



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ROBERTA DOS SANTOS TOLEDO

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE RICKETTSIAS DO
GRUPO DA FEBRE MACULOSA EM HUMANOS, CÃES,
EQUINOS E DE *Rickettsia* spp EM CARRAPATOS EM
LONDRINA, PR**

Londrina
2008

ROBERTA DOS SANTOS TOLEDO

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE RICKETTSIAS DO
GRUPO DA FEBRE MACULOSA EM HUMANOS, CÃES,
EQUINOS E DE *Rickettsia* spp EM CARRAPATOS EM
LONDRINA, PR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal – Área de Concentração: Sanidade Animal.

Orientador: Prof. Dr. Odilon Vidotto

Londrina
2008

ROBERTA DOS SANTOS TOLEDO

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE RICKETTSIAS DO
GRUPO DA FEBRE MACULOSA EM HUMANOS, CÃES,
EQUINOS E DE *Rickettsia* spp EM CARRAPATOS EM
LONDRINA, PR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Odilon Vidotto

Prof. Dr. Roberta Lemos Freire

Dr. Richard de Campos Pacheco

Londrina, 11 de abril de 2008.

“De tudo ficaram três coisas. A certeza de que estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza que seria interrompido antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sono uma ponte, da procura um encontro.”

Fernando Sabino (O Encontro marcado)

*À minha mãe Nilse e aos meus irmãos
Alexandre e Heloísa pelo apoio e incentivo
durante a realização deste trabalho.*

*Ao Ricardo, simplesmente por existir em
minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Carlos (*in memorian*) e Nilse por terem renunciado a tantas coisas para que pudessem proporcionar educação aos filhos;

Aos meus irmãos Alexandre, André (*in memorian*) e Heloísa por sempre me passarem bons exemplos, nos quais eu me inspirei para obter mais esta conquista;

Ao Ricardo, meu namorado, meu amigo, meu pilar, companheiro de todos os momentos;

Ao professor Odilon Vidotto pelas orientações e ensinamentos, que foram de fundamental importância para o desenvolvimento deste trabalho;

Ao professor João Luis Garcia, pelas sugestões dadas durante o exame de qualificação;

À professora Roberta Lemos Freire por todas as sugestões e ensinamentos dados durante a graduação, durante o desenvolvimento deste trabalho e durante o exame de qualificação;

Ao professor Milton Hissashi Yamamura por ter me incentivado a fazer o mestrado;

À Helenice Kieski, secretária da pós graduação, pela sua eficiência e dedicação;

Ao professor José Guimarães, por ter cedido o laboratório para realização das extrações de DNA;

Ao professor Marcelo Bahia Labruna, da Universidade de São Paulo, por ter permitido a realização das RIFIs;

Ao Richard de Campos Pacheco por toda a ajuda, paciência e orientação durante a realização das RIFIs;

Aos amigos da USP Maurício, Jonas e Maria, que também colaboraram para este trabalho;

À Anne Hiltel, da Secretaria Municipal do Meio Ambiente, pelo apoio nas coletas realizadas no Parque Arthur Thomas e pela ajuda nas coletas realizadas no Jardim Califórnia;

À Sônia Fernandes, gerente da Vigilância Epidemiológica, da Secretaria Municipal de Saúde de Londrina e à equipe de enfermeiros da Unidade Básica de Saúde Eldorado, pela coleta de sangue dos moradores do Jardim Califórnia;

À enfermeira Marta, do SAMU, pela coleta de sangue dos funcionários do Parque Municipal Arthur Thomas;

A todos os moradores do Jd. Califórnia e a todos os funcionários do Parque Arthur Thomas pela participação na pesquisa;

À Elisabete Regina Marangoni Marana, técnica responsável pelos laboratórios de Zoonoses e Saúde Pública e de Protozoologia e à Dalva Maria Navarro Fabrício, técnica do Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias, por toda a ajuda dada neste trabalho;

Ao Ademir José da Silva, técnico do Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública, não só pela ajuda dada no trabalho, mas por ser um grande amigo que estimarei para sempre;

À Kátia Tamekuni, meu anjo da guarda, companheira de coleta, contagem de carrapato, extração, PCR, RIFI, risadas e besteiras, enfim, por estes dois anos de amizade, companheirismo e orientação.

Ao Mauro de Freitas Silva Filho pela ajuda nas coletas e por ter sido um grande amigo durante este tempo;

À residente e grande amiga Valeska Bender Haydu pela ajuda nas coletas e no laboratório;

À Michelle Igarashi e à Flora Satiko Kano pela amizade, companheirismo, conselhos;

Aos amigos da pós Felipe, Bruno, Alexandre, Kênio, Michele Lunardi pelos momentos de amizade e alegria e às minhas grandes e eternas amigas Lu e Sibille;

TOLEDO, Roberta dos Santos. **Aspectos Epidemiológicos de Rickettsias do Grupo da Febre Maculosa em Humanos, Cães, Eqüinos e de *Rickettsia* spp em Carrapatos em Londrina, PR.** 2008. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

RESUMO

A Febre Maculosa é uma zoonose reemergente, causada por bactérias do gênero *Rickettsia* do Grupo da Febre Maculosa (GFM). A *Rickettsia rickettsii* tem sido incriminada como o principal agente etiológico da Febre Maculosa Brasileira, transmitida por carrapatos do gênero *Amblyomma*, sendo que o *Amblyomma cajennense* é o principal vetor associado à doença no Brasil. Com o objetivo de estudar a epidemiologia de rickettsias do grupo de febre maculosa em Londrina, PR, foram coletados carrapatos de vida livre e de capivaras, além de sangue de humanos no Parque Municipal Arthur Thomas, e carrapatos e sangue de cães, eqüinos e humanos em um bairro de Londrina. Um total de 458 *A. cajennense* e 775 *A. dubitatum* foram submetidos à Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). A amplificação de uma região do gene que codifica a proteína citrato sintase (*gltA*) foi utilizada para detecção do gênero *Rickettsia* nos carrapatos. Nenhuma amostra foi positiva para PCR. Soros de humanos e de animais foram submetidos à Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), na qual foram utilizados como antígenos a *R. rickettsii* e a *R. parkeri* e considerados positivos aqueles que apresentaram títulos ≥ 64 . Entre as amostras de soro de humanos do Parque Arthur Thomas, sete (20,6%) de 34 amostras foram positivas para *R. rickettsii*, e nenhuma foi positiva para *R. parkeri*. Entre as amostras de soro de humanos, cães e eqüinos do bairro, cinco (4,67%) de 107 amostras de humanos, duas (2,74%) de 73 amostras de cães e 10 (38,50%) de 26 amostras de eqüinos foram positivas, quando utilizado *R. rickettsii* e uma (0,93%) de humano, duas (2,74%) de cães e três (11,53%) de eqüinos foram positivas quando utilizado *R. parkeri*. Todas as amostras que reagiram com *R. parkeri* também reagiram com *R. rickettsii*. Somente as duas amostras positivas de cão para *R. rickettsii* apresentaram altos títulos, sendo uma 1024 e a outra 2048. A detecção de soros positivos para *R. rickettsii* alerta para a circulação de alguma rickettsia do GFM na população estudada.

Palavras-chave: Epidemiologia. *Rickettsia rickettsii*. *Rickettsia parkeri*. *Amblyomma cajennense*. *Amblyomma dubitatum*.

TOLEDO, Roberta dos Santos. **Epidemiological Aspects of Rickettsias of the Spotted Fever Group in Humans, Dogs, Equine, and of *Rickettsia* spp in Ticks in Londrina, PR.** 2008. 86f. Dissertation (Master Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

ABSTRACT

The Spotted Fever is an emerging zoonosis, caused by bacteria of the genus *Rickettsia* of the Spotted Fever Group (SFG). The *Rickettsia rickettsii* has been incriminated as the main etiological agent of the Brazilian Spotted Fever, transmitted by ticks of the genus *Amblyomma*; the *A. cajennense* is the main vector associated with the disease in Brazil. With the objective of studying the rickettsial epidemiology of the spotted fever group in Londrina, PR, free-living ticks and those from capybaras were collected, as well as serum samples from humans at the Arthur Thomas Municipal Park. Also ticks and blood from dogs and horses were collected, while only serum from humans from a neighborhood in Londrina was obtained. A total of 458 *A. cajennense* and 775 *A. dubitatum* were submitted to the Polymerase Chain Reaction (PCR). The amplification of a region of the gene that codifies the protein citrate synthase (*gltA*) was used to detect the genus *Rickettsia* spp in the ticks. No sample was positive by PCR. The human and animal serum were then submitted to Indirect Immunofluorescence Assay (IFA), in which the antigens of *R. rickettsii* and the *R. parkeri* were used; and only those that presented titles ≥ 64 were considered as positives. Among the human serum samples obtained from the park, 7 (20.6%) of 34 samples were positive for *R. rickettsii*, and all negative for *R. parkeri*. When the human, dog and equine samples obtained from the neighborhood were analyzed, 5 (4.67%) of 107 samples obtained from human beings, 2 (2.74%) from dogs, and 10 (38.50%) from equine were positive for *R. rickettsii*; while 1 (0.93%) of all samples from human beings, 2 (2.74%) from dogs, and 3 (11.53%) from equine were positive for *R. parkeri*. Additionally, all samples that reacted positively to *R. parkeri* also reacted with *R. rickettsii*. Only two samples from dogs that were positive to *R. rickettsii* showed high titles, one 1024 and the other 2048. The detection of positive serum of *R. rickettsii* indicates the circulation of some Rickettsia of the SFG in the population evaluated.

Keywords: Epidemiology. *Rickettsia rickettsii*. *Rickettsia parkeri*. *Amblyomma cajennense*. *Amblyomma dubitatum*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS DO ARTIGO 1

- Figura 1** – Foto de Satélite da praça dos carroceiros, Jd. Califórnia, Londrina, 2007; as marcações indicam as ruas, cujos moradores se submeteram à coleta de sangue e cujos animais foram submetidos à coleta de sangue e de carrapato51
- Figura 2** – Fotografia de um gel de agarose 1,5% de produtos de PCR realizado a partir de material extraído de *Amblyomma cajennense*. Coluna 1, marcador de peso molecular (123pb); coluna 2, controle positivo; colunas 3, 4, 5 e 6, amostras negativas; coluna 7, controle negativo51

FIGURAS DO ARTIGO 2

- Figura 1** – Foto aérea Parque Municipal Arthur Thomas, Londrina, PR; 1. Ribeirão Cambé; 2. Represa Cambezinho; 3. Sede da Secretaria Municipal do Meio Ambiente (SEMA)74
- Figura 2** – Armadilha de gelo seco (CO₂) montada para captura de carrapatos adultos e ninfas.....74
- Figura 3** – Fotografia de um gel de agarose 1,5% de produtos de PCR realizados a partir de material extraído de *A. dubitatum*. Coluna 1. Marcador de peso molecular (123pb); Coluna 2. Controle Positivo; Colunas 3, 4, 5, 6, 7 e 8. Amostras negativas; Colunas 9 e 10. Controle Negativo74

LISTA DE TABELAS

TABELAS DO ARTIGO 1

- Tabela 1** – Comparação entre os títulos finais obtidos pela RIFI, para as duas espécies de rickettsias testadas, dos soros de humanos (H), eqüinos (E) e cães (C), Londrina, 200752
- Tabela 2** – Resultado do teste de Qui-quadrado quanto à presença de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii* e variáveis relativas à 107 moradores de um bairro da cidade de Londrina, PR, 200753
- Tabela 3** – Resultado do teste de Qui-quadrado quanto à presença de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii* e variáveis relativas a 73 cães de um bairro da cidade de Londrina, PR, 200754
- Tabela 4** – Resultado do teste de Qui-quadrado quanto à presença de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii* e variáveis relativas a 26 eqüinos de um bairro da cidade de Londrina, PR, 200754

TABELAS DO ARTIGO 2

- Tabela 1** – Resultado do teste de Qui-quadrado quanto à presença de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii* e variáveis relativas a 34 funcionários do Parque Municipal Arthur Thomas, Londrina, PR, 200775

Lista de Abreviaturas

| | |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------|
| GA | Grupo Ancestral |
| GT | Grupo Tifo |
| GFM | Grupo da Febre Maculosa |
| FMB | Febre Maculosa Brasileira |
| FMMR | Febre Maculosa das Montanhas Rochosas |
| EUA | Estados Unidos da America |
| RIFI | Reação de Imunofluorescência Indireta |
| PR | Paraná |
| PCR | “Polimerase Chain Reaction” – Reação em Cadeia pela Polimerase |
| DMVP | Departamento de Medicina Veterinária Preventiva |
| HV | Hospital Veterinário |
| UEL | Universidade Estadual de Londrina |
| BOD | “Biological Oxygen Demand” |
| <i>gltA</i> | Gene Citrato Sintase |
| dNTP | Nucleotídeos Trifosfatados |
| MgCl₂ | Cloreto de Magnésio |
| Taq | <i>Thermus aquaticus</i> |
| DNA | Ácido Desoxirribonucléico |
| U | Unidades |
| mM | Milimolar |
| q. s. p | quantidade suficiente para |
| VPS | Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal |
| FMVZ | Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia |
| USP | Universidade Estadual de São Paulo |
| TBE | Tris-Borato-EDTA |
| mA | miliampere |
| pb | pares de base |

SUMÁRIO

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| REVISÃO DE LITERATURA | 15 |
| REFERÊNCIAS | 22 |
| OBJETIVOS | 30 |
| OBJETIVO GERAL..... | 30 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 30 |
| ARTIGO 1 – PESQUISA DE INFECÇÃO POR RICKETTSIAS DO GRUPO DA FEBRE MACULOSA EM HUMANOS, CÃES, EQUINOS E CARRAPATOS EM LONDRINA, PR | 31 |
| RESUMO..... | 31 |
| ABSTRACT | 32 |
| INTRODUÇÃO | 33 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 35 |
| Área de estudo | 35 |
| Coleta de carrapatos | 35 |
| Coleta de sangue | 36 |
| Extração de DNA..... | 36 |
| Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) | 36 |
| Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)..... | 37 |
| Análise estatística | 38 |
| RESULTADOS | 39 |
| Coleta de carrapatos | 39 |
| PCR dos carrapatos | 39 |
| Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)..... | 39 |
| DISCUSSÃO | 41 |
| REFERÊNCIAS..... | 45 |
| FIGURAS E TABELAS DO ARTIGO 1 | 50 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| ARTIGO 2 – PESQUISA DE INFECÇÃO POR RICKETTSIAS DO GRUPO DA FEBRE MACULOSA EM FUNCIONÁRIOS E CARRAPATOS DE UM PARQUE URBANO EM LONDRINA, PR | 55 |
| RESUMO..... | 55 |
| ABSTRACT | 56 |
| INTRODUÇÃO | 57 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 59 |
| Área de estudo | 59 |
| Coleta de carrapatos do meio ambiente..... | 59 |
| Coleta de carrapatos nos animais | 60 |
| Coleta de sangue | 60 |
| Extração de DNA..... | 60 |
| PCR..... | 61 |
| RIFI | 62 |
| Análise estatística | 62 |
| RESULTADOS | 63 |
| Coleta de carrapatos | 63 |
| PCR dos Carrapatos | 63 |
| RIFI | 63 |
| DISCUSSÃO | 65 |
| REFERÊNCIAS..... | 68 |
| FIGURAS E TABELAS DO ARTIGO 2..... | 73 |
| CONCLUSÃO | 76 |
| ANEXOS | 77 |
| ANEXO 1 – Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos | 78 |
| ANEXO 2 – Comitê de Ética em Experimentação Animal..... | 79 |
| ANEXO 3 – Protocolo de Extração de DNA segundo Chomkzynski (1993) com modificações de Sangioni (2002) | 80 |
| ANEXO 4 – Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), segundo Horta et al. (2004)..... | 81 |
| APÊNDICES | 82 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| APÊNDICE 1 – Questionário Epidemiológico – Humanos – Jd. Califórnia | 83 |
| APÊNDICE 2 – Questionário Epidemiológico – Animais – Jd. Califórnia | 84 |
| APÊNDICE 3 – Questionário Epidemiológico – Humanos- Parque Municipal Arthur Thomas | 86 |

REVISÃO DE LITERATURA

Os carrapatos possuem a capacidade de transmitir uma grande variedade de agentes infecciosos tais como, vírus, bactérias, protozoários e helmintos, mais do que qualquer outro artrópode e, portanto, são importantes vetores de doenças para os homens e para os animais (SONENSHINE et al., 2002). Sua importância como transmissor de doenças foi reconhecida quando, em 1886, Theobald Smith descreveu a babesiose, que nesta época era chamada de “Texas Cattle Fever”, e mais tarde, em 1889 e 1890, ele próprio e Frederick Kilborn demonstraram a transmissão da doença por carrapatos (VIEIRA et al., 2004).

Algumas características podem ser utilizadas para explicar porque os carrapatos são vetores de patógenos, como a hematofagia, longevidade, alto potencial reprodutivo, poucos inimigos naturais, além da transmissão transovariana e da sobrevivência transestadial (SONENSHINE et al., 2002; LABRUNA, 2004). Os carrapatos possuem maior eficiência que os insetos na manutenção de agentes infecciosos em seu organismo graças à mudança gradual de seus tecidos em desenvolvimento, o que beneficia a sobrevivência destes agentes na sobrevivência transestadial (SONENSHINE et al., 2002).

No mundo existe cerca de 870 espécies de carrapatos descritas e, destas, apenas 10 a 20% são encontradas parasitando o homem e os animais domésticos. As outras 80-90% são parasitas de animais silvestres e não devem ser desconsiderados quanto à sua importância na saúde pública, já que participam na manutenção enzoótica de patógenos na natureza (OLIVER, 1989; LABRUNA, 2004).

No Brasil foi confirmada a presença de apenas uma doença cujo agente etiológico é transmitido por carrapatos ao homem, a Febre Maculosa Brasileira (NASCIMENTO et al., 2005).

Rickettsioses são doenças causadas por bactérias da família Rickettsiaceae, na qual está classificado o gênero *Rickettsia*. Estas bactérias são gram-negativas, com ciclo de vida intracelular obrigatório (McDADE; NEWHOUSE, 1986; YU; WALKER, 2003). As espécies deste gênero são divididas em dois grupos, Grupo Tifo (GT) e Grupo da Febre Maculosa (GFM), tendo como base características antigênicas, morfológicas, moleculares e ecológicas. O GT é composto pela *R. prowazekii* e *R. typhi*, cujos vetores são piolhos e pulgas

respectivamente; o GFM é composto por mais de 20 espécies, sendo a maioria transmitida por carrapatos, com exceção da *R. akari* e da *R. felis*, cuja transmissão está associada à ácaros e pulgas respectivamente (LABRUNA, 2006; YU; WALKER, 2003). Outras espécies, como a *R. bellii* e *R. canadensis* não estão inseridas em nenhum destes grupos (YU; WALKER, 2003).

Dentre as rickettsias do GFM pode-se citar pelo menos 16 espécies que causam infecção no homem, *R. rickettsii*, *R. conorii*, *R. africae*, *R. parkeri*, *R. australis*, *R. honei*, *R. sibirica*, *R. japonica*, *R. massiliae*, *R. aeschlimannii*, *R. akari*, *R. felis*, *R. helvética*, *R. mongolotimona*, *R. slovacica* e *R. monacenas* (RAOULT; ROUX, 1997; RAOULT et al., 2002). As outras rickettsias deste grupo foram isoladas apenas em carrapatos e, portanto, possuem patogenicidade desconhecida. Contudo, elas poderiam ser agentes etiológicos de rickettsioses ainda não descobertas ou menos severas (AZAD; BEARD, 1998). Além disso, as rickettsias de patogenicidade desconhecida possuem um papel fundamental na epidemiologia de rickettsias patogênicas (como a *R. rickettsii*), já que é comprovado que carrapatos são incapazes de manter duas espécies de rickettsias via transmissão transovariana. (BURGDORFER, 1981; MACALUSO, 2002).

Em alguns países da América Latina, espécies de rickettsias já foram devidamente identificadas em carrapatos (LABRUNA, 2004). Na Colômbia, *R. rickettsii*, foi encontrada em *A. cajennense*; na Costa Rica, ela foi encontrada em *Haemaphysalis leporispalustris*; no México, em *A. cajennense* e *Rhipicephalus sanguineus*; no Panamá, em *A. cajennense*; no Uruguai, *R. parkeri* foi encontrada em *A. triste*; na Argentina *R. massiliae* foi encontrada em *R. sanguineus* e *R. bellii* e *R. amblyommii* em *A. neumanni* (PATINO-CAMARGO, 1941; FUENTES et al., 1985; BUSTAMANTE-VARELA, 1947; RODANICHE, 1953; VENZAL et al., 2004; CICUTTIN et al., 2004; LABRUNA et al., 2007a).

No Brasil, algumas espécies de rickettsias também foram identificadas e/ ou isoladas de carrapatos. Dentre elas, *R. rickettsii* em *A. cajennense* e *A. aureolatum* (GOMES, 1933; MOREIRA, MAGALHÃES, 1935; PINTER, et al., 2006; GUEDES, 2005); *R. parkeri* em *A. triste* (SILVEIRA et al., 2007); *Rickettsia* spp (Cepa COOPERI) em *A. dubitatum* (*A. cooperi*) (LABRUNA, et al., 2004a); *R. bellii* em *A. dubitatum*, *A. ovale*, *A. oblongoguttatum*, *A. humerale*, *A. scalpturatum*, *A. rotundatum*, *A. aureolatum*, *Ixodes loricatus* e *H. juxtakochi* (LABRUNA et al., 2004abc; 2007b; PINTER et al., 2006; HORTA, 2006); *R.*

amblyommii em *A. cajennense* e *A. coelebs* (LABRUNA et al., 2004b); *R. rhipicephali* em *H. juxtakoch* (LABRUNA et al., 2007b). Além destas também houve identificação e/ou isolamento de *R. felis* em pulgas *Ctenocephalides felis felis* (OLIVEIRA, 2002; HORTA, 2006). Estas mesmas espécies de rickettsias foram relatadas nos Estados Unidos, porém em espécies diferentes de carrapatos (LABRUNA, 2004; EREMEEVA et al., 2006).

A febre maculosa brasileira (FMB) é uma rickettsiose que tem como principal agente etiológico a *R. rickettsii* e foi descrita como uma entidade clínica semelhante à Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (FMMR) (PIZA et al., 1932). Esta foi descrita pela primeira vez nos EUA, em 1899, apesar de já ocorrer desde 1872 entre colonos e índios no Vale Bitterroot, Montana (MAXEY, 1899; BURGDORFER, 1988). Ricketts (1909), nos EUA, foi quem primeiro isolou a *R. rickettsii* e estabeleceu o papel do carrapato na transmissão da doença. Nos EUA e Canadá os carrapatos *Dermacentor variabilis* e *D. andersoni* são os principais vetores desta bactéria (BURGDORFER, 1988; SONENSHINE et al., 2002).

No Brasil, a FMB foi reconhecida primeiramente em São Paulo, por PIZA et al. (1932). Nesta época a doença era chamada de Tifo Exantemático de São Paulo. Monteiro (1933), juntamente com pesquisadores norte-americanos, verificou a imunidade cruzada entre amostras do agente da FMB com amostras do agente da FMMR. Esta foi a primeira evidência de que a *R. rickettsii* era a causadora da doença no Brasil. A FMB tem sido descrita em humanos nos quatro estados da região Sudeste, onde muitos casos têm sido confirmados nas últimas décadas, com destaque para São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (DIAS; MARTINS, 1939; SEXTON et al., 1993; LEMOS et al., 2001; ROZENTAL, et al., 2002; GALVÃO et al., 2003). Alguns casos da doença foram relatados em outros estados fora da região Sudeste, dentre eles Bahia em 1979 (PLANK et al., 1979), Paraná (São José dos Pinhais) em 2005, Rio Grande do Sul (região de Serro Grande) (MARTINS, 2004 apud PACHECO, 2007), e em Santa Catarina entre 2003 e 2006, com maior ocorrência nos municípios do Vale do Itajaí e destaque para o município de Blumenau (MADERA, WEISBRICH, 2004).

A importância das rickettsioses tem crescido muito não só pela identificação de novas espécies, mas também porque sua incidência e distribuição são maiores do que se imaginava (GALVÃO et al., 2005). No Brasil, somente a *R. rickettsii* foi isolada e caracterizada de humanos, no estado de São Paulo (MELLES

et al., 1992; NASCIMENTO et al., 2005). Porém, recentemente foram relatados os primeiros casos humanos de infecção por *R. parkeri* nos Estados Unidos (PADDOCK et al., 2004; WHITMAN et al., 2007). A *R. parkeri* foi isolada pela primeira vez em 1937, de carrapatos da espécie *A. maculatum* no Texas, EUA (PARKER et al., 1939). Em cobaias (*Cavia aperea porcellus*) esta rickettsia produziu sinais clínicos semelhantes ao da *R. rickettsii*, porém de forma mais branda e sem mortalidade. No Brasil, a *R. parkeri* também foi isolada e caracterizada molecularmente em carrapatos (SILVEIRA et al., 2007). Labruna et al. (2004a) detectaram uma rickettsia filogeneticamente muito próxima de *R. parkeri*, denominada *Rickettsia* spp cepa COOPERI em carrapatos *A. dubitatum*, coletados no município de Pedreira, SP.

A FMB, causada pela *R. rickettsii*, apresenta sintomatologia mais severa como febre, dor de cabeça, sensação de frio, mialgia, erupções na pele, principalmente no tronco, palma das mãos e sola dos pés. Também ocorrem esplenomegalia e hepatomegalia, podendo evoluir para distúrbios nervosos e mentais, como letargia, insônia, agitação, delírio, estupor e coma. Além disso, é caracterizada por alta letalidade (DIAS; MARTINS, 1939; MANCINE et al., 1983). Já a infecção por *R. parkeri* causa nos humanos sinais mais brandos, com linfadenopatia e lesão papular típica no local da picada do carrapato (PADDOCK et al., 2004; WHITMAN et al., 2007). Desta forma é possível que casos desta rickettsiose estejam ocorrendo no Brasil, ou de forma silenciosa, ou sendo diagnosticada como FMB causada pela *R. rickettsii* (SILVEIRA et al., 2006). Principalmente por existir casos no país diagnosticado como FMB, mas que apresentaram sinais clínicos mais brandos e sem letalidade, como foi o caso dos surtos ocorridos em Santa Catarina entre 2003 e 2007. Isto é possível, pois o teste de escolha utilizado para diagnóstico da febre maculosa é a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e é de conhecimento que ocorre reação cruzada entre diversas espécies de rickettsias, sendo que este teste não pode ser utilizado para identificação taxonômica das mesmas. (FENG; WALKER, 2003; HORTA et al., 2004).

A *R. rickettsii* é transmitida pela picada de carrapatos ixodídeos durante sua alimentação, porém é necessário um período de cinco a vinte horas de fixação para que a picada seja infectante, pois acredita-se que em carrapatos não alimentados a *R. rickettsii* esteja em uma fase “avirulenta” (BURGDORFER, 1988;

COMER, 1991). No Brasil, dois carrapatos são incriminados como transmissores da *R. rickettsii* aos homens e aos animais, *A. cajennense* e *A. aureolatum* (DIAS; MARTINS, 1939; PINTER; LABRUNA, 2006). Porém o *A. cajennense* é o mais comum carrapato vetor associado com a doença no Brasil (MOREIRA; MAGALHÃES, 1935). Isto foi reafirmado por Lemos et al. (1997) ao encontrar *A. cajennense* em diferentes hospedeiros, inclusive humanos, e demonstrar o comportamento inespecífico deste carrapato, além da sua abundância em área endêmica. O primeiro isolamento da bactéria causadora da FMB foi realizado por Gomes (1933) em cobaia a partir de um exemplar de *A. aureolatum* adulto coletado de um cão, que residia em uma casa com casos de febre maculosa. Em 1935, Moreira e Magalhães isolaram o mesmo agente de duas fêmeas de *A. cajennense* coletados de cão.

Os carrapatos, além de vetores, são reservatórios do agente da FMB na natureza, transmitindo-o de forma congênita a novas gerações de carrapatos. O grau de transmissão transovariana depende do quanto os tecidos ovarianos do carrapato estão infectados. Em caso de infecção intensa, a taxa de transmissão para a nova geração chega a 100%. Porém a contínua manutenção de uma linhagem virulenta por passagem transovariana tem efeitos letais para o carrapato. Assim, no caso de rickettsias menos virulentas, este mecanismo pode ser suficiente para mantê-las na natureza. Porém, no caso de rickettsias com alta virulência, como a *R. rickettsii*, faz-se necessário que alguns animais silvestres desempenhem um mecanismo de efeito amplificador para manter esta bactéria na natureza. O hospedeiro amplificador mantém a bactéria em níveis altos na corrente sanguínea por alguns dias ou semanas, infectando novos carrapatos, permitindo assim a amplificação da infecção por *R. rickettsii* na população de carrapatos (McDADE; NEWHOUSE, 1986; BURGDORFER, 1988). Apesar de não haver comprovação de qualquer espécie animal como hospedeiro amplificador de *R. rickettsii* para carrapatos no Brasil, diversos trabalhos realizados desde a década de 1930 têm levado à suspeita de capivaras, gambás e coelhos silvestres (LABRUNA, 2006).

Isolados de *R. rickettsii* foram obtidos de gambás (*Didelphys* spp) naturalmente infectados, nos Estados de Minas Gerais e São Paulo, na década de 1930 (MOREIRA; MAGALHÃES, 1935). Horta et al. (2007) realizaram pesquisa de anticorpos em 94 gambás, a maioria de áreas endêmicas para febre maculosa, e obtiveram 68% de reação positiva na RIFI para pelo menos uma das quatro

espécies de rickettsias testadas. Em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) observou-se a circulação da bactéria por tempo superior a 11 dias (TRAVASSOS; VALLEJO, 1942a) e, em outro trabalho dos mesmos autores, foi possível infectar *A. cajennense* alimentados em capivaras experimentalmente infectadas e, posteriormente, transmitir a infecção por picada a outros animais (TRAVASSOS; VALLEJO, 1942b). Souza et al. (2004) realizaram pesquisa de anticorpos em 147 capivaras capturadas de diversas áreas do município de Campinas e encontraram 33% de animais com títulos maiores ou iguais a 64 e 36% dos carrapatos *A. dubitatum* coletados destas capivaras foram positivos para *Rickettsia* spp no teste de hemolinfa. As capivaras são hospedeiros primários do *A. dubitatum*, específico deste cavídeo, e também o *A. cajennense* (TRAVASSOS; VALLEJO, 1942a). Vários trabalhos relatam carrapatos *A. dubitatum* infectados com rickettsias, inclusive do grupo da febre maculosa (LEMOS et al., 1996a; LABRUNA et al., 2004a; ESTRADA et al., 2006) e alguns trabalhos relatam esta espécie de carrapato parasitando humanos (FAMADAS et al., 1997; LABRUNA et al., 2007), desta forma esta espécie pode ser importante na epidemiologia de rickettsioses.

Entre os animais domésticos pode-se dizer que cães e equinos são importantes na epidemiologia da FMB. O cão pode agir como um animal sentinela em locais onde a transmissão da febre maculosa está associada ao *A. aureolatum*, já que este animal é hospedeiro primário da fase adulta deste carrapato, podendo levar este parasita para dentro da residência humana. Pinter et al., 2008 encontraram soro de 64% dos cães reativos a *R. rickettsii* na RIFI, no mesmo local onde esta espécie foi isolada de *A. aureolatum* (PINTER, LABRUNA, 2006). Vários trabalhos relatam a hipótese de o cão ser um reservatório natural do agente da febre maculosa. Nos EUA, o carrapato *D. variabilis*, que é um dos principais vetores da FMMR, tem o cão como hospedeiro primário (BURGDORFER, 1988). Demma et al. (2005), no Arizona, isolaram *R. rickettsii* de carrapatos *R. sanguineus* que infestavam cães. Estes carrapatos foram incriminados como vetores da FMMR em 16 pacientes que relataram contato com os cães

O equino é um dos hospedeiros primários do principal vetor da doença, o *A. cajennense* (LEMOS et al., 1996b). Inquéritos sorológicos mostraram altas taxas de positividade em sangue de equinos de áreas endêmicas, onde 77% dos animais apresentaram títulos \geq a 64 na RIFI (LEMOS et al., 1996b; SANGIONI et al., 2005). O cavalo pode ser considerado um animal sentinela para regiões

endêmicas e não endêmicas, pois percorrem grandes distâncias e são capazes de disseminar carrapatos infectados (SANGIONI et al., 2005; FREITAS et al., 2007).

No Brasil existem poucos trabalhos sobre rickettsias causadoras ou não da FMB realizados em áreas não endêmicas. A maioria dos estudos foi realizada em áreas onde casos da doença já foram relatados ou se apresentam de forma endêmica. Pesquisar locais que possuem potencial para desenvolver condições para o aparecimento desta doença, como presença de carrapatos vetores e seus hospedeiros, e a pesquisa das espécies de rickettsias que circulam nesta população também são importantes para garantir o diagnóstico precoce da doença (GALVÃO; RIBEIRO, 1993).

REFERÊNCIAS

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

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

BURGDORFER, W. Mountain spotted fever and scrub typhus. In: WALKER, D.H. **Biology of Rickettsial Diseases**. v. 1. Local: Boca Raton, 1988. p.33-50.

BURGDORFER, W., HAYES, S. F., MAVROS, A. J. Nonpathogenic rickettsiae in *Dermacentor andersoni*: a limiting factor for the distribution of *Rickettsia rickettsii*. In: BURGDORFER, W., ANACKER, R. L. **Rickettsiae and Rickettsial Diseases**. New York: Academic Press. Inc. New York, 1981, p.585-594.

BUSTAMANTE, M. E., VARELA, G. Distribucion de IAs Rickettsiasis em México. **Revista Del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales**. Local, v.8, p.3-14, 1947.

CALIC, S. B., GALVÃO, M. A. M., BACELLAR, F., ROCHA, C. M. B. M., MAFRA, C. L., LEITE, R. C., WALKER, D. H. Human ehrlichioses in Brazil: first suspect cases. **The Brazilian Journal of Infectious Disease**, v.8, n.3, p.259-262, 2004.

CAMARGO-NEVES, V. L. F., VIEIRA, M. L. V., SOUZA, C. E., LABRUNA, M. B., MAYO, R. C., SOUZA, S. S. L. **Manual de vigilância acarológica**. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 2004, v.1, 62p.

CICUTTIN, G. L., RODRIGUEZ VARGAS, M., JADO, I., ANDA, P. Primera detección de *Rickettsia massiliae* em la Ciudad de Buenos Aires, Resultados preliminares. **Revista Argentina Zoonosis**. Local, v.1, p.8-10, 2004.

COMER, M. K., Rocky mountain spotted fever. **Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v.21, n.1, p.27-44, 1991.

DEMMA, J. L., TRAEGER, M. S., NICHOLSON, W. L., PADDOCK, C. D., BLAU, D. M., EREMEEVA, M. E., CASCH, G. A., LEVIN, M. L., SINGLETON, J. JR., ZAKI, S. R., CHEEK, J. E., SWERDLOW, D. L., MCQUISTON, J. H. Rocky mountain spotted

fever from an unexpected tick vector in Arizona. **The New England Journal of Medicine**, v.353, n.6, p.587-593, 2005.

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

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

EREMEEVA, M. E., BOSSERMAN, E. A., DEMMA, J. L., ZAMBRANO, M. L., BLAU, D. M., DASCH, G. Isolation and identification of *Rickettsia massiliae* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks collected in Arizona. **Applied and Environmental of Microbiology**, v.72, p.5569-5577, 2006.

FAMADAS, K., LEMOS, E. R. S. COURA, J. R., SERRA-FREIRE, N. M. *Amblyomma cooperi* (Acari: Ixodidae) parasitando humano em área de foco de febre maculosa, São Paulo – Brasil. **Acta Parasitológica Portuguesa**, v. 45, p.154, 1997.

FENG, H., WALKER, D. H., Cross-protection between distantly related spotted fever group rickettsiae. **Elsevier**, v.21, p.3901-3905, 2003.

FREITAS, M. C. D. O. **Detecção de rickettsias do grupo da febre maculosa em cães e eqüinos em São José dos Pinhais**. 2007. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

FUENTES, L., CALDERÓN, A., HUN, L. Isolation and identification of *Rickettsia rickettsii* from rabbit tick (*Haemaphysalis leporispalustres*) in the atlantic zone of Costa Rica. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Local, v.34, p.464-467, 1985.

GALVÃO, M. A. M., CALIC, S. B., CHAMONE, C. B., MAFRA, C. L., CESARINO FILHO, G., OLANO, J. P., WALKER, D. H. Spotted fever rickettsiosis in Coronel Fabriciano, Minas Gerais State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.36, n.4, p.479-481, 2003.

GALVÃO, M.A.M., SILVA, L.J., NASCIMENTO, E. M. M., CALIC, S. B., SOUZA, R., BACELLAR, F. Rickettsioses no Brasil e Portugal: ocorrência, distribuição e diagnóstico. **Revista de Saúde Pública**. Rio de Janeiro, v.39, n.5, p.850-856, 2005.

GOMES, L.S. Typho exanthemático de São Paulo. **Brasil Médico**. Rio de Janeiro, v.17, n.52, p.919-922, 1933.

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

HORTA, M. C. **Estudo epidemiológico de *Rickettsia felis* em áreas endêmicas e não endêmicas para febre maculosa no estado de São Paulo**. 2006. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, São Paulo.

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.

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

LABRUNA, M. B. Carta acarológica. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Local, v.13, supp. 1, p.199-202, 2004.

LABRUNA, M. B. Cultivo celular de riquetsias no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 14., SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 2. 2006, Ribeirão Preto, **Anais...**, p.132-133.

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

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

LABRUNA, M. B., TEIXEIRA, R.H. F., WALKER, D. H. *Rickettsia belli* infectando carrapatos *Ixodes loricatus* em São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 13., SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 1. 2004c, Ouro Preto, **Anais...**, p.150.

LABRUNA, M. B., PINTER, A., TEIXEIRA, R. H. F. Life cycle of *Amblyomma cooperi* (Acari: Ixodidae) using capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) as hosts. **Experimental and Applied Acarology**, v.32, p.79-88, 2004d.

LABRUNA, M. B., PACHECO, R. C., NAVA, S., BRANDÃO, P.E., RICHTZENHAIN, L. J., GUGLIELMONE, A.A. Infection by *Rickettsia bellii* and *Candidatus "Rickettsia amblyommii"* in *Amblyomma neumanni* from Argentina. **Microb Eco. Local**, v.54, p.126-133, 2007a.

LABRUNA, M. B., PACHECO, R. C., RICHTZENHAIN, L. J., SZABÓ, M. P. J., Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii*, from *Haemaphysalis juxtackoch* ticks in the state of São Paulo, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.869-873, 2007b.

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

LEMOS, E. R. S., MACHADO, R. D., COURA, J. R., GUIMARÃES, M. A. A. M., CHAGAS, N. Epidemiological aspects of the brazilian spotted fever: serological survey of dogs and horses in na endemic área in the state of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. São Paulo, v.38, n.6, p.427-430, 1996b.

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

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

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 Medical of Entomology**, v.39, n.6, p.809-813, 2002.

MADERA, A., WEISBRICH, J. Surto de febre maculosa no estado de Santa Catarina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 13.; SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 1. 2004. Ouro Preto. **Anais...** p.364.

MANCINI, D. A. P., NASCIMENTO, E. M. M., TAVARES, V. R., SOARES, M. A. A ocorrência de rickettsioses do grupo *Rickettsia rickettsii*. **Revista de Saúde Pública**. São Paulo, v.17, p.493-499, 1983.

MAXEY, E. Some observations on the so-called spotted fever of Idaho. **Medical Sentinel**, v.7, n.1, p.433-438, 1899.

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

MELLES, H. H. B., COLOMBO, S., SILVA, M. V. Febre maculosa: isolamento de *Rickettsia* em amostra de biópsia de pele. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. São Paulo, v.34, n.1, p.37-41, 1992.

MONTEIRO, J. L. Vacina contra o typho exanthemático de São Paulo. **Memórias do Instituto Butantan**. São Paulo, v.8, p.11-20, 1933.

MOREIRA, J. A., MAGALHÃES, O. Typho exanthemático de Minas Geraes. **Brasil Médico**. Rio de Janeiro, v.44, n.21, p.465-470, 1935.

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

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

OLIVER, J. H. Biology and systematics of ticks (acari: ixodida). **Annu Rev Eco Syst.** Local, v.20, p.397-430, 1989.

PACHECO, R. C., **Pesquisa de *Rickettsia* spp em carrapatos *Amblyomma dubitatum* Neumann 1899 e *Amblyomma triste* Kosh 1844, provenientes do Brasil e Uruguai, respectivamente.** 2007. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo

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.

PATINO-CAMARGO, L. Nuevas Observaciones sobre un tercer foco de fiebre petequial (maculosa) en el hemisfério americano. **Bol. De La Ofic Sanit Panamericana**, v.20, p.112-1124, 1941.

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

PINTER, A., LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Annals of New York Academy of 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. **Cadernos de Saúde Pública**, v.24, n.2, p.247-252, 2008.

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

PLANK, S. J., TEIXEIRA, R. S., MILANESI, M. L. Febre Maculosa em Salvador: descrição de um caso. **Revista Médica da Bahia**, v.25, p.330-334, 1979.

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

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.

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

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

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

SANGIONI, L. A., HORTA, M. C., VIANNA, S. M. G., 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, n.2, p.265-269, 2005

SEXTON, D. J., MUNIZ, M., COREY, G. R., BREITSCHWERDT, E. B., HEGARTY, B. C., DUMLER, S. WALKER, D. H., PECANHA, 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 Medicine and Hygiene**, v.49, n.2, p.222-226, 1993.

SILVA, A. M. R. Situação epidemiológica da febre maculosa brasileira no estado de Santa Catarina. Disponível em: www.saude.sc.gov.br/dicaf. Acesso em: 25 jul. 2006.

SILVEIRA, I., PACHECO, R. C., SZABÓ, M. P. J., RAMOS, H. G. C., LABRUNA, M. B. First report of *Rickettsia parkeri* in Brazil. **Emerging Infectious Disease**, v.13, p.1111-1113, 2007.

SONENSHINE, D. E., LANE, R. S., NICHOLSON, W. L. Ticks (Ixodida). In: MULLEN, G., DURDEN, L. A. **Medical and Veterinary Entomology**: Academic Press, 2002. p.517-558.

SOUZA, C. E., CALIC, S. B., CAMARGO, M. C. G. O. O papel da capivara *Hydrochaeris hydrochaeris* na cadeia epidemiológica da febre maculosa brasileira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 13.;

SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 1., 2004, Ouro Preto. **Anais...**, p.203-205.

TRAVASSOS, J., VALLEJO, A. Comportamento de alguns cavídeos (*Cavia aperea* e *Hydrochoerus capybara*) às inoculações experimentais do vírus da febre maculosa. Possibilidade destes cavídeos representarem o papel de depositários transitórios do vírus na natureza. **Memórias do Instituto Butantan**. São Paulo, v.15, p.73-86, 1942a.

TRAVASSOS, J., VALLEJO, A. Possibilidade de *Amblyomma cajennense* se infectar em *Hydrochoerus capybara* experimentalmente inoculado com o vírus da febre maculosa. **Memórias do Instituto Butantan**, São Paulo, v.16, p.87-90, 1942b.

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

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.

YU, X. J., WALKER, D. H. The order Rickettsiales. In: DWORKING, M. (Ed.) **The Prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiology community** 3rd ed. New York: Springer Verlag, disponível em: <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125>, 2003. Acesso em: 17/04/2004.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Estudar a epidemiologia de rickettsias do Grupo de Febre Maculosa (GFM) em Londrina, PR,

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar e identificar carrapatos de vida livre do Parque Municipal Arthur Thomas e sangue de humanos que trabalham no parque;
- Coletar carrapatos de cães e eqüinos e sangue de cães eqüinos e humanos em uma região urbana de Londrina, que reúne condições para a circulação de rickettsias entre hospedeiros e vetores
- Determinar a prevalência de infecção por *Rickettsia* spp em carrapatos, através da reação em cadeia pela polimerase (PCR);
- Determinar a presença de anticorpos contra rickettsias do GFM, em soros de humanos, cães e equinos através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI);
- Analisar fatores associados à soroprevalência, através de questionário epidemiológico;

ARTIGO 1 – Pesquisa de Infecção por Rickettsias do Grupo da Febre Maculosa em Humanos, Cães, Equinos e por *Rickettsia* spp em Carrapatos em Londrina, PR.

RESUMO

A Febre Maculosa é uma doença causada por bactérias do gênero *Rickettsia* do Grupo da Febre Maculosa (GFM), sendo a *Rickettsia rickettsii* incriminada como o principal agente da Febre Maculosa Brasileira. Com o objetivo de obter informações sobre a circulação de rickettsias do GFM em Londrina, PR, foi realizada coleta de carrapatos de cães e eqüinos e coleta de sangue de cães, eqüinos e humanos, em um bairro da cidade, que reúne condições para a circulação de rickettsias entre hospedeiros e vetores. Um total de 66 carrapatos *Amblyomma cajennense* foram submetidos à extração de DNA e testados pela técnica de PCR para o gene *gltA*, presente em todas as espécies de rickettsias. Todos foram negativos. Soros de um total de 107 humanos, 73 cães e 26 equinos foram submetidos à Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), na qual foram utilizados antígenos brutos de *R. rickettsii* e *R. parkeri*. Foram considerados positivos aqueles que apresentaram titulação ≥ 64 . Para *R. rickettsii* foram positivas as amostras de soro de 5 (4,67%) humanos, 2 (2,74%) cães e 10 (38,50%) eqüinos e para *R. parkeri* 1 (0,93%) humano, 2 (2,74%) cães e 3 (11,53%) eqüinos. Todas as amostras que reagiram com *R. parkeri* também reagiram com *R. rickettsii*. Foi aplicado questionário epidemiológico contendo variáveis demográficas, sociais e ambientais, mas não houve resultado estatisticamente significativo. Os resultados obtidos na sorologia demonstram a circulação de rickettsias do GFM na região estudada. Apesar de não haver casos de febre maculosa descritos na cidade, é necessário que haja um trabalho de educação sanitária com a população, para realização de um controle eficiente de carrapatos.

Palavras-chave: Epidemiologia. Sorologia. Rickettsias. *Amblyomma cajennense*.

ARTICLE 1 – Research of Infection by *Rickettsia* of the Spotted Fever Group in Human, Dogs, Equine and by *Rickettsia* spp in Ticks in Londrina, PR

ABSTRACT

The spotted Fever is a disease caused by bacteria of the genus *Rickettsia* of the Spotted Fever Group (SFG), being the *Rickettsia rickettsii* the main agent of the Brazilian Spotted Fever. With the objective to gather information about the circulation of the rickettsiae of the SFG in Londrina, PR, were collected ticks from dogs and equine and drawn blood from dogs, equine and humans in a neighborhood with the sufficient conditions for a circulation of rickettsias among hosts and vectors. A total of 66 *Amblyomma cajennense* ticks were submitted to DNA extraction and tested with Polymerase Chain Reaction (PCR) for the *gltA* gene, which is present in all species of rickettsiae and all were negative. A total of 107 humans, 73 dogs and 26 horses serum were submitted to the Indirect Immunofluorescence Assay (IFA), in which were used as antigens the *R. rickettsii* and the *R. parkeri*. Were considered positive those that showed title ≥ 64 . For *R. rickettsii* were positive the serum samples of 5 (4.67%) humans, 2 (2.74%) dogs and 10 (38.50%) equine and for *R. parkeri* 1 (0.93%) human, 2 (2.74%) dogs and 3 (11.53%) equines. All the samples that reacted to *R. parkeri* also reacted to *R. rickettsii*. It was applied the epidemiological questionnaire with many demographical, social and environmental variables, but there was no statistically significant result. The results obtained in the serology showed the circulation of rickettsiae of the SFG in the region studied. Despite the fact that there were not cases of spotted fever described in the city, there is a need to reinforce social health education with the population in order to achieve an efficient tick control.

Keywords: Epidemiology. Serology. Rickettsiae. *Amblyomma cajennense*.

INTRODUÇÃO

Rickettsioses são doenças causadas por bactérias do gênero *Rickettsia*, família Rickettsiaceae, na qual está classificado o gênero *Rickettsia*. Estas bactérias são gram-negativas, com ciclo de vida intracelular obrigatório (McDADE; NEWHOUSE, 1986; YU; WALKER, 2003). No Grupo da Febre Maculosa (GFM), existem mais de 20 espécies descritas, sendo que pelo menos 16 causam infecção nos humanos (RAOULT; ROUX, 1997; RAOULT et al., 2002). Entre as espécies patogênicas, somente *R. rickettsii*, *R. parkeri* e *R. felis* foram descritas no Brasil. Destas, somente a *R. rickettsii* foi descrita em humanos e carrapatos e as outras duas em seus respectivos vetores (MELLES et al., 1992; OLIVEIRA et al., 2002; NASCIMENTO et al., 2005; SILVEIRA et al., 2007).

A *R. rickettsii* tem sido descrita como o agente da Febre Maculosa Brasileira (FMB), que é uma doença de caráter endêmico e a mais importante rickettsiose descrita no Brasil (GALVÃO et al., 2005). Casos da doença têm sido confirmados nos quatro estados da região Sudeste do país, com destaque para os estados de São Paulo e Minas Gerais (DIAS; MARTINS, 1939; SEXTON et al., 1993; LEMOS et al., 2001; ROZENTAL, et al., 2002; GALVÃO et al., 2003). Alguns casos foram relatados em outros estados fora da região Sudeste, dentre eles Bahia, Paraná (São José dos Pinhais), Rio Grande do Sul (região de Serro Grande) e Santa Catarina (PLANK et al., 1979; MADEIRA, WEISBRICH, 2004; MARTINS, 2004 apud PACHECO, 2007). Apesar disso, os únicos estados que mantêm vigilância epidemiológica da doença são Minas Gerais e São Paulo (GALVÃO et al., 2005).

No Brasil, dois carrapatos são incriminados como transmissores da *R. rickettsii* aos homens e aos animais, *A. cajennense* e *A. aureolatum* (DIAS; MARTINS, 1939; PINTER; LABRUNA, 2006), sendo que o *A. cajennense* é o vetor mais comumente associado com a doença (MOREIRA; MAGALHÃES, 1935).

A importância das rickettsioses tem crescido muito não só pela identificação de novas espécies, mas também porque sua incidência e distribuição são maiores do que se imaginava (GALVÃO et al., 2005). Labruna et al., (2004) detectaram *Rickettsia* spp em *A. dubitatum*. *R. parke* foi encontrada por Silveira et al. (2007) em *A. triste*. Recentemente foram relatados os primeiros casos humanos de infecção por *R. parkeri* nos Estados Unidos (PADDOCK et al., 2004; WHITMAN et al., 2007).

A *R. parkeri* foi isolada pela primeira vez em 1937, de carrapatos da espécie *A. maculatum* no Texas, EUA (PARKER et al., 1939). Em cobaias (*Cavia aperea porcellus*) esta rickettsia produziu sinais clínicos semelhantes ao da *R. rickettsii*, porém de forma mais branda e sem mortalidade. A FMB, causada pela *R. rickettsii* apresenta sintomatologia mais severa, além de ser caracterizada por alta letalidade (DIAS; MARTINS, 1939; MANCINE et al., 1983). Já a infecção por *R. parkeri* causa nos humanos sinais mais brandos, com linfadenopatia e lesão papular típica no local da picada do carrapato (PADDOCK et al., 2004; WHITMAN et al., 2007). Desta forma é possível que casos desta rickettsiose estejam ocorrendo no Brasil, ou de forma silenciosa, ou sendo diagnosticada como FMB causada pela *R. rickettsii* (SILVEIRA et al., 2007).

Entre os animais domésticos pode-se dizer que cães e equinos são importantes na epidemiologia da FMB. Eles são animais sentinela e atuam como amplificadores da população de carrapatos, além do que os cavalos percorrem grandes distâncias e são capazes de disseminar carrapatos infectados (LEMOS et al., 1996; SANGIONI et al., 2005; FREITAS et al., 2007).

Existem poucos trabalhos sobre rickettsias causadoras ou não da FMB realizados em áreas não endêmicas em nosso país. A maioria dos estudos foi realizada em áreas onde casos da doença já foram relatados ou se apresentam de forma endêmica. O presente trabalho teve como objetivo pesquisar um local que reúne condições para a circulação de rickettsias entre hospedeiros e vetores, além das espécies de rickettsias que circulam na população de carrapatos e da presença de anticorpos circulantes na população estudada.

MATERIAL E MÉTODOS

Áreas de estudo

Este estudo foi realizado em uma região do Jardim Califórnia, bairro situado no município de Londrina, estado do Paraná, região considerada não endêmica para FMB.

A cidade de Londrina (23°19'S/51°10'W) está localizada na região norte central do estado do Paraná, sul do Brasil. Situa-se a 610 metros acima do nível do mar e possui clima subtropical, com chuvas o ano todo, mas com tendência a concentração de chuvas no verão. A temperatura média anual fica em torno de 20°C (Londrina, 2008).

O Jardim Califórnia é um bairro da zona leste de Londrina, onde um grupo de carroceiros é coordenado pela Secretaria Municipal do Meio Ambiente (SEMA). A maioria destes carroceiros mora no bairro, ao lado de uma praça, onde os cavalos são colocados para descansar e se alimentar. Esta mesma praça é utilizada para lazer dos moradores, principalmente crianças, e apresenta uma grande infestação de carrapatos. (Figura 1)

Coleta de carrapatos

No Jardim Califórnia, cujas ruas têm acesso direto à praça dos carroceiros, foram realizadas sete visitas aos moradores no período de março a julho de 2007. Neste local foram coletados 59 carrapatos adultos de cães e 123 de eqüinos em 53 casas. A coleta foi realizada utilizando-se uma pinça e, com leves torções seguidas de movimento de tração os carrapatos foram retirados inteiros, evitando-se a quebra do aparelho bucal, o qual é imprescindível para identificação (CAMARGO-NEVES et al., 2004).

Os carrapatos foram colocados em embalagens contendo etanol absoluto e transportados até o Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), da Universidade Estadual de Londrina (UEL), onde foram identificados, segundo chave taxonômica de Aragão e Fonseca (1961) e Guimarães et al. (2001).

Coleta de sangue

Durante as visitas aos moradores, amostras de sangue foram coletadas de 73 cães e 26 eqüinos em 53 casas, sob autorização dos proprietários. Entre os moradores deste local, um total de 107 pessoas se submeteu à coleta de sangue, a qual foi realizada na Unidade Básica de Saúde Eldorado da Rede Municipal de Saúde.

As coletas de sangue de humanos foram realizadas por enfermeiros, através de venopunção na veia braquial. As coletas de sangue de animais foram realizadas por veterinários através de venopunção da veia braquial (cães) e da veia jugular (cães e eqüinos).

As amostras de sangue de humanos e animais foram acondicionadas em tubos estéreis, identificadas e transportadas ao laboratório, onde foram submetidas à centrifugação para retração do coágulo e obtenção do soro. Em seguida as amostras foram aliqüotadas em tubos de polipropileno, tipo *ependorf*, e estocados a - 20°C até a realização da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).

A pesquisa teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (número 125/07) e do Comitê de Ética em Experimentação Animal (número 69/2006), ambos da UEL. (Anexos 1 e 2).

Extração de DNA

A extração de DNA e a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) foram realizadas apenas com carrapatos adultos da espécie *A. cajennense*, sendo 65 coletados em eqüinos e um em cão.

Cada carrapato foi previamente seco à temperatura ambiente. Com o auxílio de uma lâmina de bisturi estéril, foi realizado um corte ao meio do carrapato no sentido longitudinal. Uma metade do carrapato foi triturada com a ajuda de um micropistilo e a extração realizada de acordo com o protocolo de Chomkzynski (1993) com modificações de Sangioni (2003), que está descrito no Anexo 3. A outra metade foi levada ao freezer - 20°C para aproveitamento em outra extração.

Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

As amostras extraídas de *A. cajennense* coletados de cães e eqüinos foram submetidas à PCR na forma de *pools*. Cada *pool* foi composto por material extraído

de cinco carrapatos. A reação foi realizada em 13 pools de carrapatos coletados de eqüinos e, individualmente, em um carrapato coletado de cão.

Foram utilizados como oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) RpCS.877p (GGGGGCCTGCTCACGGCGG) e RpCS.1258n (ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA), que amplificam uma região de 381 pares de base do gene *gltA*, que codifica a enzima citrato sintase de *Rickettsia* spp (REGNERY et al., 1991).

Para as reações de PCR utilizou-se 2,5 µL de tampão buffer (10X), 0,2 µL de nucleotídeos trifosfatados (dNTP 1,25 mM), 1,25 µL de MgCl₂ (50 mM), 5 µL de *primer* (10 pmol), 0,3 µL de Taq DNA polimerase (5000 U/mL), 5 µL de amostra, H₂O ultra pura (q.s.p. 25 µL). Como controle positivo das reações, utilizou-se DNA genômico de *Rickettsia* sp (NOD) encontrada em *A. nodosum*, cedido pelo 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). Como controle negativo, utilizou-se água estéril.

As etapas e condições de amplificação foram: desnaturação inicial (95°C/5 min), número de ciclos (35), desnaturação (95°C/20 seg), anelamento (48°C/30 seg), extensão (72°C/2 min), extensão final (60°C/10 min) (HORTA et al., 2002).

Os produtos amplificados foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídeo (0,5 mg/mL), em cuba horizontal, com tampão de corrida TBE 1X, sob voltagem de 100 volts e 50mA por aproximadamente uma hora. A visualização das bandas foi realizada através de um transluminador ultravioleta. Estas foram comparadas com padrão de peso molecular que possuía fragmentos múltiplos de 123 pb.

Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Todos os soros de humanos, cães e eqüinos foram submetidos à RIFI, que foi realizada no Laboratório de Doenças Parasitárias (VPS-FMVZ-USP). Foram utilizadas lâminas contendo antígenos brutos de *R. rickettsii* e *R. parkeri* e considerados positivos os soros com título ≥ 64. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio epifluorescente. O protocolo da reação foi realizado segundo Horta et al. (2004) (Anexo 4).

Análise estatística

Foi aplicado questionário epidemiológico para cada humano que se submeteu à coleta de sangue e para cada proprietário, cujo animal foi submetido à coleta (Apêndice 1 e 2). Para avaliação das variáveis foi utilizado o teste Qui-quadrado, ou Exato de Fisher, e cálculo de Odds Ratio com intervalo de confiança de 95%. Adotou-se o nível de significância de 5%. Os cálculos foram executados no programa Epi6 (CDC/Atlanta).

RESULTADOS

Coleta de carrapatos

Entre os cães foram encontrados 59 carrapatos adultos, sendo 58 (98,3%) *Rhipicephalus sanguineus* e um (1,7%) *A. cajennense*. Entre os eqüinos foram encontrados 123 carrapatos adultos, sendo 68 (55,28%) *A. cajennense* e 55 (44,72%) *Anocentor nitens*.

PCR dos carrapatos

Os 13 *pools* de material extraído de *A. cajennense* coletados de eqüinos e o material extraído do único *A. cajennense* coletado de cão foram considerados negativos, uma vez que não houve visualização de bandas compatíveis com a banda produzida pelo controle positivo. Os controles negativos também não produziram nenhuma banda. A Figura 2 ilustra os resultados da PCR de algumas amostras.

Reação de Imunofluorescência Indireta

Quando o antígeno utilizado foi *R. rickettsii* foram consideradas positivas as amostras de soro de cinco (4,67%) dos 107 humanos, 10 (38,5%) dos 26 equinos duas (2,74%) dos 73 cães. Na RIFI com *R. parkeri* foram positivas uma (0,93%) das 107 amostras de humanos, três (11,53%) das 23 amostras de eqüinos e duas (2,74%) das 73 de cães.

Todas as amostras que foram positivas para *R. parkeri* também foram positivas para *R. rickettsii*. A Tabela 1 mostra a relação de todos os soros positivos e os títulos finais obtidos pela RIFI, para as duas espécies de rickettsias testadas.

Entre os 107 humanos que se submeteram à coleta de sangue, 71 (66,4%) nasceram e sempre moraram na cidade de Londrina; 93 (86,9%) já foram picados por carrapatos; 78 (72,9%) nunca habitaram a zona rural. Dos 53 maiores de 18 anos, 50 (94,3%) nunca trabalharam com animais ou na zona rural. Entre os cinco humanos, cujo resultado sorológico foi positivo, quatro pertenciam ao sexo feminino, dois encontravam-se dentro da faixa etária de zero a 12 anos e três de 21 a 60 anos. Três eram nascidos em Londrina; três relataram ter sido picados por carrapatos da praça e dois já haviam habitado a zona rural.

Entre os 73 cães que foram submetidos à coleta de sangue e de carrapatos, 61 (83,6%) tinham acesso à rua e à praça onde ficavam os cavalos e onde havia grande infestação de carrapatos; 50 (68,5%) apresentaram carrapato fixado à pele durante a inspeção; 52 (71,2%) possuíam proprietários que utilizavam carrapaticidas e em 45 (86,5%) cães os proprietários aplicavam o carrapaticida apenas quando viam o carrapato. Dos 53 proprietários visitados, 28 (52,83%) afirmavam ter visto carrapatos dentro de casa. Os dois cães positivos possuíam carrapatos durante a inspeção e um possuía acesso à rua.

Os 26 eqüinos que foram submetidos à coleta de sangue e de carrapatos eram utilizados no trabalho de carroceiro; 18 (69,2%) ficavam amarrados na praça para descansar e se alimentar, e os outros amarrados em terrenos; 24 (92,3%) possuíam carrapato no momento da inspeção; 23 (88,46%) possuíam proprietários que relataram uso de carrapaticidas e em 22 (95,7%) eqüinos os proprietários aplicavam carrapaticidas apenas quando viam o carrapato.

De acordo com os cálculos realizados não houve diferença estatisticamente significativa quanto à presença de anticorpos anti- *R. rickettsii* e as variáveis avaliadas. (Tabelas 2, 3 e 4)

DISCUSSÃO

Na praça dos carroceiros, no Jardim Califórnia, de onde se coletou carrapatos de equinos e cães, foram identificadas as espécies *A. cajennense* (55,28%) e *A. nitens* (44,72%) nos equinos, o que pode ser explicado pelo fato de que este animal é hospedeiro primário destas duas espécies de carrapatos (LABRUNA et al., 2001). Estes mesmos autores pesquisaram carrapatos em 680 cavalos de 40 fazendas no estado de São Paulo e encontraram *A. nitens*, *A. cajennense* e *Boophilus microplus* parasitando os animais, sendo que a espécie mais comum foi o *A. nitens* e, este, estava presente em todas as fazendas que também possuíam infestações por *A. cajennense*. Freitas et al. (2007), em trabalho realizado com 75 cavalos de carroceiro em São José dos Pinhais, PR, encontraram *A. nitens* e *Amblyomma* spp parasitando estes animais.

Entre os cães, foram encontradas as espécies *R. sanguineus* (98,3%) e *A. cajennense* (1,7%). O cão é o hospedeiro primário do *R. sanguineus* e, portanto, é normal que esta espécie seja mais prevalente entre estes animais. Neste estudo, 83,6% dos cães possuíam acesso à rua e à praça dos carroceiros, onde há grande infestação por *A. cajennense* e, mesmo assim, esta espécie foi representada por apenas um exemplar entre os cães. Labruna et al. (2001a) estudaram a ocorrência de carrapatos em cães de área rural do Norte do Paraná e encontraram maior prevalência do *R. sanguineus*, mesmo estes cães tendo acesso à áreas de pasto e mata e, somente em uma propriedade das 20, nas quais foram realizadas coletas de carrapatos, os cães apresentaram infestações múltiplas por três espécies diferentes de carrapatos. Oyafuso et al. (2002) realizaram coleta de carrapatos em uma população de cães atendida no Hospital Veterinário da UEL e identificaram 96% das amostras como *R. sanguineus* e 4% pertencentes ao gênero *Amblyomma*. Certamente, a baixa frequência de *A. cajennense* na população de cães do presente estudo se deve ao fato de que esta espécie tem preferência pelos equinos e, geralmente, ataca outros hospedeiros quando a carga parasitária nos equinos é muito alta (LABRUNA et al., 2001). Além disso, durante a inspeção dos animais para captura de carrapatos, foi dado maior enfoque ao estágio adulto, e menos aos estágios imaturos. Sabe-se que os estágios imaturos são menos específicos e, portanto, há maior chance de encontrá-los parasitando outros animais que não os

eqüinos. Além do que, as coletas foram realizadas entre os meses de março e julho, período no qual há maior prevalência de larvas de acordo com a dinâmica sazonal do *A. cajennense*, como já descrito por Labruna et al. (2002).

Entre a população de *A. cajennense* coletada de animais, não foi encontrado resultado positivo na PCR. Isto provavelmente se deve à pequena amostra utilizada, que foi de 65 carrapatos em 13 pools e um individual. Outros trabalhos utilizaram populações maiores de *A. cajennense* e encontraram pequenas taxas de infecção por rickettsias nestas populações. Sangioni et al. (2005) analisaram, através da PCR, 1468 carrapatos adultos da espécie *A. cajennense* de áreas endêmicas e não endêmicas do estado de São Paulo e todos apresentaram resultados negativos. Estrada et al. (2006) encontrou 0,98% de *A. cajennense*, coletados em parque urbano de Campinas, SP, infectados por *R. bellii*.

Neste estudo a prevalência de soros positivos em humanos foi de 4,67%, de eqüinos foi de 10,38% e de cães foi de 2,74%.

A RIFI é o teste de escolha para diagnóstico sorológico de infecção por rickettsias em humanos e animais. Entretanto, reação cruzada é observada entre as rickettsias do GFM, o que dificulta a identificação da espécie envolvida na infecção. A realização de testes com diferentes espécies de rickettsias de ocorrência conhecida na área de estudo é o ideal, já que freqüentemente títulos de anticorpos homólogos são maiores que de anticorpos heterólogos e, em alguns casos, esta diferença é grande o bastante para identificar a espécie que está promovendo a resposta imune (HORTA et al., 2004; PINTER et al., 2008). Horta et al. (2007) avaliaram amostras de soro de humanos, eqüinos, cães, gatos e gambás de quatro áreas endêmicas e uma não endêmica no estado de São Paulo. As amostras foram testadas através da RIFI utilizando quatro espécies de rickettsias (*R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. felis* e *R. bellii*). As amostras de soro que exibiram títulos para uma espécie de rickettsia, no mínimo, quatro vezes maior que o observado para qualquer uma das outras espécies testadas, foram consideradas homólogas para a espécie com maior titulação. Estas espécies foram utilizadas pelos autores por já terem sido descritas no estado de São Paulo (LABRUNA et al., 2004; PINTER; LABRUNA, 2006; HORTA, 2006; SILVEIRA et al., 2007; PACHECO, 2007).

O presente estudo avaliou reação sorológica utilizando apenas dois antígenos, *R. rickettsii* e *R. parkeri*. Estas espécies foram escolhidas, pois não há trabalhos que relatem quais espécies circulam na região. A *R. rickettsii* é a espécie

mais utilizada em RIFI e a *R. parkeri* já foi descrita nos EUA, Uruguai e Brasil, mostrando ser de ampla distribuição na América (PADDOCK et al., 2004; PACHECO et al., 2006; SILVEIRA et al., 2007; LABRUNA et al., 2007). Deste modo foi possível constatar diferença de quatro vezes na titulação entre *R. rickettsii* e *R. parkeri* em uma amostra de soro humano, duas de eqüino e duas de cão.

A *R. parkeri* foi isolada apenas de carrapatos no Brasil (SILVEIRA et al., 2007), no entanto alguns trabalhos têm incriminado esta espécie como causadora de infecção em humanos e animais. Estes trabalhos utilizaram, na RIFI, várias espécies de rickettsias, de ocorrência conhecida no Brasil (LABRUNA et al., 2007; HORTA et al., 2007). Com os resultados do presente estudo, não foi possível concluir que a *R. rickettsii* é a espécie que está circulando nesta população, já que foram utilizados somente dois antígenos, mas apenas que estes humanos e animais entraram em contato com alguma espécie de rickettsia do GFM, com uma probabilidade muito pequena de ser a *R. parkeri*, já que os títulos encontrados quando utilizado este antígeno foram muito baixos. Seria interessante testar outras espécies para determinar qual rickettsia estaria estimulando a resposta imune nesta população.

Del Guercio, et al. (1997) pesquisou anticorpos anti-*R. rickettsii* no soro de 473 humanos em uma localidade rural no município de Pedreira, SP, onde casos de FMB foram descritos, e encontraram 5,3% de positivos, resultado não muito diferente do encontrado no presente trabalho. Lemos et al. (1996) realizaram pesquisa sorológica em cães e equinos de áreas onde casos de FMB nunca foram descritos, e encontraram 27,3% de eqüinos e 12,9% de cães positivos na RIFI, cujo antígeno utilizado foi a *R. rickettsii*. O resultado encontrado em cães por estes autores foi um pouco maior que o encontrado no presente trabalho, isto provavelmente porque os cães estudados por eles habitavam a zona rural e, portanto, ficavam mais expostos a uma população maior de carrapatos, principalmente às espécies associadas com a transmissão de rickettsias. Sangioni et al. (2005) realizaram sorologia em humanos, cães e eqüinos de áreas endêmicas e não endêmicas do estado de São Paulo e encontraram reação positiva apenas nos soros dos animais de áreas endêmicas. Estes autores não encontraram nenhuma reação positiva entre os humanos de área endêmica e não endêmica e animais de área não endêmica, diferindo dos resultados encontrados no presente trabalho.

Neste trabalho, entre os humanos e a maioria dos eqüinos, foram encontrados títulos de anticorpos anti-*R. rickettsii* baixos. Títulos mais altos foram

observados em dois eqüinos (os dois iguais a 512) e nos dois cães positivos (um igual a 1024 e o outro igual a 2048). Lemos et al. (1996) encontraram os maiores títulos de anticorpos entre a população de eqüinos e cães de área endêmica. Entre os eqüinos, estes autores encontraram título máximo de 512 para os animais provenientes de área não endêmica, como ocorreu no presente trabalho. No entanto, o título máximo encontrado para cães de área não endêmica foi igual a 64 e títulos como 1024 e 2048 foram encontrados apenas em cães da área endêmica. O fato de dois cães da praça terem apresentado títulos altos não torna a região endêmica, mas alerta para a circulação de alguma rickettsia na região, principalmente porque estes cães, segundo relato dos proprietários, nunca habitaram outro local.

A maior freqüência de soropositivos entre os eqüinos pode ser explicada pelo fato de que o *A. cajennense* se alimenta preferencialmente em seu hospedeiro primário, que incluem os cavalos (LABRUNA et al., 2002). Já humanos e cães são hospedeiros acidentais desta espécie de carrapato, sendo atacados por ela quando há alta infestação nos eqüinos ou ausência destes no local (LABRUNA et al., 2001a). Neste estudo, entre a população de cães, o carrapato mais encontrado parasitando estes animais foi o *R. sanguineus*, o que é comum para cães de áreas urbanas (RIBEIRO et al., 1997). No caso dos humanos, 86,9% relataram terem sido parasitados por carrapatos provenientes da praça dos carroceiros, que muito provavelmente era o *A. cajennense*. No entanto, os humanos tendem a remover os carrapatos antes que a transmissão da rickettsia através da saliva seja eficiente, o que ajuda a explicar a baixa freqüência de soropositivos entre população humana quando comparada com a população de eqüinos (HORTA et al., 2004).

Ao analisar os questionários epidemiológicos, foi possível observar que as populações de humanos, de cães e de eqüinos do local estudado convivem entre si e estão expostas à mesma população de carrapatos. Diante disso e dos resultados sorológicos observados, mesmo com a ausência de relatos de casos de febre maculosa na cidade, faz-se necessário um trabalho de educação sanitária e orientação da população para evitar o contato com os carrapatos, além de um controle efetivo da população no meio ambiente e nos animais.

REFERÊNCIAS

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

CAMARGO-NEVES, V. L. F., VIEIRA, M. L. V., SOUZA, C. E., LABRUNA, M. B., MAYO, R. C., SOUZA, S. S. L. **Manual de vigilância acarológica**. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 2004, v.1, 62p.

CHOMKZYNSK, P. A reagent for the single step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **Biotechniques**, v.15, n.3, p.532-537, 1993.

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

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, SP, Brasil. Inquérito sorológico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.30, n.1, p.47-52, 1997.

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

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

FREITAS, M. C. D. O. **Detecção de rickettsias do grupo da febre maculosa em cães e eqüinos em São José dos Pinhais, PR**. 2007. (Dissertação: Mestrado em Ciências Veterinárias) – UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, Curitiba.

GALVÃO, M. A. M., CALIC, S. B., CHAMONE, C. B., MAFRA, C. L., CESARINO FILHO, G., OLANO, J. P., WALKER, D. H. Spotted fever rickettsiosis in Coronel Fabriciano, Minas Gerais State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.36, n.4, p.479-481, 2003.

GALVÃO, M.A.M., SILVA, L.J., NASCIMENTO, E. M. M., CALIC, S. B., SOUZA, R., BACELLAR, F. Rickettsioses no Brasil e Portugal: ocorrência, distribuição e diagnóstico. **Revista de Saúde Pública**. Rio de Janeiro, v.39, n.5, p.850-856, 2005.

GUIMARÃES, J. H., TUCCI, H. E. C., BARROS-BATTESTI, D. M. **Ectoparasitos de importância veterinária**. São Paulo: Editora Plêiade, 2001, 213 p.

HORTA, M. C. **Pesquisa de infecção por rickettsias do grupo da febre maculosa em humanos, eqüídeos, caninos e em diferentes estádios de vida de**

***Amblyomma cajennense*, provenientes de uma área endêmica do estado de São Paulo.** 2002. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, São Paulo.

HORTA, M. C. **Estudo epidemiológico de *Rickettsia felis* em áreas endêmicas e não endêmicas para febre maculosa no estado de São Paulo.** 2006. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, São Paulo.

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.

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

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

LABRUNA, M. B., SOUZA, S. L. P., GUIMARÃES JR, J. S. PACHECO, R. C., PINTER, A., GENNARI, S. M. Prevalência de carrapatos em cães de áreas rurais da região norte do estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v.53, n.5, p.553-556, 2001a.

LABRUNA, M. B., KAZAI, N., FERREIRA, F., FACCINI, J. L. H., GENNARI, S. M., 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, T., HORTA, M. C., BOUYER, D. H., MCBRIDE, J. W., PINTER, A., POPOV, V., GENNARI, S. M., WALKER, D. H. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. **Journal Clinical of Microbiology,** v.42, p.90-98, 2004.

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.249-256, 2007.

LEMOS, E. R. S., MACHADO, R. D., COURA, J. R., GUIMARÃES, M. A. A. M., CHAGAS, N. Epidemiological aspects of the brazilian spotted fever: serological survey of dogs and horses in an endemic área in the state of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.** São Paulo, v.38, n.6, p.427-430, 1996.

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

LONDRINA. Disponível em <<http://www.wikipedia.org/wiki/londrina>> Acesso em 12 jan. 2008.

MADERA, A., WEISBRICH, J. Surto de febre maculosa no estado de Santa Catarina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 13.; SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 1. 2004. Ouro Preto. **Anais...** p.364.

MANCINI, D. A. P., NASCIMENTO, E. M. M., TAVARES, V. R., SOARES, M. A. A ocorrência de rickettsioses do grupo *Rickettsia rickettsii*. **Revista de Saúde Pública**. São Paulo, v.17, p.493-499, 1983.

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

MELLES, H. H. B., COLOMBO, S., SILVA, M. V. Febre maculosa: isolamento de *Rickettsia* em amostra de biópsia de pele. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. São Paulo, v.34, n.1, p.37-41, 1992

MOREIRA, J. A., MAGALHÃES, O. Typho exanthemático de Minas Geraes. **Brasil Médico**. Rio de Janeiro, v.44, n.21, p.465-470, 1935.

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

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

OYAFUSO, M. K., DAGNONE, A. S., VIDOTTO, O., MORAIS, H. S. A. Caracterização de carrapatos parasitas de cães em uma população hospitalar no norte do Paraná. **Semina: ciências agrárias**, v.23, n.1, p.71-74, 2002.

PACHECO, R. C., **Pesquisa de *Rickettsia* spp em carrapatos *Amblyomma dubitatum* Neumann 1899 e *Amblyomma triste* Kosh 1844, provenientes do Brasil e Uruguai, respectivamente.** 2007. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo

PACHECO, R. C. VENZAL, J. M. RICHTZENHAIN, L. J., LABRUNA, M. B. *Rickettsia parkeri* in Uruguay. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, n.11, p.1804-1805, 2006.

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.

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

PINTER, A., LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Annals of New York Academy of 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. **Cadernos de Saúde Pública**, v.24, n.2, p.247-252, 2008.

PLANK, S. J., TEIXEIRA, R. S., MILANESI, M. L. Febre Maculosa em Salvador: descrição de um caso. **Revista Médica da Bahia**, v.25, p.330-334, 1979.

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.1576-1589, 1991.

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

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

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.

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

SANGIONI, L. A., **Pesquisa de Infecção por rickettsias do grupo da febre maculosa, em humanos, cães, eqüídeos e em adultos de *Amblyomma cajennense*, em região endêmica e não endêmica do estado de São Paulo**. 2003. (Tese: Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, São Paulo.

SANGIONI, L. A., HORTA, M. C., VIANNA, S. M. G., 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, n.2, p.265-269, 2005.

SEXTON, D. J., MUNIZ, M., COREY, G. R., BREITSCHWERDT, E. B., HEGARTY, B. C., DUMLER, S. WALKER, D. H., PECANHA, 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 Medicine and Hygiene**, v.49, n.2, p.222-226, 1993.

SILVA, A. M. R. Situação epidemiológica da febre maculosa brasileira no estado de Santa Catarina. Disponível em: www.saude.sc.gov.br/dive. Acesso em: 25 jul. 2006.

SILVEIRA, I., PACHECO, R. C., SZABÓ, M. P. J., RAMOS, H. G. C., LABRUNA, M. B. First report of *Rickettsia parkeri* in Brazil. **Emerging Infectious Disease**, v.13, p.1111-1113, 2007.

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.

YU, X. J., WALKER, D. H. The order Rickettsiales. In: DWORKING, M. (Ed.) **The Prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiology community** 3rd ed. New York: Springer Verlag, disponível em: <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125>, 2003. Acesso em: 17/04/2004.

FIGURAS E TABELAS DO ARTIGO 1



Figura 1 – Foto de Satélite da praça dos carroceiros, Jd.Califórnia, Londrina, 2007; as marcações indicam as ruas, cujos moradores se submeteram à coleta de sangue e cujos animais foram submetidos à coleta de sangue e de carrapato

Fonte: Google maps: <http://www.maps.google.com.br>

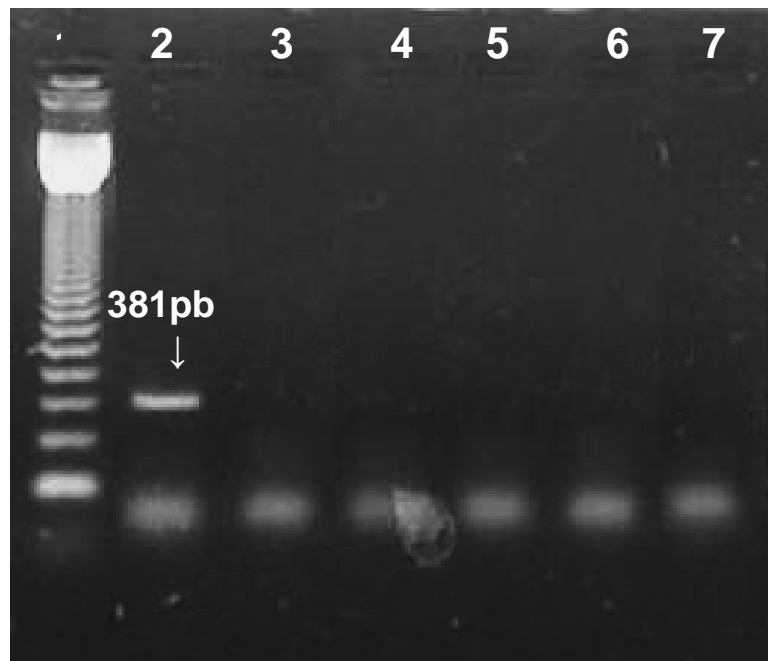


Figura 2 – Fotografia de um gel de agarose 1,5% de produtos de PCR realizado a partir de material extraído de *Amblyomma cajennense*. Coluna 1, marcador de peso molecular (123pb); coluna 2, controle positivo; colunas 3, 4, 5 e 6, amostras negativas; coluna 7, controle negativo.

Tabela 1 – Comparação entre os títulos finais obtidos pela RIFI, para as duas espécies de rickettsias testadas, dos soros de humanos (H), eqüinos (E) e cães (C), Londrina, 2007.

| Soro | Titulação RIFI | |
|------------|------------------------------|---------------------------|
| | <i>Rickettsia rickettsii</i> | <i>Rickettsia parkeri</i> |
| H49 | 128 | NR |
| H53 | 64 | NR |
| H70 | 128 | 64 |
| H80 | 64 | NR |
| H91 | 64 | NR |
| E2 | 512 | 128 |
| E5 | 64 | NR |
| E8 | 64 | NR |
| E11 | 512 | NR |
| E15 | 64 | 64 |
| E16 | 64 | NR |
| E21 | 64 | NR |
| E23 | 64 | 64 |
| E24 | 64 | NR |
| E25 | 64 | NR |
| C24 | 1024 | 64 |
| C41 | 2048 | 128 |

NR: Não Regente

Tabela 2 – Resultado do teste de Qui-quadrado quanto à presença de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii* e variáveis relativas a 107 moradores de um bairro da cidade de Londrina, PR, 2007

| Variáveis | Opções | Positivos/Total (%) | Valor de p | OR (IC95%) |
|----------------------------------------------------|-----------------------------|---------------------|------------|--------------------|
| Idade | 0 - 12 anos | 2/51 (2,92) | 0,608 | - |
| | 13 - 20 anos | 0/7 (0) | | |
| | 21 - 60 anos | 3/38 (7,90) | | |
| | Acima de 60 anos | 0/11 (0) | | |
| Origem | Londrina | 3/71 (4,22) | 0,755 | - |
| | São Paulo (Estado) | 0/5 (0) | | |
| | Minas Gerais | 0/6 (0) | | |
| | Outros locais não endêmicos | 2/25 (8,00) | | |
| Locais habitados anteriormente | Londrina | 4/103 (3,90) | 0,057 | - |
| | São Paulo (Estado) | 1/3 (33,33) | | |
| | Outros locais não endêmicos | 0/1 (0) | | |
| Histórico de picada por carrapato | Sim | 3/93 (3,22) | 0,127* | 0,2 (0,02 - 1,96) |
| | Não | 2/14 (14,28) | | |
| Tempo de permanência do carrapato | Até cinco horas | 2/41 (4,88) | 0,581 | 2,62 (0,17-77,12) |
| | Acima de cinco horas | 1/52 (1,92) | | |
| Já habitou Zona Rural | Sim | 2/29 (6,90) | 0,611* | 1,85 (0,20 -14,94) |
| | Não | 3/78 (3,85) | | |
| Trabalhou ou Trabalha com animais ou na Zona Rural | Sim | 0/3 (0) | 1* | - |
| | Não | 3/50 (6,00) | | |
| Possui equino | Sim | 1/36 (2,77) | 0,661 | 0,48 (0,02 - 4,85) |
| | Não | 4/71 (5,63) | | |
| Possui cão | Sim | 2/86 (2,33) | 0,051* | 0,14 (0,02 - 1,16) |
| | Não | 3/21 (14,29) | | |
| | Não | 0/1 (0) | | |

* Teste exato de Fisher

Tabela 3 – Resultado do teste de Qui-quadrado quanto à presença de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii* e variáveis relativas a 73 cães de um bairro da cidade de Londrina, PR, 2007.

| Variáveis | Opções | Positivo/Total (%) | Valor de p | OR(IC95%) |
|----------------------------------|----------|--------------------|------------|------------------|
| Proprietário possui equino | Sim | 0/19 (0) | 1* | - |
| | Não | 2/54 (3,7) | | |
| Presença de carrapato na casa | Sim | 2/37 (5,41) | 0,4931* | - |
| | Não | 0/36 (0) | | |
| Cães têm acesso à rua | Sim | 1/61 (1,64) | 0,3037* | 0,18 (0 - 7,48) |
| | Não | 1/12 (8,33) | | |
| Presença de carrapato no cão | Sim | 2/50 (4) | 1* | - |
| | Não | 0/23 (0) | | |
| Época do ano de maior infestação | Calor | 1/33 (3,03) | 1* | 1,06 (0 - 41,66) |
| | Ano Todo | 1/35 (2,86) | | |
| Uso de Carrapaticida | Sim | 0/52 (0) | 0,0799* | - |
| | Não | 2/21 (9,52) | | |

* Teste exato de Fisher

Tabela 4 – Resultado do teste de Qui-quadrado em relação à presença de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii* e variáveis relativas a 26 equinos de um bairro da cidade de Londrina, PR, 2007.

| Variáveis | Opções | Positivo/Total (%) | p | IC95% |
|----------------------------------|----------|--------------------|---------|---------------------|
| Proprietário possui cão | Sim | 6/18 (33,33) | 0,6645* | 0,5 (0,07 - 3,65) |
| | Não | 4/8 (50) | | |
| Presença de carrapatos na casa | Sim | 4/10 (40) | 1* | 1,11 (0,16 - 7,64) |
| | Não | 6/16 (37,5) | | |
| Presença de carrapato no cavalo | Sim | 8/24 (33,33) | 0,1384* | - |
| | Não | 2/2 (100) | | |
| Época do ano de maior infestação | Calor | 7/16 (6,25) | 0,6834* | 1,81 (0,26 - 13,69) |
| | Ano Todo | 3/10 (30) | | |
| Uso de Carrapaticida | Sim | 8/21 (38,1) | 1* | 1,23 (0,07 - 41,67) |
| | Não | 1/3 (33,33) | | |

* Teste exato de Fisher

ARTIGO 2 – Pesquisa de Infecção por Rickettsias do Grupo da Febre Maculosa em Humanos e por *Rickettsia* spp em carrapatos de um Parque Urbano em Londrina, PR.

RESUMO

A Febre Maculosa é uma zoonose reemergente, causada por rickettsias do Grupo da Febre Maculosa (GFM). A *Rickettsia rickettsii* é o principal agente etiológico da Febre Maculosa Brasileira (FMB) e é transmitida por carrapatos do gênero *Amblyomma*. Com o objetivo de obter informações sobre a presença de rickettsias do GFM no Parque Municipal Arthur Thomas em Londrina, PR, foi realizada coleta de carrapatos de vida livre e de capivaras, além de sangue de humanos que trabalham no parque. Um total de 775 *Amblyomma dubitatum* e 392 *Amblyomma cajennense* foram submetidos à extração de DNA e testadas pela técnica de PCR, em pools, para o gene *gltA*, presente em todas as espécies de rickettsias. Todos os pools foram considerados negativos. As amostras de soro de humanos foram submetidas à reação de imunofluorescência indireta (RIFI), na qual foram utilizados antígenos brutos de *R. rickettsii* e *R. parkeri*. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram titulação ≥ 64 . De 34 amostras de sangue analisadas, sete (20,6%) foram reagentes à *R. rickettsii* e nenhuma reagiu à *R. parkeri*. Foi aplicado questionário epidemiológico contendo variáveis demográficas, sociais e ambientais, mas não houve resultado estatisticamente significativo. De acordo com os resultados pode-se concluir que existe a presença de rickettsias do GFM circulando entre a população humana estudada, no entanto não foi possível relacionar a infecção aos carrapatos presentes no parque.

Palavras-chave: *Amblyomma dubitatum*. *Amblyomma cajennense*. Rickettsias. Epidemiologia. PCR.

ARTICLE 2 – Research of Infections Caused by Rickettsias of the Spotted Fever Group in Human beings and Ticks at an Urban Park in Londrina, PR

ABSTRACT

The Spotted Fever is a reemerging zoonosis caused by rickettsias of the Spotted Fever Group (SFG). The *Rickettsia rickettsii* is the main etiologic agent of the Brazilian Spotted Fever and is transmitted by ticks of the genus *Amblyomma*. With the objective to obtain information relative to the presence of rickettsias of the SFG within the Arthur Thomas Municipal Park in Londrina, PR, free-living ticks and ticks from capybaras were collected; additionally, serum samples obtained from park employees were evaluated. A total of 775 *A. dubitatum* and 392 *A. cajennense* species were submitted to DNA extraction and tested with Polymerase Chain Reaction (PCR), in pools, for the *gltA* gene, present in all species of rickettsiae. All the pools evaluated were negative. The serum samples from human beings were submitted to the Indirect Immunofluorescence Assay (IFA), where antigens of *R. rickettsii* and *R. parkeri* were used. Of the 34 serum samples analyzed, 20.6% (7/34) reacted to *R. rickettsii*, while all were negative to *R. parkeri*. An epidemiological questionnaire, concerning demographical, social and environmental variables, was applied to the human population, but no statistically significant results were obtained. It was found that the rickettsias of the SFG circulated within the human population evaluated, but it was not possible to correlate the presence of rickettsias with infection to the ticks from the park.

Keywords: *Amblyomma dubitatum*. *Amblyomma cajennense*. Rickettsias. Epidemiology. PCR.

INTRODUÇÃO

A Febre Maculosa é causada por bactérias do gênero *Rickettsia*, do Grupo da Febre Maculosa (GFM). A *Rickettsia rickettsii* é incriminada como o principal agente da Febre Maculosa Brasileira (FMB) e transmitida por carrapatos do gênero *Amblyomma* (DIAS, MARTINS, 1939). Esta doença tem sido descrita nas últimas décadas nos quatro estados da região Sudeste do Brasil, com destaque para São Paulo e Minas Gerais (SEXTON et al., 1993; LEMOS et al., 2001; ROZENTAL, et al., 2002; GALVÃO et al., 2003).

No Brasil, dois carrapatos são incriminados como transmissores da *R. rickettsii* aos homens e aos animais, *A. cajennense* e *A. aureolatum* (DIAS; MARTINS, 1939; PINTER; LABRUNA, 2006), sendo que o *A. cajennense* é o mais comum carrapato vetor associado com a doença (MOREIRA; MAGALHÃES, 1935). No entanto, dois trabalhos relatam carrapatos *A. dubitatum* infectados com rickettsias, inclusive do GFM (LEMOS et al., 1996; LABRUNA et al., 2004b; ESTRADA et al., 2006).

A importância das rickettsioses tem crescido muito não só pela identificação de novas espécies, mas também porque sua incidência e distribuição são maiores do que se imaginava (GALVÃO et al., 2005). No Brasil, somente a *R. rickettsii* foi isolada e caracterizada de humanos (MELLES et al., 1992; NASCIMENTO et al., 2005). Labruna et al., (2004b) detectaram uma rickettsia filogeneticamente próxima de *R. parkeri*, denominada *Rickettsia* sp cepa COOPERI em *A. dubitatum*. Silveira et al. (2007) isolou *R. parkeri* de *A. triste*. Recentemente foram relatados os primeiros casos humanos de infecção por *R. parkeri* nos Estados Unidos (PADDOCK et al., 2004; WHITMAN et al., 2007). Considerando que o *A. dubitatum* foi encontrado infectado por rickettsias, inclusive do GFM (LEMOS et al., 1996a; LABRUNA et al., 2004a; ESTRADA et al., 2006) e que alguns trabalhos relataram esta espécie de carrapato parasitando humanos (FAMADAS et al., 1997; LABRUNA et al., 2007), é possível que esta espécie seja importante na epidemiologia de rickettsioses.

Apesar de não haver comprovação de qualquer espécie animal como hospedeiro amplificador de *R. rickettsii* para carrapatos no Brasil, diversos trabalhos realizados desde a década de 1930 têm levado à suspeita de capivaras, gambás e

coelhos silvestres (LABRUNA, 2006). Em capivaras foi observado rickettsemia e infecção de *A. cajennense* alimentados nestes animais (TRAVASSOS; VALLEJO, 1942ab). As capivaras são hospedeiras de várias espécies de carrapatos, entre elas o *A. dubitatum*, específico deste cavídeo, e também o *A. cajennense* (TRAVASSOS; VALLEJO, 1942a).

Este estudo teve como objetivo a detecção de DNA de rickettsias em carrapatos do Parque Municipal Arthur Thomas em Londrina, e de anticorpos contra rickettsias do GFM em soro de humanos que trabalham no parque e são constantemente picados por carrapatos.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

Este estudo foi realizado no Parque Municipal Arthur Thomas de Londrina, PR, região considerada não endêmica para FMB.

A cidade de Londrina (23°19'S/51°10'W) está localizada na região norte central do estado do Paraná, sul do Brasil. Situa-se a 610 metros acima do nível do mar e possui clima subtropical, com chuvas o ano todo, mas com tendência a concentração de chuvas no verão. A temperatura média anual fica em torno de 20°C (Londrina, 2008).

O Parque Municipal Arthur Thomas está localizado no perímetro urbano de Londrina, a seis quilômetros do centro da cidade, e compreende uma área de 85,47 ha no médio curso do Ribeirão Cambé (Figura 1). Representa um dos últimos pontos remanescentes de mata atlântica no Norte do Paraná (PARQUE..., 2008). O parque possui uma fauna diversificada, com populações de macacos-prego, capivaras, gambás, quatis, cutias, além de aves e peixes. Diversas áreas gramadas e de matas do parque têm se mostrado infestadas por carrapatos, expondo funcionários e visitantes ao ataque constante destes ácaros.

Coleta de carrapatos do meio ambiente

No Parque Arthur Thomas foram realizadas coletas mensais de carrapatos no meio ambiente, durante 12 meses, englobando o período de agosto de 2006 a julho de 2007. Carrapatos de vida livre foram coletados sobre a vegetação do parque, próximo aos locais de estabelecimento das capivaras, às margens da represa Cambezinho.

Em todas as coletas de carrapatos do meio ambiente foram utilizados para captura de carrapatos os métodos de armadilha de dióxido de carbono (Figura 2) e arrasto de flanela (OLIVEIRA et al., 2000). Os carrapatos foram colocados em embalagens contendo etanol absoluto e levados para o Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), da Universidade Estadual de Londrina (UEL). No laboratório foram contados, separados por fase de vida, identificados segundo a chave taxonômica de

Aragão e Fonseca (1961) e Guimarães et al. (2001) e mantidos em etanol absoluto até a extração de DNA.

Coleta de carrapatos nos animais

Carrapatos das capivaras presentes no Parque Arthur Thomas foram coletados em 2005 por uma equipe de profissionais da UEL e da Secretaria Municipal do Meio Ambiente (SEMA) que faziam monitoria nas capivaras. Estes carrapatos foram conservados em etanol absoluto no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias, onde foram identificados, segundo a mesma chave citada acima, e aproveitados para este estudo.

Coleta de sangue

Em dezembro de 2007 foi realizada coleta de sangue de 34 humanos que trabalham no parque, por enfermeiros, através de venopunção na veia braquial. As amostras de sangue foram acondicionadas em tubos estéreis, identificadas e transportadas ao laboratório, onde foram submetidas à centrifugação para retração do coágulo e obtenção do soro. Em seguida as amostras de soro foram aliqüotadas em tubos de polipropileno, tipo *ependorf*, e estocados a - 20°C até a realização da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).

A pesquisa teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (número 125/07) da UEL. (Anexo 1).

Extração de DNA

A extração de DNA e a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) foram realizadas apenas em carrapatos adultos. Para os carrapatos coletados na vegetação, definiu-se como unidade amostral, o *pool* de cinco carrapatos, num total de 100 e 505 *pools* de *A. cajennense* e *A. dubitatum*, respectivamente. O cálculo do tamanho da amostra a ser retirada desta população foi realizado segundo Cannon e Roe (1982), estimando a prevalência ao redor de 2%, o que resultou em 78 e 147 *pools* de *A. cajennense* e *A. dubitatum*, sorteado sistematicamente. Todos os carrapatos coletados de capivaras foram submetidos à extração e à PCR, sendo oito *pools* de *A. dubitatum* e dois exemplares de *A. cajennense* analisados individualmente.

Cada carrapato foi previamente seco à temperatura ambiente. Com o auxílio de uma lâmina de bisturi estéril, foi realizado um corte ao meio do carrapato no sentido longitudinal. Uma metade do carrapato foi triturada com a ajuda de um micropistilo e a extração realizada de acordo com o protocolo de Chomkzynski (1993) com modificações de Sangioni (2003) (Anexo 3). A outra metade foi mantida em freezer - 20°C. A extração foi realizada para cada carrapato e, após esta, 5 µL de cada material extraído foi juntado novamente no *pool* para realização da PCR.

PCR

Foram utilizados como oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), *RpCS.877p* (GGGGGCCTGCTCACGGCGG) e *RpCS.1258n* (ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA), que amplifica uma região de 381 pares de base do gene *gltA*, que codifica a enzima citrato sintase de *Rickettsia* spp (REGNERY et al., 1991).

Para as reações de PCR utilizou-se 2,5 µL de tampão buffer (10X), 0,2 µL de nucleotídeos trifosfatados (dNTP 1,25 mM), 1,25 µL de MgCl₂ (50 mM), 3 µL de cada *primer* (10 pmol), 0,3 µL de Taq DNA polimerase (5000 U/mL), 5 µL de amostra, H₂O ultra pura (q.s.p. 25 µL). Como controle positivo das reações, utilizou-se DNA genômico de *Rickettsia* sp (NOD) encontrada em *A. nodosum*, cedida pelo 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). Como controle negativo, utilizou-se água estéril.

As etapas e condições de amplificação foram: desnaturação inicial (95°C/5 min), número de ciclos (35), desnaturação (95°C/20 seg), anelamento (48°C/30 seg), extensão (60°C/2 min), extensão final (60°C/10 min) (HORTA et al., 2002).

Os produtos amplificados foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídeo (0,5 mg/mL), em cuba horizontal, com tampão de corrida TBE 1X, sob voltagem de 100 volts e 50mA por aproximadamente uma hora. A visualização das bandas foi realizada através de um transluminador ultravioleta. Estas foram comparadas com padrão de peso molecular que possuía fragmentos múltiplos de 123 pb.

RIFI

Todas as amostras de soro de humanos foram submetidas à RIFI. Esta foi realizada no Laboratório de Doenças Parasitárias (VPS-USP). Foram utilizadas lâminas contendo antígenos brutos de *R. rickettsii* e *R. parkeri* e considerados positivos os soros com título ≥ 64 . A leitura das lâminas foi realizada em microscópio epifluorescente. O protocolo da reação foi utilizado de acordo com Horta et al. (2004) (Anexo 4).

Análise estatística

Foi aplicado questionário epidemiológico para cada humano que se submeteu à coleta de sangue (Apêndice 3). Para avaliação das variáveis foi utilizado o teste Qui-quadrado, ou Exato de Fisher, e cálculo de Odds Ratio com intervalo de confiança de 95%. Adotou-se o nível de significância de 5%. Os cálculos foram executados no programa Epi6 (CDC/Atlanta).

RESULTADOS

Coleta de carrapatos

No período de um ano foram coletados no ambiente, 3.029 carrapatos adultos, 14.186 ninfas e 25.356 larvas. Entre os adultos, foram identificados 2.526 (81,9%) *A. dubitatum* e 503 (18,1%) *A. cajennense*. Entre os carrapatos coletados das capivaras, que foram utilizados neste estudo, foram identificados 40 *A. dubitatum* e dois *A. cajennense*.

PCR dos carrapatos

No total foram analisados 233 pools, sendo 78 pools (390 carrapatos) de *A. cajennense* e 147 pools (735 carrapatos) de *A. dubitatum*, coletados no ambiente. Entre os carrapatos coletados de capivaras, foram analisados oito pools (40 carrapatos) de *A. dubitatum* e dois exemplares de *A. cajennense*, individualmente.

Todos os pools analisados foram considerados negativos, inclusive os carrapatos analisados individualmente, uma vez que não houve visualização de bandas compatíveis com a banda produzida pelo controle positivo. Os controles negativos também não produziram nenhuma banda. A Figura 3 ilustra os resultados da PCR de algumas amostras. De acordo com a amostra utilizada, a taxa de infecção nesta população de carrapatos deve estar abaixo de 2%, pois, para que a prevalência fosse igual a 2%, seria necessário que ao menos um pool fosse positivo. Como foram utilizados primers específicos para o gênero *Rickettsia*, a taxa de infecção considerada se refere a qualquer espécie de rickettsia.

RIFI

No total foi coletado sangue de 34 humanos. Todas as amostras de soro foram submetidas à RIFI, utilizando como antígenos a *R. rickettsii* e a *R. parkeri*. Quando o antígeno utilizado foi a *R. rickettsii*, das 34 amostras de soro analisadas, sete (20,6%) foram consideradas positivas, já que apresentaram títulos ≥ 64 , sendo que quatro apresentaram títulos iguais a 64, duas iguais a 128 e uma igual a 256. Quando o antígeno utilizado foi a *R. parkeri*, nenhum soro reagiu na titulação igual a 64 e, portanto, foram todos considerados negativos.

A Tabela 1 mostra os resultados do teste de Qui-Quadrado quanto à presença de anticorpos anti-*R. rickettsii* e as variáveis avaliadas.

Entre os 34 humanos que se submeteram à coleta de sangue, 26 (76,5%) afirmaram já terem sido picados por carrapato e, destes, nove (34,6%) afirmaram que adquiriram o carrapato somente dentro do parque, enquanto 12 (46,2%) afirmaram terem sido picados por carrapato de dentro do parque e também de outros locais; 18 (52,9%) já habitaram a zona rural, 21 (61,8%) trabalharam ou trabalham com animais ou na zona rural; 15 (44,1%) trabalham no parque em contato direto com os locais de infestação por carrapatos, como jardinagem, segurança e polícia ambiental.

De acordo com os cálculos realizados, não houve diferença estatisticamente significativa quanto à presença de anticorpos anti- *R. rickettsii* e as variáveis avaliadas.

DISCUSSÃO

No presente trabalho, foram realizadas coletas de carrapatos em capivaras e sobre a vegetação do Parque Arthur Thomas em Londrina. Além disso, também foi realizada coleta de sangue de humanos que trabalham no parque e estão sujeitos a constantes picadas por carrapatos.

Entre as duas espécies de carrapatos coletados sobre a vegetação, o *A. dubitatum* representou 81,9% dos carrapatos adultos, muito mais prevalentes que o *A. cajennense*, o qual representou 18,1%. Para o *A. dubitatum*, a capivara é o hospedeiro primário (TRAVASSOS; VALEJO, 1942a, EVANS et al., 2000, ESTRADA-PEÑA et al., 2001; LABRUNA et al., 2004a). No entanto, estágios de larva e ninfa são menos específicos, podendo parasitar outras espécies, inclusive os humanos (FAMADAS et al., 1997; LABRUNA et al., 2007). Para o *A. cajennense* os hospedeiros primários são eqüinos, antas e capivaras (CAMARGO-NEVES et al., 2004). É a principal espécie que parasita humanos no centro sul do Brasil, além de ser o principal vetor da FMB (ARAGÃO; FONSECA, 1961; LEMOS et al., 1997).

Por serem hospedeiros primários do *A. dubitatum* e do *A. cajennense*, as capivaras elevam as densidades destas espécies em locais onde se encontram estabelecidas (ESTRADA et al., 2006). Existe relato de capivaras com sorologia positiva para rickettsias do GFM (SOUZA et al., 2004) além do relato destes animais apresentando rickettsemia. Travassos e Vallejo (1942a) observaram a circulação da *R. rickettsii* nestes animais por tempo superior a 11 dias. Em outro trabalho dos mesmos autores, foi possível infectar *A. cajennense* alimentados em capivaras experimentalmente infectadas e, posteriormente, transmitir a infecção por picada a outros animais (TRAVASSOS; VALLEJO 1942b). Estes fatos sugerem um possível papel das capivaras no ciclo da FMB e de outras rickettsias.

O presente trabalho mostrou que a taxa de infecção por rickettsias na população de carrapatos do parque encontra-se abaixo de 2%, concordando com outros trabalhos realizados em áreas não endêmicas. Magnarelli et al. (1981) demonstraram taxa de infectividade de 1,07% em carrapatos *D. variabilis*, de regiões em que nunca foi relatada a febre maculosa. No entanto, estes mesmos autores observaram que o número de carrapatos infectados não variou entre os que foram coletados de áreas não endêmicas e os de regiões onde ocorreram casos de febre

maculosa. Isto ressalta a importância de se conhecer a atividade rickettsial também nos hospedeiros vertebrados. Sangioni et al. (2005) realizaram pesquisa de infecção por rickettsias em *A. cajennense* coletados de áreas endêmicas e não endêmicas no estado de São Paulo e não obtiveram resultados positivos na PCR. Estes autores concluíram que a prevalência de carrapatos infectados por rickettsias variou de 0,8% a 1,43%, pois para que a prevalência fosse superior a este valor, a infecção em ao menos um carrapato deveria ter sido detectada na PCR.

Alguns estudos relataram a presença de rickettsias do GFM em *A. dubitatum* no município de Pedreira, SP (LEMONS et al., 1996; LABRUNA et al., 2004b) e, portanto, pode ser uma espécie importante na epidemiologia da FMB. Alguns trabalhos também relatam a presença de *R. bellii* nestas espécies de carrapatos. Labruna et al. (2004b) encontrou 40% dos carrapatos infectados por *R. bellii*, valores muito próximos dos encontrados por Pacheco (2007) neste mesmo local. Este último autor concluiu que se alguma espécie de rickettsia do GFM estivesse circulando na população estudada, a proporção de carrapatos infectados estaria abaixo de 0,3556% e também que a alta proporção de carrapatos infectados por *R. bellii* poderia estar impedindo o estabelecimento de outras espécies de rickettsias, já que carrapatos infectados por uma espécie de rickettsia não patogênica se tornam incapazes de manter, via transmissão transovariana, a infecção por outra espécie de rickettsia (BURGDORFER, 1988; MACALUSO et al., 2002).

Neste estudo a prevalência de soros positivos encontrada em humanos foi de 20,6%, quando as amostras de soro foram testadas com *R. rickettsii*, não ocorrendo reação positiva quando testadas com *R. parkeri*. Outros estudos realizados em áreas endêmicas e não endêmicas encontraram soroprevalência mais baixa que a do presente estudo, através de RIFI com *R. rickettsii*. Del Guercio et al. (1997), encontrou 5,3% das amostras positivas em Pedreira, SP, área endêmica para FMB, Sangioni et al. (2005) não obteve reação positiva dos soros obtidos de humanos de áreas endêmicas e não endêmicas; Pinter et al. (2008) encontrou reação positiva em apenas 2,8% do total de amostras analisadas.

Horta et al. (2007) realizou pesquisa sorológica em humanos de cinco áreas do estado de São Paulo, sendo quatro áreas endêmicas (Pedreira, Mogi das Cruzes, Piracicaba e São Paulo) e uma não endêmica (Pirassununga), e encontrou soroprevalência para *R. rickettsii* variando de 10,1% a 19,0%. A prevalência

encontrada por estes autores na área não endêmica foi de 17,8%, resultado muito próximo do encontrado no presente estudo. A diferença é que no estudo de São Paulo, as amostras de soro também reagiram quando testadas com outros antígenos, como *R. parkeri* e *R. felis*. No presente estudo, não houve reação positiva das amostras de soro quando testadas com *R. parkeri*. No entanto, isto não permite afirmar que a *R. rickettsii* seja responsável pela resposta imune gerada nestes humanos, mas apenas que foi gerada por uma rickettsia do GFM.

Através da análise do questionário epidemiológico, foi possível observar que a maioria dos humanos, tanto os que apresentaram resultados positivos na RIFI, quanto os que apresentaram resultados negativos, relataram picadas por carrapatos de dentro do parque e também de outros lugares. Também foi possível observar que muitos trabalham ou trabalharam com animais ou na zona rural. Desta forma fica difícil relacionar a presença de infecção nestes humanos aos carrapatos do parque, uma vez que não foram identificados carrapatos positivos na PCR. Isto não significa que não exista alguma atividade rickettsial no local. Estudos com hospedeiros vertebrados habitantes do parque, tais como capivaras e gambás, e com uma população maior de carrapatos, além do teste sorológico com outros antígenos, ajudariam a entender melhor a atividade rickettsial dentro do parque.

REFERÊNCIAS

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

BURGDORFER, W. Mountain spotted fever and scrub typhus. In: WALKER, D.H. **Biology of Rickettsial Diseases**. v. 1. Local: Boca Raton, 1988. p.33-50.

CAMARGO-NEVES, V. L. F., VIEIRA, M. L. V., SOUZA, C. E., LABRUNA, M. B., MAYO, R. C., SOUZA, S. S. L. **Manual de vigilância acarológica**. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 2004, v.1, 62p.

CHOMKZYNSK, P. A reagent for the single step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **Biotechniques**, v.15, n.3, p.532-537, 1993.

CANNON, R. M., ROE, R. T. Livestock disease surveys: a field manual for veterinarians. Australian Government Publishing Service, 1982. In: THURSFIELD, M. **Veterinarian Epidemiology**. 2 ed. Edimburgo: Blackwell Science, 1995. p. 189.

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, SP, Brasil. Inquérito sorológico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.30, n.1, p.47-52, 1997.

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

ESTRADA-PEÑA, A., VENZAL, J. M., GUGLIELMONE, A. A. *Amblyomma dubitatum* Neumann: description of nymph and redescription of adults, together with the description of the immature stages of *A. triste* Koch. **Acarologia**, v.4, p.323-333, 2001.

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

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

FAMADAS, K., LEMOS, E. R. S. COURA, J. R., SERRA-FREIRE, N. M. *Amblyomma cooperi* (Acari: Ixodidae) parasitando humano em área de foco de febre maculosa, São Paulo – Brasil. **Acta Parasitológica Portuguesa**, v. 45, p.154, 1997.

GALVÃO, M. A. M., CALIC, S. B., CHAMONE, C. B., MAFRA, C. L., CESARINO FILHO, G., OLANO, J. P., WALKER, D. H. Spotted fever rickettsiosis in Coronel Fabriciano, Minas Gerais State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.36, n.4, p.479-481, 2003.

GALVÃO, M.A.M., SILVA, L.J., NASCIMENTO, E. M. M., CALIC, S. B., SOUZA, R., BACELLAR, F. Rickettsioses no Brasil e Portugal: ocorrência, distribuição e diagnóstico. **Revista de Saúde Pública**. Rio de Janeiro, v.39, n.5, p.850-856, 2005.

GUIMARÃES, J. H., TUCCI, H. E. C., BARROS-BATTESTI, D. M. **Ectoparasitos de importância veterinária**. São Paulo: Editora Plêiade, 2001, 213 p.

HORTA, M. C. **Pesquisa de infecção por rickettsias do grupo da febre maculosa em humanos, eqüídeos, caninos e em diferentes estádios de vida de *Amblyomma cajennense*, provenientes de uma área endêmica do estado de São Paulo**. 2002. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, São Paulo.

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

LABRUNA, M. B. Cultivo celular de riquetsias no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 14., SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 2. 2006, Ribeirão Preto, **Anais...**, p.132-133.

LABRUNA, M. B., PINTER, A., TEIXEIRA, R. H. F. Life cycle of *Amblyomma cooperi* (Acari: Ixodidae) using capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) as hosts. **Experimental and Applied Acarology**, v.32, p.79-88, 2004a.

LABRUNA, M. B., WHITWORTH, T., HORTA, M. C., BOUYER, D. H., MCBRIDE, J. W., PINTER, A., POPOV, V., GENNARI, S. M., WALKER, D. H. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. **Journal Clinical of Microbiology**. Local, v.42, p.90-98, 2004b.

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

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

LEMOS, E. R. S., MACHADO, R. D., PIRES, F. D. A., MACHADO, S. L., COSTA, L. M. C., COURA, J. R. Rickettsia-infected ticks in na endemic area of spotted fever in the state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v.92, n.4, p.477-481, 1997.

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

LONDRINA. Disponível em <<http://www.wikipedia.org/wiki/londrina>> Acesso em 12 jan. 2008.

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 Medical of Entomology**, v.39, n.6, p.809-813, 2002.

MAGNARELLI, L. A., ANDERSON, J. F., PHILIP, R. N., BURGDORFER, W., CASPER, E. A. Endemicity of spotted fever group rickettsiae in Connecticut. **American Journal of Medicine Tropical and Hygiene**, v.30, n.3, p.715-721, 1981.

MELLES, H. H. B., COLOMBO, S., SILVA, M. V. Febre maculosa: isolamento de Rickettsia em amostra de biópsia de pele. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. São Paulo, v.34, n.1, p.37-41, 1992.

MOREIRA, J. A., MAGALHÃES, O. Typho exanthemático de Minas Geraes. **Brasil Médico**. Rio de Janeiro, v.44, n.21, p.465-470, 1935.

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

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

PACHECO, R. C., **Pesquisa de Rickettsia spp em carrapatos Amblyomma dubitatum Neumann 1899 e Amblyomma triste Kosh 1844, provenientes do Brasil e Uruguai, respectivamente**. 2007. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo

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.

PARQUE Arthur Thomas: Histórico. Londrina. Disponível em <http://www.parquearthurthomas.com.br/historico>. Acesso em: 12 jan. 2008.

PINTER, A., LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aireolatum* in Brazil. **Annals of New York Academy of 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. **Cadernos de Saúde Pública**, v.24, n.2, p.247-252, 2008.

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.1576-1589, 1991.

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

SANGIONI, L. A., **Pesquisa de Infecção por rickettsias do grupo da febre maculosa, em humanos, cães, eqüídeos e em adultos de *Amblyomma cajennense*, em região endêmica e não endêmica do estado de São Paulo.** 2003. (Tese: Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, São Paulo.

SANGIONI, L. A., HORTA, M. C., VIANNA, S. M. G., 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, n.2, p.265-269, 2005.

SEXTON, D. J., MUNIZ, M., COREY, G. R., BREITSCHWERDT, E. B., HEGARTY, B. C., DUMLER, S. WALKER, D. H., PECANHA, 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 Medicine and Hygiene**, v.49, n.2, p.222-226, 1993.

SILVEIRA, I., PACHECO, R. C., SZABÓ, M. P. J., RAMOS, H. G. C., LABRUNA, M. B. First report of *Rickettsia parkeri* in Brazil. **Emerging Infectious Disease**, v.13, p.1111-1113, 2007.

SOUZA, C. E., CALIC, S. B., CAMARGO, M. C. G. O. O papel da capivara *Hydrochaeris hydrochaeris* na cadeia epidemiológica da febre maculosa brasileira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 13.; SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 1., 2004, Ouro Preto. **Anais...**, p.203-205.

TRAVASSOS, J., VALLEJO, A. Comportamento de alguns cavídeos (*Cavia aperea* e *Hydrochoerus capybara*) às inoculações experimentais do vírus da febre maculosa. Possibilidade destes cavídeos representarem o papel de depositários transitórios do vírus na natureza. **Memórias do Instituto Butantan**. São Paulo, v.15, p.73-86, 1942a.

TRAVASSOS, J., VALLEJO, A. Possibilidade de *Amblyomma cajennense* se infectar em *Hydrochoerus capybara* experimentalmente inoculado com o vírus da febre maculosa. **Memórias do Instituto Butantan**, São Paulo, v.16, p.87-90, 1942b.

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.

FIGURAS E TABELAS DO ARTIGO 2



Figura 1 – Foto aérea Parque Municipal Arthur Thomas, Londrina, PR; 1. Ribeirão Cambe; 2. Represa Cambezinho; 3. Sede da Secretaria Municipal do Meio Ambiente (SEMA)

Fonte: <http://www.parquearthurthomas.com.br/fotos>



Figura 2 – Armadilha de gelo seco (CO₂), montada para captura de carrapatos adultos e ninfas.

381 pb →

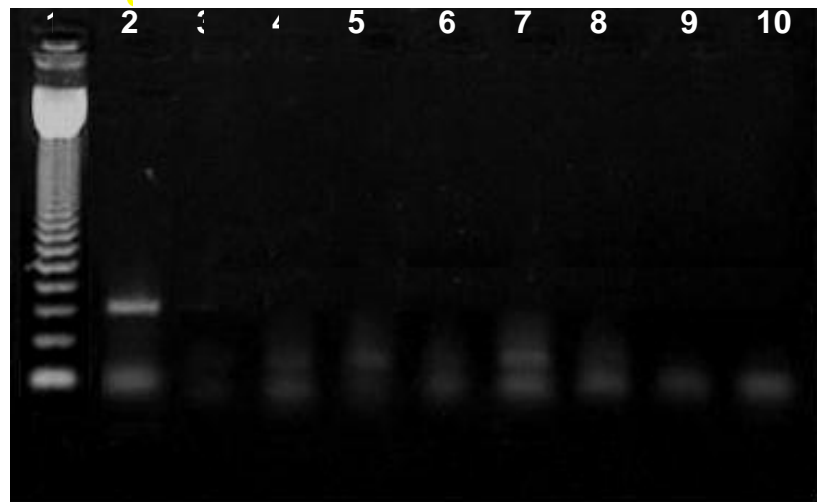


Figura 3 – Fotografia de um gel de agarose 1,5% de produtos de PCR realizados a partir de material extraído de *A. dubitatum*. Coluna 1. Marcador de peso molecular (123pb); Coluna 2. Controle Positivo; Colunas 3, 4, 5, 6, 7 e 8. Amostras negativas; Colunas 9 e 10. Controle Negativo.

Tabela 1 – Resultado do teste de Qui-Quadrado quanto à presença de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii* e variáveis relativas a 34 funcionários do Parque Municipal Arthur Thomas, Londrina, 2007.

| Variáveis | Opções | Positivos/Total (%) | Valor de p | OR (IC95%) |
|----------------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------|------------|---------------------|
| Idade | 20 a 40 anos | 1/12 | 0,4234 | - |
| | 41 a 60 anos | 5/18 | | |
| | > 60 anos | 1/4 | | |
| Naturalidade | Londrina | 2/10 | 0,7650 | - |
| | São Paulo (Estado) | 1/6 | | |
| | Minas Gerais | 1/2 | | |
| | Outros locais fora da Região Sudeste | 3/16 | | |
| Locais Habitados Anteriormente | Londrina | 6/22 | 0,5293 | - |
| | São Paulo (Estado) | 0/5 | | |
| | Rio de Janeiro | 0/1 | | |
| | Outros locais fora da Região Sudeste | 1/6 | | |
| Histórico de picada por carrapato | Sim | 6/26 | 1* | 2,10 (0,18 - 55,69) |
| | Não | 1/8 | | |
| Local onde adquiriu o carrapato | Parque Arthur Thomas | 2/9 | 0,9726 | - |
| | Em outros locais | 1/5 | | |
| | Em ambos | 3/12 | | |
| Tempo de permanência do carrapato | Até cinco horas | 0/3 | 1* | - |
| | Acima de cinco horas | 6/23 | | |
| Já habitou Zona Rural | Sim | 5/18 | 0,4054* | 2,69 (0,35 - 25,01) |
| | Não | 2/16 | | |
| Trabalhou ou Trabalha com animais ou na Zona Rural | Sim | 4/13 | 0,3868* | 2,67 (0,37 - 20,33) |
| | Não | 3/21 | | |
| Tipo de Trabalho | Direto no Parque | 3/15 | 0,0982 | - |
| | Administração | 0/9 | | |
| | Outros | 4/10 | | |
| Tempo de Serviço no Parque | 0 - 5 anos | 2/11 | 0,9870 | - |
| | 6 - 10 anos | 2/8 | | |
| | 11 - 15 anos | 2/10 | | |
| | 16 - 20 anos | 1/5 | | |

* Exato de Fisher

CONCLUSÃO

Com base nos resultados deste trabalho realizado na cidade de Londrina, Paraná, podemos concluir que:

- a) As espécies *Amblyomma cajennense* e *Anocentor nitens* são os carrapatos predominantes parasitando eqüinos na região urbana estudada;
- b) O *Rhipicephalus sanguineus* é a espécie de carrapato predominante parasitando cães na região urbana estudada;
- c) As espécies *Amblyomma dubitatum* e *Amblyomma cajennense* são predominantes no meio ambiente do Parque Municipal Arthur Thomas;
- d) A técnica da PCR não detectou a presença DNA de rickettsias nos carrapatos estudados, tanto naqueles coletados de cães e eqüinos, quanto nos coletados no Parque Arthur Thomas, provavelmente devido à baixa taxa de infecção;
- e) Existem evidências sorológicas de infecção por rickettsias do GFM em humanos, cães e eqüinos na região urbana estudada e em humanos que trabalham no Parque Arthur Thomas.

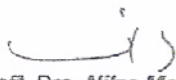
ANEXOS

ANEXO 1


COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná.....

Registro CONEP 268

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| Parecer Nº 125/07 CAAE Nº 0065.0.268.000-07 | Londrina, 06 de julho de 2007. |
| PESQUISADOR: ODILON VIDOTTO | |
| Ilmo Sr. O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná" de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, <u>APROVA</u> a execução do projeto: "ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE FEBRE MACULOSA, NO MUNICÍPIO DE LONDRINA, ESTADO DO PARANÁ". Informamos que a Sra deverá comunicar, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá ser apresentado ao CEP/UEL relatório final da pesquisa. | |
| Situação do Projeto: APROVADO | |
| Atenciosamente,  Prof.ª. Dra. Nilza Maria Diniz Coordenadora Comitê de Ética em Pesquisa-CEP/UEL | |

ANEXO 2



COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

OF. CIRC. CEEA Nº 69/2006


Londrina, 26 de setembro de 2006.

Prezado Pesquisador

O CEEA/UEL, reunido aos 08 de agosto do ano corrente, avaliou o projeto de pesquisa intitulado "**Aspectos epidemiológicos da Febre Maculosa no município de Londrina, PR**", registrado no CEEA sob o nº 29/06, projeto de Dissertação junto ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, desenvolvido sob sua responsabilidade e orientação. Esclarecido o aspecto metodológico solicitado, o projeto está *aprovado* para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal estão respeitados.

Sem mais para o momento, subscrevo-me.

Cordialmente,



Prof. Dr. Júlio Augusto Naylor Lisboa
Coordenador do CEEA/UEL

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Odilon Vidotto
Coordenador do Projeto
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
Centro de Ciências Agrárias

ANEXO 3

Protocolo de Extração de DNA segundo Chomkzynski (1993) com modificações de Sangioni (2002)

- Triturar o carrapato;
- Adicionar à amostra, 150 µl de TE (Tris HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 7,4);
- Homogeneizar em agitador;
- Adicionar 450 µl de GT (5mol/L);
- Deixar 10 minutos para agir, homogeneizar a cada 2 minutos;
- Centrifugar a 12000 x g, durante 5 minutos para separar a fase aquosa da orgânica;
- Transferir 400 µl da fase aquosa para outro microtubo e desprezar a fase orgânica;
- Adicionar 600 µl de isopropanol (para insolubilizar);
- Homogeneizar;
- Levar ao freezer e deixar por 2 a 18 horas;
- Centrifugar a 12000 x g durante 15 minutos;
- Desprezar o sobrenadante;
- Acrescentar 800 µl de etanol 70%;
- Centrifugar a 12000 x g durante 5 min;
- Desprezar o sobrenadante;
- Secar o sedimento à temperatura ambiente;
- Ressuspender o sedimento com 30 µl de TE;
- Homogeneizar;
- Levar ao banho-maria, à 56°C, durante 15 minutos;
- Congelar.

ANEXO 4

Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para rickettsias, segundo Horta et al. (2004)

- Diluir as amostras de soro em PBS (solução fosfato tamponada) nas diluições de 1:64, 1:128, 1:256, 1:512 e 1:1024;
- Adicionar 10-20 µl das diluições em cada poço das lâminas;
- Incubar as lâminas em câmara úmida por 30 minutos em estufa à 37°C;
- Lavar as lâminas duas vezes com tampão de lavagem, em cuba de lavagem, 10 minutos cada lavagem;
- Deixar as lâminas secarem à temperatura ambiente;
- Diluir o conjugado, na proporção obtida com a prévia titulação do mesmo, em PBS;
- Adicionar 15 µl da diluição do conjugado em todos os poços das lâminas;
- Incubar as lâminas em câmara úmida por 30 minutos em estufa à 37°C, ao abrigo de qualquer fonte de luz;
- Lavar as lâminas duas vezes com tampão de lavagem acrescido de azul de Evans (0,3 ml de Azul de Evans para cada 100 ml de tampão de lavagem), em cuba de lavagem, 10 minutos cada lavagem. Manter as cubas cobertas com papel alumínio para proteger de qualquer fonte de luz;
- Adicionar de três a quatro gotas de glicerina tamponada sobre cada lâmina, cobrindo-a com lamínula. Manter sobre o abrigo da luz até o momento da leitura;
- Realizar leitura das lâminas em microscópio de imunofluorescência em objetiva de 40X.

APÊNDICES

APÊNDICE 1**Questionário Epidemiológico – Humanos – Jd. Califórnia****1. Dados Pessoais**

Nome: _____ Idade: _____

Endereço: _____ Telefone: _____

Data: ___/___/___

2. Cidade de Origem:

- (1) Londrina
- (2) São Paulo (estado)
- (3) Minas Gerais
- (4) Espírito Santo
- (5) Outros

3. Local onde morou:

- (1) Londrina
- (2) São Paulo (estado)
- (3) Minas Gerais
- (4) Espírito Santo
- (5) Outros

4. Já foi picado por carrapato:

- (1) sim
- (2) não

5. Tempo de permanência do carrapato fixado à pele:

- (1) até cinco horas
- (2) acima de cinco horas

6. Já habitou a Zona Rural:

- (1) Sim
- (2) Não

7. Trabalhou ou trabalha com animais ou no meio rural:

- (1) Sim
- (2) Não

8. Possui animal:

- (1) cão
- (2) eqüino
- (3) cão e eqüino
- (4) não

APÊNDICE 2

Questionário Epidemiológico – Animais – Jd. Califórnia

1. Dados Pessoais:

Proprietário: _____ Data: ___/___/___

Endereço: _____ Telefone: _____

2. Ambiente

2.1 Qual(is) animal (is) possui:

(1) cão (2) eqüino (3) cão e eqüino (4) outros

2.2 Presença de outros animais próximos à casa:

(1) não (2) roedores (3) animais silvestres (4) outros

2.3 Presença de carrapatos na casa:

(1) sim (2) não

3. Cães:

3.1 Número de cães:

(1) um (2) dois (3) três (4) acima de três

3.2 Têm acesso à rua:

(1) Sim (2) Não

3.3 Presença de carrapatos nos cães:

(1) Sim (2) Não

3.4 Época do ano que os carrapatos aparecem:

(1) calor (2) frio (3) ano todo

3.5 Uso de carrapaticida:

(1) Sim (2) Não

3.6 Qual:

3.7 Frequência:

4. Eqüinos:

4.1 Número de eqüinos:

(1) um (2) dois (3) três (4) acima de três

4.2 Local de permanência do animal:

(1) praça (2) terreno (3) casa (4) outros

4.2 Presença de carrapatos no eqüino:

(1) Sim (2) Não

4.3 Época do ano que aparece:

(1) calor (2) frio (3) ano todo

4.4 Uso de carrapaticida:

(1) Sim (2) Não

4.5 Qual:

4.6 Frequência:

APÊNDICE 3**Questionário Epidemiológico – Humanos- Parque Municipal Arthur Thomas****1. Dados Pessoais**

Nome: _____ Idade: _____

Endereço: _____ Telefone: _____

Data: ___/___/___

2. Cidade de Origem:

- (1) Londrina (2) São Paulo (estado) (3) Minas Gerais (4) Espírito Santo
(5) Outros

3. Local onde morou:

- (1) Londrina (2) São Paulo (estado) (3) Minas Gerais (4) Espírito Santo
(5) Outros

4. Já foi picado por carrapato:

- (1) sim (2) não

5. Onde:

- (1) no Parque (2) em outro local (3) nos dois

6. Tempo de permanência do carrapato fixado à pele:

- (1) até cinco horas (2) acima de cinco horas

7. Já habitou a Zona Rural:

- (1) Sim (2) Não

8. Trabalhou ou trabalha com animais ou no meio rural:

- (1) Sim (2) Não

9. Possui animal:

- (1) cão (2) equino (3) cão e equino (4) não

10. Tipo de trabalho:

- (1) direto no parque (2) setor administrativo (3) fora do parque

11. Tempo de serviço no parque:

- (1) 0 – 5 anos (2) 6 – 10