ticks. **Parasitology Research**, vol. 106, no. 4, p. 809-816, 2010.

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 21 janeiro 2013.

PACHECO, R. C. Pesquisa de *Rickettsia* spp em carrapatos *Amblyomma dubitatum* (NEUMANN 1899) e *Amblyomma triste* (KOCK 1984) provenientes do Brasil e Uruguai, respectivamente. 2007. 51f. **Tese** (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2007.

PADDOCK, C. D.; SUMMER, J. W.; COMER, J. A.; ZAKI, S. R.; GOLDSMITH, C. S.; GODDARD, J.; McLELLAN, S. L. F.; TAMMINGA, C. L.; OHL, C. A. *Rickettsia parkeri*: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 15, p. 805-811, 2004.

PADDOCK, C. D.; GREER, P. W.; FEREBEE, T. L.; SINGLETON, J. R. J.; MCKECHNIE, D. B.; TREADWELL, T. A.; et al. Hidden mortality attributable to Rocky Mountain spotted fever: immunohistochemical detection of fatal, serologically unconfirmed disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 179, p. 1469-1476, 1999.

PARKER, R. R. Observations on an infectious agent from *Amblyomma maculatum*. **Public Health Reports**, v. 54, p. 1482-1484, 1939.

PAROLA, P.; PADDOCK, C. D.; RAOULT, D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, p. 719-756, 2005.

PATINO, L.; AFANADOR, A.; PAUL, J. H. A spotted fever in Tobia, Colombia. Preliminary report. **American Journal of Tropical Medicine**, v.17, p. 639-653, 1937.

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. **The Journal of Immunology**, v. 121, n. 5, p. 1961-1968, 1978.

PINHEIRO, C.U.B.; SANTOS, V. M.; FERREIRA, F.R.R. Usos de subsistência de espécies vegetais na região da baixada maranhense. **Amazônia: Ciência e Desenvolvimento**, v.1, n.1, 2005

PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Annals of the New York Academy Sciences**, 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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 7, p. 696-701, 2008.

PIZA, J. T.; MEYER, J. R.; GOMES, L. S. Typho Exanthemático de São Paulo. **Sociedade Imprensa Paulista**. São Paulo, 1932.

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. **American Society Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 719-756, 2005.

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

RAOULT, D.; ROUX, V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 4, p. 694-719, 1997.

REGNERY, R. L.; SPRUILL, C. L.; PLIKAYTIS, B. D. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. **Journal of Bacteriology**, v.173, p.1576-89, 1991.

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

RICKETTS, H. T. The study of "Rocky Mountain spotted fever" (tick fever?) by means of animal inoculations. A preliminary communication. **Journal of the American Medical Association**, v. 47, n. 1, p. 33-36, 1906.

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

ROHR, C.L. **Estudos sobre Ixodidas do Brasil**. Rio de Janeiro: Gomes Irmãos & C, 1909. 220p.

ROZENTAL T, FAVACHO ARM, BARREIRA JD, OLIVEIRA RC, GOMES R, ALMEIDA DNP et al. *Rickettsia spp.* infection in *Rhipicephalus sanguineus* ticks in a Brazilian spotted fever endemic rural area in Rio de Janeiro state, Brazil.

Clinical Microbiology and Infection, v. 15, supl. 2, p. 245-246, 2009

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

SANGIONI, L. A. Pesquisa de infecção por riquettsias do grupo da febre maculosa em humanos, cães, eqüídeos e em adultos de *Amblyomma cajennense*, em região endêmica e não endêmica de São Paulo. 2003. 86f. **Tese** (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2003.

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

SANTOS, A. P. Aspectos ecológicos da febre maculosa brasileira em um foco endêmico no Estado de São Paulo. 2007. 86f. **Tese** (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2007.

SANTOS, S. A.; MAZZA, M. C. M.; SERENO, J. R. B.; MAZZA, C. A. S.; PEDREIRA, A. C. M. S.; MARIANTE, A. S.; COMASTRI FILHO, J. A.; SILVA, J. A.; MARQUES, M. C. A. Descrição do manejo geral de cavalos pantaneiros na Região do Pantanal. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**, Embrapa, n.63, 2005.

SEKEYOVA, Z.; ROUX, V.; RAOULT, D. Phylogeny of *Rickettsia* spp inferred by comparing sequences of 'gene D', which encodes an intracytoplasmic protein. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1353-1360, 2001.

SERRA, O. R. Condições de manejo, preservação e caracterização fenotípica do grupamento genético equino "Baixadeiro". 2004. 77f. Osvaldo Rodrigues Serra. **Dissertação** (Mestrado em Agroecologia), Universidade Estadual do Maranhão, São Luis, 2004

SERRA-FREIRE, N. M. **Planejamento e Análise de Pesquisas Parasitológicas**. Niterói, Editora da Universidade Federal Fluminense, 199 p. 2002.

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

SILVA, A. B. Estudo soro-epidemiológico e molecular da infecção por *Rickettsia* sp. em cães do ambiente urbano e rural da mesorregião Oeste Maranhense, microrregião de Imperatriz, Brasil. 2012. 74p. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2012.

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

SOUZA, C. E.; MORAES-FILHO, J.; OGRZEWALSKA, M.; UCHOA, F.C.; HORTA, M. C.; SOUZA, S. S. L.; BORBA, R.; LABRUNA, M. B. Experimental

infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. **Veterinary Parasitology**, v. 161, n. 1, p. 116-121, 2009.

SUCEN. Superintendência de Controle de Endemias-SP. **Febre Maculosa: informações para profissionais da saúde**. Acesso em 14 de dezembro 2012. Disponível no site: <<http://www.sucen.sp.gov.br>>

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 equinos na região rural de Londrina-PR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 15., 2008, Curitiba. **Anais eletrônicos...** Curitiba: CBPV, 2008.

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. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 15, p. 73-86, 1942.

VIANNA, M. C. B.; HORTA, M. C.; SANGIONI, L. A.; CORTEZ, A.; SOARES, R. M.; MAFRA, C. L.; GALVÃO, M. A. M.; LABRUNA, M. B.; GENNARI, S. M. Rickettsial spotted fever in Capoeirão Village, Itabira, Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v 50, n. 5, p. 297-301, 2008.

VRANJAC, A. Varicela, difteria e febre maculosa: aspectos epidemiológicos no Estado de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 37, n 6, p. 817-820, 2003.

WALKER DH. Rickettsiae and rickettsial infections: the current state of knowledge. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, supl.1, p. 39-44, 2007.

WALKER, D. H. Rocky Mountain spotted fever: a disease in need of microbiological concern. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 2, p. 227-240, 1989.

WALKER, D. H.; MATTERN, W. D. *Rickettsial vasculitis*. **American Heart Journal**, v. 100, p. 896-906, 1980.

WEISS, E.; STRAUSS, B. The life and career of Howard Taylor Ricketts. **Reviews of infectious diseases**, v.13, p. 1241-1242, 1991.

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

WHO. World Health Organisation. Laboratory diagnosis of Rickettsial diseases. **Bullitin of the World Health Organization**,v.66, p. 283-420, 1988.

WILSON, L. N.; CHOWNING, W. N. Studies in pyroplasmosis hominis ("spotted fever" or "tick fever" of the Rocky Mountains) **The Journal of Infectious Diseases**, v. 1, p. 31-57, 1904.

WOLBACH, S. B. The etiology of Rocky Mountain spotted fever. A preliminary report. **The Journal of Medical Research**, v. 34, p. 121-128, 1916.

WOLBACH, S. B. Studies on Rocky Mountain spotted fever. **The Journal of Medical Research**, v. 41, p. 2-197, 1919.

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. Acessado em 20 de Janeiro de 2013.

Disponível no site: <<http://link.springer.ny.com/link/service/books/10125>>

Anexos



Universidade Estadual do Maranhão

DECLARAÇÃO

Declaramos aos devidos fins que o projeto intitulado “**Infecções parasitárias em eqüinos – Cavalo Baixadeiro – região da Baixada Maranhense: I – Identificação de artrópodes ectoparasitos potencialmente vetores de patógenos e II – Diagnóstico direto e indireto de hemoparasitos**” de autoria do pós-graduando do Mestrado em Ciência Animal, **Edvaldo Franco Amorim Filho**, sob a orientação da Prof^ª. Dr^ª. Rita de Maria Seabra Nogueira Candanedo Guerra, com a colaboração da Prof^ª. Dr^ª. Ana Clara Gomes dos Santos foi submetido ao Comitê de Ética e Experimentação Animal do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão, conforme protocolo nº. 011/2012, sendo aprovado por atender as normas da Resolução do CFMV nº. 1000/2012 e a Lei nº. 11794/2008, que tratam dos procedimentos Éticos na Experimentação Animal.

São Luís – MA, 18 de março de 2013.

Prof^ª. Dr^ª. Alana Lislea de Sousa
Presidente do CEEA/CMV/UEMA