



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KATIA TAMEKUNI

**PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA RICKETTSIAS
DO GRUPO DA FEBRE MACULOSA EM HUMANOS, CÃES
E EQUINOS E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE
RICKETTSIA SPP EM CARRAPATOS NA REGIÃO NORTE
DO PARANÁ**

Londrina
2009

KATIA TAMEKUNI

**PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA RICKETTSIAS
DO GRUPO DA FEBRE MACULOSA EM HUMANOS, CÃES
E EQUINOS E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE
RICKETTSIA SPP EM CARRAPATOS NA REGIÃO NORTE
DO PARANÁ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Ciência Animal, área de concentração em Sanidade Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção de título de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Odilon Vidotto

Londrina
2009

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

T157p Tamekuni, Katia.

Prevalência de anticorpos contra rickettsias do grupo da febre maculosa em humanos, cães e equinos e identificação molecular de *Rickettsia spp* em carrapatos na região norte do Paraná / Katia Tamekuni. – Londrina, 2009. 65 f. : il.

Orientador: Odilon Vidotto.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2009.

Inclui bibliografia.

1. Rickettsia – Epidemiologia – Teses. 2. Carrapato como transmissor de doenças – Teses. 3. Febre maculosa brasileira – Teses. 4. Amblyomma – Teses. I. Vidotto, Odilon. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619:616.995.42

KATIA TAMEKUNI

**PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA RICKETTSIAS
DO GRUPO DA FEBRE MACULOSA EM HUMANOS, CÃES
E EQUINOS E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE
RICKETTSIA SPP EM CARRAPATOS NA REGIÃO NORTE
DO PARANÁ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Ciência Animal, área de concentração em Sanidade Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção de título de Doutor em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Odilon Vidotto

Profa. Dra. Terezinha Tizu Sato Schumaker

Dr. Adriano Pinter dos Santos

Prof. Dr. João Luis Garcia

Profa. Dra. Roberta Lemos Freire

Londrina, 20 de fevereiro de 2009.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Lili e Yasuo por todo amor, dedicação e apoio que me ofereceram durante toda minha Vida.
Aos meus irmãos Eliana, Cintia e Claudio pelo carinho, compreensão e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela presença em todos os momentos de minha vida e por permitir a realização de mais uma etapa de minha vida.

Ao prof. Odilon pela orientação, muita paciência, amizade e a convivência durante todos estes anos, que foram essenciais para realização de mais um trabalho.

Ao Prof. Marcelo Bahia Labruna por abrir as portas do Laboratório de Doenças Parasitárias (VPS/USP) e por todos os momentos de discussão, imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Ao amigo Richard por todo tempo de dedicação e esforço que disponibilizou durante todos os momentos que precisei e principalmente pela grande amizade que estará presente em minha vida.

Aos Professores Amauri, Italmar, João pelas sugestões e correções na realização do exame de qualificação e por toda ajuda durante todo o período que estive na UEL.

A Prof. João e Roberta por participarem e mais uma vez colaboram na correção da tese.

Ao Adriano Pinter e Teresinha Schumaker por disponibilizar tempo e atenção para participação em minha defesa de tese e por toda colaboração neste trabalho.

Ao José Henrique Cavichioli que disponibilizou e ajudou muito durante as colheitas nos haras.

A Helenice Kieski, secretária da pós-graduação, por toda a ajuda e paciência que foram muito importantes para a conclusão do trabalho.

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal pela contribuição durante todo período deste experimento.

As enfermeiras Martha e Kellen pela coleta de sangue durante a realização do trabalho.

Aos Moradores dos dois assentamentos por permitir a realização deste trabalho.

A Dalva e Ademir que sempre estiveram dispostos a ajudar durante toda a etapa de graduação e pós-graduação e principalmente pela amizade.

A Bete pela ajuda e tempo disponível que foram muito importantes durante o mestrado e doutorado.

A Robertinha uma grande amiga que foi muito importante durante o doutorado, pela companhia, pela ajuda e principalmente pela amizade e muitas risadas e sei que sempre será minha amiga.

Ao Mauro pela ajuda e companhia em todas as colheitas e pela amizade.

As minhas grandes amigas Flora, Michelle e Paula que sempre estarão em meu coração e sempre serão minhas amigas e irmãs eternas independente da distância que estarão.

Aos Amigos da USP Maurício, Jonas, Thiago, Maria e Iara pela ajuda e dicas durante o período que estive em São Paulo e pela companhia e muitas alegrias e muitos momentos de descontração.

Aos Amigos da pós Graduação Jú Dias, Betinha, Vanessa, Lú Takemura, Marlise, Valeska, Kenio, Felipe, Bruno, Xandão, Ivo, Dauton, Fernando, Marcela e Adriana pelos momentos de alegrias e muitas risadas foram muito importantes durante a realização do doutorado.

"O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis".
(Fernando Pessoa)

TAMEKUNI, Katia. **Prevalência de anticorpos contra rickettsias do grupo da Febre Maculosa em humanos, cães e equinos e identificação molecular de *Rickettsia* spp em carrapatos na região Norte do Paraná, Brasil.** 2008. 74f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

RESUMO

A febre maculosa Brasileira é uma doença transmitida por carrapatos do gênero *Amblyomma* que acometem seres humanos e animais. O principal agente responsável pela doença no Brasil é a *Rickettsia rickettsii* que pertencente à ordem Rickettsiales, família Rickettsiaceae. O objetivo deste trabalho foi estudar a epidemiologia de rickettsias do Grupo da Febre Maculosa em dois assentamentos de trabalhadores rurais ligados ao MST e em equinos de seis haras localizados na mesorregião de Londrina, estado do Paraná. Os soros foram obtidos a partir de amostras de sangue coletadas em dois assentamentos localizados no município de Alvorada do Sul e Arapongas. Em Alvorada do sul foram colhidas 83 amostras de cães, 18 de equinos e 88 de humanos e em Arapongas foram colhidos 90 amostras de cães, 18 de equinos e 138 de humanos. As amostras obtidas de equinos de haras localizados nos municípios de Cambé, Guaraci, Santa Fé e Londrina totalizaram 273 soros. Todos os locais estudados pertencem a uma região considerada não endêmica para Febre Maculosa Brasileira. Para a avaliação sorológica foi utilizada a Imunofluorescência Indireta (IFI), com dois antígenos, *R. rickettsii* e *R. parkeri*. Foram consideradas positivas apenas reações com títulos ≥ 64 . Todos os carrapatos coletados nos assentamentos foram submetidos à Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Em Alvorada do Sul, 24% e 16,1% dos humanos, 55,6% e 22,2% dos equinos e 22,9% e 18,1% dos cães foram soropositivos para *R. rickettsii* e *R. parkeri*, respectivamente. Em Arapongas, 9,4% e 4,3% dos humanos, 5,6% e 5,6% dos equinos e 13,3% e 12,2% dos cães foram reagentes para *R. rickettsii* e *R. parkeri*, respectivamente. Quatro cães apresentaram reações contra *R. parkeri* com títulos quatro vezes maior que contra *R. rickettsii* e somente uma amostra de cão foi maior para *R. rickettsii*. Seis equinos e nove humanos apresentaram títulos quatro vezes maior contra *R. rickettsii*. Nenhuma amostra de equino ou de humano foram sugestivas da presença de *R. parkeri*. Os carrapatos encontrados em nosso trabalho foram *A. ovale* obtidos em cães e *A. cajennense* em cães e equinos. Na PCR foram encontrados sete carrapatos positivos para o gene *gltA* e o seqüenciamento de um fragmento deste gene mostrou maior semelhança com amostras de *R. bellii* depositadas no GenBank. Entre as amostras de equinos em haras, obtivemos soropositivos em cinco de seis propriedades estudadas. As taxas de soropositivos variaram de 0% a 13%. Nove amostras apresentaram títulos de anticorpos quatro vezes maior para *R. rickettsii* que para *R. parkeri*, o que indica a circulação de rickettsia homóloga a *R. rickettsii* entre os equinos estudados. Este estudo sugere a presença de rickettsia genotipicamente semelhante a *R. rickettsii* infectando equinos e seres humanos e a presença de anticorpos homólogos contra *R. parkeri* entre os cães localizados no norte do Paraná.

Palavras-chaves: *Rickettsia* spp. Febre Maculosa Brasileira. *Amblyomma* spp

TAMEKUNI, Katia. **Serosurvey of antibodies against rickettsias of Spotted Fever Group in humans, dogs and horses and molecular identification of *Rickettsia* spp in ticks in Northern Parana, Brazil.** 2008. 74p. Thesis (Doctor Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

ABSTRACT

Brazilian Spotted Fever is a disease transmitted to humans and animals by *Amblyomma* spp ticks and the most important agent responsible for this disease is *R. rickettsii* that belongs to the Rickettsiales order and Rickettsiaceae family. The objective of this paper was to study the epidemiology of Brazilian Spotted Fever rickettsias in two rural areas and in horse farms located in the Northern Paraná state. Serums of humans, dogs and horse were collected in two rural areas. In the first area, located in Alvorada do Sul, were sampled 83 dogs, 18 horses and 88 humans and, in the second area, located in Araçongas, were sampled 90 dogs, 18 horses and 138 humans. From the six horse farms located in Cambé, Guaraci, Santa Fé and Londrina were collected a total of 273 horse blood samples. These areas were not considered endemic for BSF. The animal and human sera were submitted to the Indirect Immunofluorescence assay (IFI) with *R. rickettsii* and *R. parkeri* antigens, considering as positive titles ≥ 64 . Ticks collected from horses and dogs were submitted to Polymerase Chain reaction (PCR). In Alvorada do Sul, 24% and 16.1% of humans, 55.6% and 22.2% of horses and, 22.9% and 18,1% of dogs were seropositive for *R. rickettsii* and *R. parkeri*, respectively. In Araçongas, 9.4% and 4.3% of the humans, 5.6% and 5.6% of horses and, 13.3% and 12.2% of the dogs were seropositive for *R. rickettsii* and, for *R. parkeri* antigens, respectively. Four sera samples of dogs showed titles at least four-folds greater for *R. parkeri* and just one sample of dog was greater for *R. rickettsii*. Six horses and nine humans showed titles four times greater for *R. rickettsii*. No samples of horses and humans suggested *R. parkeri*. The ticks species identified in our study were *A. cajennense* in horses and dogs and *A. ovale* in dogs. The PCR detected seven positives ticks with gltA primer and the gene sequencing showed similarity with *R. bellii*. From the total of 273 sera, 15 (5.5%) sera reacted against *R. rickettsii* and 5 (1.8%) to *R. parkeri*. It was found seropositive animals in five of six farms studied. The rates of seropositive animals varied from 0% to 13%, and only in one farm all the horses were seronegatives. The titers varied from 64 to 518, with final titer being detected in four samples. Nine of all positive animals reacted to *R. rickettsii* four-fold higher than *R. parkeri*, which indicates the circulation of *Rickettsia* spp homologue to *R. rickettsii* in the horse farms studied. This study suggests the presence of some rickettsia very close to *R. rickettsii* infecting horses in horse farms in the Northern Parana state, Brazil. Additionally, the presence of homologues antibodies to *R. parkeri* in dogs, and homologues antibodies to *R. rickettsii* antigen in horses and humans shows a potential risk for human BSF in the studied area.

Keywords: *Rickettsia* spp. Brazilian Spotted Fever. *Amblyomma* spp

LISTA DE TABELAS

TABELAS ARTIGO 1

- Tabela 1** – Detecção de anticorpos pela Imunofluorescência Indireta em seres humanos, cães e equinos em duas áreas rurais (Alvorada do Sul – Area 1 e Arapongas – Area 2), utilizando os antígenos *R. rickettsii* e *R. parkeri*42
- Tabela 2** – Detecção de prováveis antígenos pela Imunofluorescência Indireta em seres humanos, cães e eqüinos em Alvorada do Sul (area 1) e Arapongas, Brazil (area 2)43
- Tabela 3** – Títulos de Imunofluorescência Indireta utilizando como antígenos *R. rickettsii* em Alvorada do Sul (area 1) e Arapongas (area2)44
- Tabela 4** – Títulos de Imunofluorescência Indireta utilizando como antígenos *R. parkeri* em Alvorada do Sul (area 1) e Arapongas (area2)44
- Tabela 5** – Variável estatisticamente significativa utilizando resultados positivos para *R. rickettsii* e *R. parkeri*, em Alvorada do Sul (Area 1), Brasil45
- Tabela 6** – Variável estatisticamente significativa utilizando resultados positivos para *R. parkeri* e *R. parkeri*, em Alvorada do Sul (Area 1), Brasil45

TABELAS ARTIGO 2

- Tabela 1** – Percentage of seropositive horses by Indirect Immunofluorescence Assay (IFA) with two diferents antigens in six horse farms from north regions of Parana state, Brazil60
- Tabela 2** – Antibody titers by Indirect Immunofluorescence Assay (IFA) for two different *Rickettsia spp* in horses from six farms from north of Parana state, Brazil61

LISTA DE FIGURAS

FIGURA ARTIGO 1

Figura 1 – Mapa esquematizando a localização das duas áreas estudadas.....46

Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose a 1,5% de produtos amplificados na Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) utilizando o gene citrato sintase (*gltA*), de carrapatos *A. ovale* extraídos46

FIGURA ARTIGO 2

Figura 1 – Mapa esquematizando a localização os haras estudados62

SUMÁRIO

REVISÃO DA LITERATURA	13
REFERÊNCIAS	19
OBJETIVOS	26
OBJETIVO GERAL.....	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
CAPITULO 1 – Serosurvey of antibodies against rickettsias of Spotted Fever Group in humans, dogs and horses and molecular identification of <i>Rickettsia</i> spp in ticks in North of Paraná state, Brazil	27
ABSTRACT	27
INTRODUÇÃO	28
MATERIALS AND METHODS.....	31
STUDY AREAS	31
SAMPLES	31
INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY	32
DNA EXTRACTION AND POLYMERASE CHAIN REACTION.....	32
STATISTICS ANALYSIS.....	33
RESULTS.....	35
DISCUSSION.....	38
REFERENCES.....	47
CAPITULO 2 – Serosurvey against Spotted Fever Group <i>Rickettsia</i> spp in horse farms in North Parana state, Brazil	52
ABSTRACT	52
INTRODUÇÃO	53
MATERIALS AND METHODS.....	55
STUDY AREAS	55
SAMPLES	55
INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY	55

STATISTICS ANALYSIS.....	56
RESULTS.....	57
DISCUSSION.....	58
REFERENCES.....	63
CONCLUSÕES.....	66
ANEXOS.....	67

REVISÃO DA LITERATURA

Os carrapatos estão entre os maiores grupos de artrópodes vetores de patógenos transmitidos aos animais e ao homem (HOOGSTRAAL, 1985). Das 825 espécies de carrapatos descritos no mundo, cerca de 10% assumem maior importância, devido ao comportamento exófilo e à baixa especificidade parasitária, com grandes possibilidades de parasitarem seres humanos (OLIVER, 1989).

Em função de seus hábitos alimentares, os carrapatos perdem apenas para os mosquitos quanto à importância na transmissão de agentes infecciosos para os humanos. Porém os carrapatos são aqueles que transmitem a maior variedade de organismos patogênicos tais como: fungos, vírus, bactérias, protozoários e nematóides (VIEIRA et al., 2004; GUGLIELMO et al., 2006). A transmissão de patógenos do carrapato para o hospedeiro se dá basicamente pela saliva, que tem importância fundamental no sítio de inoculação, ao minimizar as reações imunológicas do hospedeiro contra o patógeno inoculado. A transmissão ocorre de forma transtadial e trasovariana o que possibilita a maior permanência de agentes infecciosos na natureza (SONENSHINE et al., 2002; LABRUNA, 2004a).

A febre maculosa é uma doença infecciosa que geralmente apresenta caráter endêmico e é transmitida por carrapatos ao homem (BURGDORFER et al., 1962). A primeira manifestação clínica causada pela rickettsiose foi em 1899 descrita por Maxey (1899). O primeiro relato desta enfermidade ocorreu nos Estados Unidos quando foi isolada pela primeira vez a *Rickettsia rickettsii*. A doença foi denominada Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (FMMR) e estabeleceu-se que o carrapato *Dermacentor variabilis* estava envolvido na transmissão da rickettsia (RICKETTS, 1909).

O agente etiológico da febre maculosa pertence à ordem Rickettsiales, família Rickettsiaceae (DUMLER et al., 2001). A *Rickettsia rickettsii* é uma bactéria gram negativa, pequena e intracelular obrigatória, que retém fucsina básica quando corada pelo método de Gimenez (GIMENEZ, 1964).

O gênero *Rickettsia* é composto por três grupos: O Grupo Ancestral (GA), o grupo tifo (TG) e o grupo da febre maculosa (*Spotted Fever Group* – SFG) com grande número de sorotipos. O primeiro grupo compreende apenas duas espécies a *R. bellii* e *R. canadensis* e são bactérias de patogenicidade

desconhecida. O grupo tifo é constituído por apenas duas rickettsias: *R. prowazekii* e *R. typhi* transmitidos por piolhos e pulgas, respectivamente. Já o grupo da febre maculosa é constituído por 40 espécies, apenas 15 consideradas patogênicas para os seres humanos (*R. aeschlimannii*, *R. rickettsii*, *R. conorii*, *R. africae*, *R. parkeri*, *R. australis*, *R. honei*, *R. sibirica*, *R. japonica*, *R. massiliae*, *R. helvetica*, *R. mongolotimonae*, *R. slovacica*, *R. akari* e *R. felis*) (RAOULT; ROUX, 1979; HOOGSTRAAL, 1985).

Estas *Rickettsias* já foram diagnosticadas em várias regiões do mundo, apresentando distribuição nas regiões tropicais e subtropicais (ZHANG et al., 1995). No Brasil o primeiro caso de Febre Maculosa Brasileira (FMB) foi descrito no estado de São Paulo, no ano de 1929, e a *R. rickettsii* foi a bactéria responsável pela doença (DIAS; MARTINS, 1939). Nos períodos de 1957 a 1974 e de 1976 a 1982 foram registrados casos de febre maculosa no estado de São Paulo (DEL GUERCIO, 1997). Nos últimos anos, vários casos de febre maculosa em humanos foram relatados no Brasil, principalmente nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia e Rio Grande do Sul (PLANK et al., 1979; GALVÃO et al., 2001). De 2003 a 2006 foram relatados diversos casos da doença no estado de Santa Catarina (MADEIRA; WIEBRICH, 2004; SILVA, 2006) e no ano de 2005 foi descrito um caso no estado do Paraná na cidade de São José dos Pinhais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007)

No estado do Paraná foi realizado um trabalho na cidade de São José dos Pinhais onde foi realizada sorologia em equinos, cães no local em que ocorreu o caso humano de FMB. Entre os eqüinos a prevalência encontrada foi de 25% e em cães 12,5%. Neste mesmo trabalho foram testados amostras de eqüinos pertencentes a carroceiros na zona urbana da cidade de São José dos Pinhais onde encontrou 9,33% de soropositivos (FREITAS, 2007). De acordo com trabalho de Toledo (2008) a soroprevalência entre seres humanos que trabalham em um Parque municipal localizado na cidade de Londrina foi de 20,6% para *R. rickettsii*. Já ao realizar sorologia com amostras de um bairro da cidade de Londrina a prevalência foi de 4,67%, 2,74% e 38,50% em humanos, cães e em eqüinos respectivamente (TOLEDO, 2008).

O principal agente etiológico causador da FMB é a *R. rickettsii* (LEMOS et al., 2001; GALVAO et al., 2005), embora nos últimos anos diversos estudos têm mostrado a presença de outras rickettsias no Brasil tais como a *R.*

parkeri, *R. bellii* e a *R. felis*, sendo esta última transmitida pela pulga *Ctenocephalides felis felis*. A FMB causada pela *R. rickettsii* manifesta-se no homem com febre contínua, calafrios, prostração, mal estar, mialgia, após o período de incubação de 2 a 14 dias. Erupções cutâneas maculopapulares aparecem nas extremidades e podem se estender pelo resto do corpo. Distúrbios hemostáticos também têm sido relacionados com efeitos citopáticos e atividades de endotoxinas da *R. rickettsii*, que é caracterizada pela alta letalidade (DIAS; MARTINS, 1939; GALVÃO, 2001).

A *R. parkeri* foi isolada pela primeira vez no Estados Unidos a partir carrapatos pertencentes à espécie *A. maculatum* no estado do Texas. As manifestações clínicas descritas são semelhantes àquelas causadas pela *R. rickettsii*, porém de forma mais branda e sem letalidade (PARKER et al., 1939). No sul da América Latina a *R. parkeri* foi detectada pela primeira vez no Uruguai, por meio de técnica de Reação em cadeia pela polimerase (PCR) em carrapatos da espécie *A. triste* (VENZAL, 2004). No Brasil a *R. parkeri* foi isolada de *A. triste* encontrados na cidade de Paulicéia, estado de São Paulo, e é possível que estejam ocorrendo casos de FMB em humanos pela *R. parkeri* de forma silenciosa (SILVEIRA et al., 2007). Alguns estudos sorológicos em cães mostraram reações positivas para *R. parkeri* de diferentes regiões do Brasil, tais como, no Estado do Amazonas (LABRUNA et al., 2007), Rio Grande do sul (SAITO et al, 2008) e São Paulo (HORTA et al., 2007).

No Brasil a *R. bellii* já foi descrita infectando diferentes espécies de carrapatos tais como: *A. dubitatum*, *A. ovale*, *A. oblongoguttatum*, *A. humerale*, *A. scalpturatum*, *A. rotundatum*, *A. aureolatum*, *Ixodes loricatus* e *Haemiphysalis juxtakochi* estes carrapatos que normalmente estão relacionados com seres humanos e cães (LABRUNA et al., 2004ab; 2005; 2007b; PINTER et al., 2006; HORTA, 2006), entretanto ainda não há relatos de infecção por estas rickettsias em seres humanos, cães e equinos (HORTA et al., 2004; LABRUNA et al., 2007). Alguns estudos mostraram que ao se realizar testes sorológicos em cães, não foram detectados animais positivos ao utilizar *R. bellii* como antígeno, apesar desses animais estarem parasitados por um grande número de carrapatos infectados por *R. bellii* (LABRUNA et al., 2007; PINTER et al., 2008). Em um recente estudo descrito por Pacheco et al, (2007) existe uma possível infecção em capivaras, de acordo com evidências sorológicas.

Nos Estados Unidos os principais vetores para *Rickettsia sp* são os carrapatos do gênero *Dermacentor*, que são encontrados em cães e, conseqüentemente, acabam veiculando o agente infeccioso para o ambiente de convivência de seres humano (MCDADE; NEWHOUSE, 1986). De acordo com Demma et al. (2005), os carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* foram incriminados como vetores da FMMR em 16 pacientes que relataram contato com cães que estavam infestados com *R. sanguineus*.

No Brasil os carrapatos do gênero *Amblyomma spp* são os principais vetores que transmitem a FMB ao homem e a outros mamíferos (TRAVASSOS; VALLEJO-FREIRE, 1942).

O *A. cajennense* e *A. aureolatum* são as principais espécies de carrapatos responsáveis pela transmissão da FMB ao homem (LEMOS et al., 1997; PINTER; LABRUNA, 2006). A transmissão transovariana é o mecanismo que mantém as rickettsias na natureza, as quais se multiplicam em diversos órgãos do carrapato, inclusive nos ovários (RAOULT; ROUX, 1979).

Apesar de existir a forma de transmissão transovariana que mantém estas rickettsias entre a população de carrapatos, estudos mostram que a *R. rickettsii* são patogênicas ao carrapato e assim há necessidade da existência de outra forma que mantém as bactérias na natureza. Os hospedeiros amplificadores matem os níveis altos de bactérias na corrente sanguínea e assim garante que novos carrapatos não infectados se infectem, amplificando a infecção por *Rickettsia spp* na população de carrapatos. (McDADE; NEWHOUSE, 1986; BURGDORFER, 1988). No Brasil diversos trabalhos mostram as capivaras (*Hydrochoerus hydrochoerus*) e os gambás (*Didelphis SP*) como hospedeiros amplificadores de *R. rickettsii* para *A. cajennense* (TRAVASSOS; VALLEJO-FREIRE, 1942; HORTA et al, 2008).

As capivaras são hospedeiras de várias espécies de carrapatos, entre elas o *A. dubitatum*, específico deste cavídeo, e também o *A. cajennense* (TRAVASSOS; VALLEJO, 1942). Souza et al. (2008) realizou uma infecção experimental em capivaras, através de infestação de carrapatos *A. cajennense* previamente infectados, para a avaliação clínica da doença e a transmissão da bactéria para os carrapatos. Com este estudo pode se observar que estes animais permaneceram infectados por um período de 27 dias sem apresentarem sinais clínicos da doença e aproximadamente 20 a 25% dos carrapatos foram infectadas

durante o período da infecção. Outro estudo realizado no Município de Campinas mostrou que 36% dos carrapatos *A. dubitatum* coletados de capivaras foram positivos no teste de hemolinfa, confirmando a suscetibilidade das capivaras à infecção pelo agente (SOUZA et al., 2004).

Os gambás são animais muito comuns encontrados em diversos locais e são parasitados por larvas e ninfas de *A. cajennense* e *A. dubitatum* (HORTA et al., 2007). Isolados de *R. rickettsii* já foram obtidos de gambás naturalmente infectados, nos Estados de Minas Gerais e São Paulo, na década de 1930 (MOREIRA; MAGALHÃES, 1935). Horta et al. (2004) capturou 94 gambás e testou individualmente pela IFI utilizando quatro antígenos diferentes e encontrou 68,1% reagentes para pelo menos um antígeno. Em outro experimento realizado por Horta et al (2008), com o objetivo de comprovar o papel de hospedeiros amplificadores para *A. cajennense*, mostrou que ao realizar uma infecção experimental em gambás inoculando *R. rickettsii* de duas formas diferentes, estes animais mantiveram uma rickettsemia que variou de 14 a 28 dias e que a *R. rickettsii* foi capaz de infectar os gambás sem causar doença.

Em regiões endêmicas a soropositividade de equinos, utilizando a *R. rickettsii* como antígeno, foi de 57 % a 90%, indicando que esses animais são importantes como sentinelas da Febre Maculosa no Brasil (LEMOS et al., 1997; HORTA et al., 2004; SANGIONI et al., 2005). Os equinos são os hospedeiros primários dos carrapatos *A. cajennense*, portanto em locais em que há elevada infestação por estes carrapatos, seres humanos e cães poderão ser hospedeiros secundários destes carrapatos. Já os cães têm uma grande importância por serem responsáveis por carrear carrapatos para área domiciliar e, conseqüentemente, para seres humanos (LEMOS et al., 1997; LABRUNA et al., 2001).

Em estudo realizado com cães infectados experimentalmente por *R. rickettsii*, o período de rickettsemia nestes animais variou de 3 a 13 dias, esses cães apresentaram sinais clínicos da doença durante o período de infecção (PIRANDA et al., 2008).

Em populações com altas taxas de renovação populacional, a entrada de animais suscetíveis à doença é maior. No entanto, os cães apresentam baixas taxas de renovação populacional, diferentemente com o que acontece com as capivaras e os gambás (HORTA et al., 2008)

O diagnóstico em seres humanos baseia-se em exames clínicos específicos, porém, necessita de diagnóstico laboratorial, por meio de pesquisas de anticorpos específicos. O isolamento do agente em cultivo celular pode ser um diagnóstico precoce, já que na fase inicial da rickettsemia o hospedeiro pode não apresentar anticorpos detectáveis no soro sanguíneo (GALVÃO, 2001). A utilização de recursos da biologia molecular tem auxiliado na identificação de novas espécies de rickettsias, pelo sequenciamento do DNA amplificado (EREMEEVA et al., 1994).

A técnica de imunofluorescência indireta (IFI) é o teste de eleição para o diagnóstico de FMB, porém reações cruzadas entre as espécies de rickettsias têm sido muito comum, o que dificulta a diferenciação entre as espécies, impossibilitando a identificação de determinada espécie na região estudada. A localização geográfica de onde originou a infecção é um importante dado para a diferenciação da espécie de rickettsia. Ao se realizar testes sorológicos é possível detectar qual a provável espécie acometida, comparando títulos sorológicos de diferentes antígenos, uma vez que títulos de anticorpos homólogos são maiores que títulos de anticorpos heterólogos (LASCOLA; RAOULT, 1997; FENG; WALKER, 2003; HORTA et al., 2004).

No Norte do estado do Paraná, poucos estudos foram realizados sobre a FMB, porém, devido à presença de carrapatos considerados importantes vetores na transmissão da rickettsia, bem como, as condições ambientais favoráveis que propiciam a manutenção das rickettsias na natureza, mostram a importância de estudo nessa região.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Saúde. Arquivos casos maculosa 1997- 2006, Brasília, 2007.
- BURGDORFER, W.; NEWHOUSE, V. F.; PICKENS, E. G.; LACKMAND, B. Ecology of Rocky Mountain Spotted Fever in Western Montana – I. Isolation of *Rickettsia rickettsii* from wild mammals. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, p. 293-301, 1962.
- DEL GUERCIO, V. M. F.; ROCHA, M. M. M.; MELLEES, 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.
- 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 Tropical Medicine**, v.19, p.103-108, 1939.
- DUMLER J. S., BARBET A. F., BEKKER C. P., DASCH G. A., PALMER G. H., RAY S.C., RIKIHISA Y., RURANGIRWA F. R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.51, p.2145-65, 2001.
- EREMEEVA, M.; YU, X.; RAOULT, D. Differentiation among spotted fever group *Rickettsiae* species by analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA, **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.3, p. 803-810, 1994.
- FENG H. M.; WALKER D. H. Cross-protection between distantly related spotted fever group rickettsiae. **Vaccine**, 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.

GALVÃO, M. A. M et al. Informe Técnico de Febre Maculosa. Secretaria da Saúde de Minas Gerais, 2001.

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**. v.39, n.5, p.850-856, 2005.

GIMÉMEZ, D. F. Staining Rickettsiae in yolk-sac culture. **Stain Technology**, n.39, p. 135 -140, 1964.

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

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 state of São Paulo, Brazil: Serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another Spotted Fever Group Rickettsia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.71, n.1, p. 93–97, 2004.

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., PINTER, A., LINARDI, P. M., SCHUMMAKER, 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.

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

HOOGSTRAAL, H. Argasid and Nuttallielid ticks as parasites and vectors. **Advances in Parasitology**, v. 1, n. 24, p. 135-238, 1985.

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

LABRUNA, M.B. Carta Acarológica. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, suplemento 1, 2004b.

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

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.; 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 Zoonotic Disease**, v.7, p.249-255, 2007.

LASCOLA B, RAOULT D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.2715–2727, 1997.

LEMOS, E. R. S.; MACHADO, R. D.; PIRES, F. D. A.; MACHADO, S. L.; COSTA, L. M. C.; COURA, J. R. Rickettsiae-infected ticks in a endemic área of spotted fever in state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 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 na endemic area in the state of São Paulo. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.65, n.4, p.329-334, 2001.

MADEIRA, A.; WIESBRICH, J. Surto de febre maculosa no estado de Santa Catarina, **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, suplemento 1, p 364, 2004.

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

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

MOREIRA, J. A.; MAGALHÃES, O. Thypho exanthematico em Minas Gerais. **Brasil Médico**, v. 44, p. 465-470, 1935.

OLIVER J. H. Biology and systematic of ticks (Acari: Ixodidas). **Annual Review of ecology and Systematics**, 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

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

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.; FILHO, J. M.; 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. **Caderno de Saúde Pública**, v. 24, n.2, p. 247-252, 2008.

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

RAOULT, D., ROUX, V. Rickettsioses as paradigms 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.

SAITO T., CUNHA F. N., PACHECO R. C., FERREIRA F., PAPPEN F., FARIAS N., LARSSON C., LABRUNA M. B. Canine infection by rickettsiae in southern Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.79, n.1, p.102-108, 2008.

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

SOUZA, C. E.; CALIC, S. B.; CAMARGO, M. G. O.; SAVINI, E. S. M.; SOUZA, S. S. A. L.; LIMA, V. L. C.; NETO, E. J. R.; YOSHINARI, N. H. O papel da capivara *Hydrochaeris hydrochaeris* na cadeia epidemiológica da febre maculosa brasileira. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v.13 (Suppl.), p.203-205, 2004.

SOUZA, C. E.; MORAES-FILHO, J.; OGRZEWALSKA, M.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of capybaras *Hydrochaeris hydrochoerus* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON TICKS AND TICK-BORNE PATHOGENS, VI, 2008. Buenos Aires, Argentina. *Anais...* 2008.

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.

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.

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

TOLEDO R. S. **Aspectos epidemiológicos de rickettsias do grupo da febre maculosa em humanos, cães, equinos e carrapatos em Londrina, PR**. 2008. (Dissertação: Mestrado em Ciência Animal) – UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

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.

VIEIRA, A M. L.; SOUZA, C. S.; LABRUNA, M. B.; MAYO, R. C.; SOUZA, S. S. L.; CAMARGO NEVES, V. L. *Manual de Vigilância Acarológica*, Secretaria de Estado da Saúde, SUCEN, São Paulo, p.62, 2004.

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.

ZHANG, J. Z.; FAN, M. Y.; BI, D. Z. Detection of spotted fever group rickettsiae in ticks and rodents by polymerase chain reaction technique in people's republic of China. **Acta Virologica**, v.39, p.263-267, 1995.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Estudar a epidemiologia de rickettsias do grupo da febre maculosa em dois assentamentos ligados ao MST (Movimento sem Terra) e em haras localizados na região Norte do estado do Paraná.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as espécies de carrapatos de cães e equinos na área do estudo;
- Determinar a ocorrência de anticorpos contra rickettsias do grupo da febre maculosa em cães, equinos e seres humanos que vivem na área de estudo, por meio da técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI);
- Identificar as espécies de rickettsias circulantes, por meio da realização de reação em cadeia pela polimerase (PCR) em carrapatos encontrados na região;
- Associar as variáveis estudadas com a soropositividade dos animais e seres humanos.

CAPÍTULO 1

Serosurvey of antibodies against rickettsias of Spotted Fever Group in humans, dogs and horses and molecular identification of *Rickettsia* spp in ticks in Northern Paraná, Brazil

Brazilian Spotted Fever (BSF) is a disease caused by *Rickettsia rickettsii*, which belongs to the Rickettsiales order, Rickettsiaceae family and Rickettsia genus, transmitted to humans and animals by ticks *Amblyomma* spp. The objective of this work was to study the serum occurrence of BSF rickettsias in rural areas from Northern Parana state. Serum samples of humans, dogs, and horse were collected in two rural areas. In the first one, located in Alvorada do Sul municipality, 88 humans, 83 dogs, and 18 horses were sampled and, in the second one, located in Arapongas municipality, 138 humans, 90 dogs and 18 horses were studied. The animal and human sera were submitted to the Indirect Immunofluorescence assay (IFI) using *R. rickettsii* and *R. parkeri* as antigens, considering positive titers ≥ 64 . Ticks collected from dogs and horses were submitted to polymerase chain reaction (PCR). In Alvorada do Sul, 24% and 16.1% of humans, 55.6% and 22.2% of horses and, 22.9% and 18,1% of dogs were seropositive for *R. rickettsii* and *R. parkeri*, respectively. In Arapongas, 9.4% and 4.3% of the humans, 5.6% and 5.6% of horses and, 13.3% and 12.2% of the dogs were seropositive for *R. rickettsii* and, for *R. parkeri* antigens, respectively. Four serum samples of dogs showed titer at least four-folds greater for *R. parkeri* and just one sample of dog was greater for *R. rickettsii*. Six horses and nine humans showed titer four-folds greater for *R. rickettsii*. No samples of horses and humans suggested *R. parkeri*. The ticks species identified in our study were *A. cajennense* in horses and dogs and *A. ovale* in dogs. The PCR detected seven positives ticks with *gltA* gene and the amplicon sequencing showed similarity with *R. bellii*. In conclusion, the presence of homologues antibodies to *R. parkeri* in dogs, and homologues antibodies to *R. rickettsii* antigen in horses and humans shows a potential risk for human BSF in the studied area.

Keywords: *Rickettsia* spp. Brazilian Spotted Fever. *Amblyomma* spp.

INTRODUÇÃO

Brazilian Spotted Fever (BSF) is an acute febrile tick born disease caused by rickettsias that belongs to Rickettsiales order and Rickettsiaceae family (DUMLER, 2001). The rickettsias are intracellular obligatory, gram negative and are classified in two groups: the typhus group (TG) and the Spotted Fever Group (SFG). The typhus group is composed by three rickettsias: *R. canadensis*, *R. prowazekii* and *R. typhi*, while the Spotted Fever group is composed by 60 species, however few of them are considered pathogenic for humans (HOOGSTRAAL, 1985; RAOULT; ROUX, 1997).

In Brazil the tick *Amblyomma* spp are the main vector responsible for transmission of BSF for humans and animals (GALVÃO et al., 2003; MCDADE; NEWHOUSE, 1986). *A. cajennense* is considered the most important vector to transmit BSF to humans (LEMOS et al., 1997; GUEDES et al., 2001), although recently a study showed that *A. aureolatum* is an important vector (PINTER et al, 2006). The transovarian transmission is the mechanism that these rickettsias are maintained in the nature (RAOULT; ROUX, 1997). Although this transmission maintain rickettsia among ticks population, some studies showed that *R. rickettsii* are pathogenic for ticks and it is necessary another alternative to maintain these bacteria in nature. The presence of amplifier host is important in horizontal transmission due to the high level of rickettsia maintained in blood of these animals and consequently new non infected ticks can be infected with *Rickettsia* spp (McDADE; NEWHOUSE, 1986; BURGDORFER, 1988). Some studies showed capybaras (*Hydrochoerus hydrochoerus*) and opossum (*Didelphis* SP) as amplifiers host of *R. rickettsii* to *A. cajennense* ticks (TRAVASSOS; VALLEJO-FREIRE, 1942).

The major etiologic agent of BSF is *R. rickettsii* (LEMOS 2001; GALVAO 2006), although in the last years some studies revealed the importance of other rickettsias in Brazil such as *R. parkeri*, that was found in different areas of Brazil (LABRUNA et al., 2007c; HORTA et al., 2007; SAITO et al., 2008). In Brazil this agent was isolated in *A. triste* (SILVEIRA et al., 2007), and it was previously related to be detected by polymerase chain reaction (PCR) in *A. triste* tick from Uruguai (VENZAL, 2004).

The *R. bellii* have been another important rickettsia in Brazil, this rickettsia is the most common rickettsia found infecting ticks in our country, including those tick species more frequently associated with canine and humans infestation: *A. ovale*, *A. oblonguttatum* and *A. scapturatum* (LABRUNA et al., 2005). Although this rickettsia species are not currently recognized as human or animal pathogen (LABRUNA et al., 2004a; 2007ab).

Some studs showed that the domestic animals such as dogs and horses are important to the BSF epidemiology. The importance of dogs is duo to be the responsible to carry important ticks to the human's home and the horse to be the major host for *A. cajennense* and consequently the humans and dogs are the second host for these (LEMOS et al., 1997; LABRUNA et al., 2001).

In state of Paraná was described just two studies, one was realized in an urban area of São José dos Pinhais , and the prevalence of positives found in this study was 9.33% in horses against *R. rickettsii* (FREITAS, 2007). The other study realized at Paraná state was performed in a urban area of Londrina northern of Paraná state, and showed seropositivity of 4,67% in humans, 2,74% in dogs and 38,50% in horses using *R. rickettsii* as antigen (TOLEDO, 2008).

The BSF is obligatory notification disease since 2001 and it is responsible for high lethality in humans. The importance of this epidemiological study, which was conducted in Paraná State, is due to the need to monitor possible cases that can be occurring in rural area. The present study evaluate the rickettsial infection among humans, dogs and horse in two rural communities in North of Paraná state and the evaluation of molecular identification of the *Rickettsia* spp that are infecting the ticks found in this study.

MATERIALS AND METHODS

Study Areas

The samples were obtained from two rural areas in North of Paraná State that are divided in many land lots such as a rural village. The area 1 was located in Alvorada do Sul municipality (22°51'S/51°14'W) and the area 2 in Arapongas municipality (23°30'S/51°18'W) (Figure 1). These localities are considered silent areas for BSF and the main activity carried out in such places are family agriculture, where the human being are living close to the animals, such as dogs and horses.

Area 1 situated in Alvorada do Sul occupies 1068.62 hectare of total area where 60 families reside. Area 2 localized in Arapongas has 765.10 hectare of area and there were 94 families living in there. These two areas have ciliary forest near margins of streams, where there is the presence of wild animals.

Samples

This Project was approved by Ethic Committees of the Universidade Estadual de Londrina for Animal Experimentation (n° 82/2006) and for Human Being (n° 124/07).

In area 1 blood samples were obtained from humans, dogs and horses, from November 2006 to January, 2007 and in area 2, the blood samples were obtained from January to March, 2007.

All blood samples were collected using sterile materials and identified before transported to the laboratory, where the serums were separated by centrifugation, aliquoted and stored at -20°C until be used.

The ticks were collected from dogs and horses and maintained in absolute alcohol. The identification of tick species followed Aragão & Fonseca, (1961) and Guimarães et al. (2001).

Indirect Immunofluorescence Assay (IFA)

The IFA was performed according to Horta et al. (2004). This test is considered the gold standard test by WHO (World Health Organization). The serum samples were submitted to IFA using two different antigens, *R. Rickettsii* and *R. parkeri*, which were cultivated in Vero cells until 100% of infected cells. The antigen-antibody reaction was revealed by fluorescein isothiocyanate labeled goat anti-human IgG, anti-horse IgG and anti-dog IgG (Sigma-Aldrich). The slides were read using microscope epifluorescent (Olympus, Japan) at 400x magnification and only titers ≥ 64 were considered positive.

Tick DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction

The DNA extraction was performed according to Chomkzynski (1993) modified by Sangioni et al., 2005. Each tick was dried in sterilized paper and than longitudinally sectioned using sterilized bistouries and then one portion of the tick was triturated for DNA extraction and the other was stored at -20°C .

The PCR assay was performed individually in 101 ticks from dogs and horses located in area 1 and 31 ticks from area 2.

For rickettsial DNA amplification was used oligonucleotide: *RpCS.877p* – GGGGGCCTGCTCACGGCGG and *RpCS.1258n* – ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA which amplifies 381bp fragment of the citrate synthase gene (*gltA*), present in all *Rickettsia* genus (REGNERY et al., 1991). The

samples that were positives to *gltA* gene were submitted to PCR using out membrane protein gene (*ompA*) oligonucleotide for detection of Spotted Fever group *Rickettsias*: Rr190.70p – ATGGCGAATATTTCTCCAAAA and Rr190.602n – AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT which amplifies 512bp fragment (REGNERY et al., 1991).

For each PCR reaction 5 µl were used for PCR buffer (10X), 5 µM for deoxynucleotide triphosphates (dNTP 1,25 mM), 1.5 mM MgCl₂ (50 mM), 25 pmol of each primer, 1,5U de Taq DNA polimerase (5000 U/ml) and 5 µl of extracted DNA sample, and distilled water to a final volume of 50 µl. The conditions of amplification was described by Horta et al., 2002. As positive control was used DNA from *Rickettsia* spp (NOD), isolated from *A. nodosum*, and for the negative control sterilized distilled water was used.

The amplified products were visualized in 1.5% agarosis gel stained with ethidium bromide (SAMBROOK et al., 1989).

The DNA amplifications products with expected size were submitted to sequencer analyzer (ABI Prism 3100 Genetic - Applied Biosystems/Perking Elmer, California, USA) and the sequences were submitted to BLAST (Basic Local Alignment SearchTool) to determine similarity to other *Rickettsia*.

Statistics analysis

In this study an epidemiological questionnaire was applied and the relevant variables analysed were: the age and sex of the people and animals, how long they are living in this area, the presence of ciliary forest, and the presence of ticks and the controlling of the ticks on the animals. To analyse the variables, Qui-square test or

Fisher exact and Odds Ratio with 95% of confidence and 5% for significance were used. These calculations were realized with Epi6 program (CDC/Atlanta).

RESULTS

In area 1 blood samples were obtained from 88 humans, 83 dogs and 18 horses and in area 2, 138 humans, 90 dogs and 18 horses were sampled.

The IFA detected antibodies against *R. rickettsii* and *R. parkeri* antigens in both studied areas. In area 1 the seropositivity to *R. rickettsii* was 24.1% for humans, 55.6% for horses and 22.9% for dogs and for *R. parkeri* antigen was 16.1% in humans, 22.2% in horses and 18.1% in dogs (Table 1). The titers in humans, for both antigens, ranged from 64 to 1024 and just one of them reached 1024. In horses the titers ranged from 64 to 256 for *R. rickettsii*, while for *R. parkeri* was found just 64. Among the dogs, the titers for both antigens ranged from 64 to 2048, three of them reached 1024 for both antigens and one for *R. parkeri* with titer of 2048 (Table 3 and 4).

Among the positive samples it is possible to observe that three serums were at least four-fold higher for *R. parkeri* than *R. rickettsii* and just one was four-fold higher for *R. rickettsii* than *R. parkeri*. Differently from dogs, in horses the titers were at least four-fold higher for *R. rickettsii* than *R. parkeri* in six tested samples. In humans the sera reactivity was similar to the horses when nine positive sera were at least four-fold higher for *R. rickettsii* (Table 2).

In the area 2 the rates of seropositivity against *R. rickettsii* antigen in humans, horses and dogs were 9.4%, 5.6% and 13.3%, respectively. The antibody reactivity against *R. parkerii* antigen in humans was 4.3%, 5.6% in horses and 12.2% in dogs (Table 1).

The titers against *R. rickettsii* and *R. parkeri* in humans in the area 2 were 64 and 256, in horses the titer was just 128 and in dogs most of the titers ranged

from 64 to 512 and just two samples reached higher titers, such as 1024 and 2048 (Tables 3 and 4).

Using these two antigens, among human samples, five sera reached at least four-fold higher for *R. rickettsii* than *R. parkeri*. Using the same method we observed that just one dog sample was considered homologue for *R. parkeri*, differently from the human reactions. There were no differences against titers of the horse sera samples (Table 2).

From a total of 101 ticks collected in Area 1, 21 were identified as *A. ovale*, one as *A. cajennense* and 45 as *Rhipicephalus sanguineus* found in dogs and 34 *A. cajennense* in horses. In area 2 there were 19 *A. ovale*, one *A. cajennense* and 10 *R. sanguineus* in dogs, and just *A. cajennense* in a horse, totalizing 30 ticks.

All ticks that were collected in this study were submitted individually to PCR, and only ticks from *A. ovale* species were positives for *gltA* gene. Among the seven positive ticks, three were from area 1 and four from area 2. However, when these samples were submitted to *ompA* gene all of them were negatives. The tick DNA samples positives for *gltA* gene, with size of 332bp were submitted to the sequencing and the products were similar to *Rickettsia bellii* species (GenBank number FJ789813).

In this study we analyzed some variables obtained with an individual questionnaire applied in these two areas. When the variables were crossed with positive samples reacted against *R. rickettsii* antigen it was possible to observe that in the area 1 there was no variable statistically significant among positive samples of dogs. However, among horses, the control of ticks was considered significant, out of eight animals not treated, seven were positive ($p=0.022$). In humans the significant

variable was the presence of positive horse ($p=0.016$), where in 16 samples of humans that acquired a horse, eight were positive to *R. rickettsii* antibodies (Table 5).

In dogs from area 2 the presence of ciliary forests near the place was considered statistically significant ($p=0.025$), four out of ten dogs that were living near ciliary forest areas were positive. No significant variable was found for humans and horses (Table 7).

The variables analyzed in area 1, when crossed with the variables of the positive samples and *R. parkeri*, were statistically significant in dogs when they were in contact with ticks with ($p=0.017$). Of a total of 65 animals that had contact with ticks 15 were positive for *R. parkeri*. Among horses the significant variable was the realization of treatment for ticks, when no horses were positive in 10 treated horses ($p=0.022$). There was no significant variable when analyzing humans results (Table 6).

The variable found in the area 2, when *R. parkeri* was used, was the presence of ciliary forests near the place where the dogs were living ($p=0.012$), out of 10 dogs that lived near ciliary forest area, four were positive. No significant variable was found for humans and horses (Table 8).

DISCUSSION

The serology in this study showed that the frequency of seropositivity to *R. rickettsii* in dogs living in area 1 was 22.9%, which is similar to Pirassununga region, in São Paulo state. This area is nonendemic for BSF and there was never a case of BSF before (HORTA et al., 2007). The frequency found in area 2 was 13.3%, almost half found in the area 1. Such difference might be due to the lower presence of ticks in area 2 (41%) than in area 1 (78%), almost two times higher. Furthermore, the other reason could be the fact that the dogs from area 1 had more contact with forest area, where they probably acquired *A. ovale*.

A. ovale usually parasitize wild animals and it is possible to find these ticks in dogs in rural areas (ARAGÃO; FONSECA, 1961). The occurrence of *A. ovale* parasiting humans was already described in an Atlantic rainforest reserve in Southeastern Brazil (MATIAS et al, 2006; SANGIONI, 2008). In Brazil the presence of *R. parkeri* has already been described infecting *A. triste* (SILVEIRA et al., 2007) found in state of São Paulo. In our study was observed the presence of *A. ovale* in dogs in the two studied areas, for this reason there is the possibility that these ticks have maintained *R. parkeri* at the studied localities.

Dog sera samples reacted at least four-fold higher for *R. parkeri* than *R. rickettsii*, indicating the presence of antibodies very close to *R. parkeri*. *R. parkeri* was already isolated from *A. maculatum* at United States (PADDOCK et al., 2004). Recently in Brazil, as described before, it was isolated from *A. triste* collected in Paulicéia municipality, São Paulo state (SILVEIRA et al., 2007).

R. parkeri symptomatology in humans has been described to be less aggressive than the infection caused by *R. rickettsii* and it is likely that it is

responsible for the occurrence of no diagnosed cases of BSF in some cities of São Paulo, including nonendemic areas (HORTA et al., 2007c, SILVEIRA et al., 2007).

Saito (2008) has been described serological evidence in dogs in South of Rio Grande do Sul where serological evidence indicated the presence of antibodies homologues to *R. parkeri*, detected in 23 of 33 areas studied. Similar result was found in Monte Negro located in the State of Rondônia (LABRUNA et al., 2007c). Consequently, it is possible to be occurring the presence of rickettsia homologue to *R. parkeri* in Paraná State and potentially the *A. ovale* has been maintaining this rickettsia in these two areas.

In horses of area 1 the reactivity against *R. rickettsii* was 55.6%, although the variable, contact with ticks, was considered not statistically significant the percentage of contact with ticks was 88.8%. This prevalence of positivity is high, considering that the study is silent area for BSF. Other studies showed that the seropositive percentage in horses in an endemic region was around 77.3% (HORTA et al., 2004), 57.1% to 80% (SANGIONI et al., 2005) and in nonendemic region is approximately 19% (HORTA et al., 2007). This prevalence of seropositive in nonendemic was similar to the one found in area 2 in our study.

The result found in the area 1 is important because the surveys of horse sera is a useful method for BSF surveillance in areas where humans are exposed to *A. cajennense*, as proposed by Sangione et al. (2005). This method was applied because the horses are the primary host for this tick and in places with a massive presence of these ticks the humans and animals consequently might become the secondary host for the *A. cajennense* (LABRUNA et al., 2001, HORTA et al., 2007; PINTER et al., 2008). In our study the horses demonstrated to be good sentinels for BSF in the area 1.

IFA is the gold standard test for serological diagnosis of rickettsial infection in humans and animals, but cross-reactivity of rickettsial antigens has been very common and this problem interferes with the identification of rickettsial species involved in the studied region. In some of the cases, differences in titers when testing different species of rickettsias may be great enough to differentiate the species, because homologous antibody titers are higher than heterologous antibody titers (FENG; WALKER, 2003; HORTA et al., 2004).

The seroprevalence against *R. rickettsii* found in humans in area 1 was 24.1%. This result is considered high because there are no cases of FMB in this area. In an endemic area some studies demonstrated seroprevalence of 7.14% in a endemic area of Minas Gerais state (LEMOS et al, 1994), 2.8 % in Mogi das Cruzes, state of São Paulo (PINTER et al, 2008) and according to Horta et al (2007) in four endemics area located in São Paulo municipally the prevalence ranges of 10% to 19% and in an nonendemic area was 17,8% of seropositivity.

This high result can be explained to the contact of the humans with the same ticks that are parasiting positives horses, and were therefore bitten by the same tick species. In this studied area it might be occurring silent cases of BSF, because the high seroprevalence found and that these human and horse always lived in north of Parana, according to the questionnaire applied.

The rickettsia species found in humans and horses was very close to *R. rickettsii* that is explained by the presence of *A. cajennense* parasiting horses and are probably attacking humans.

Differently of the result obtained in dogs, in humans and horses the serological evidence showed the occurrence of an infection caused by *R. rickettsii* or very close-related species. Although there are no BSF cases described in those

places and not even any symptoms were related in the epidemiological questionnaire, therefore it is necessary to conduct further studies with a bigger sample of rickettsial species.

In the present study we observed the presence of *R. bellii* infecting *A. ovale* collected in dogs from the two areas studied. *R. bellii* has been frequently found in different species of ticks in Brazil (HORTA et al., 2004). This result is in agreement with the other study performed in Rondonia where it was found *A. ovale* ticks infected with *R. bellii*. Although it is very common to find *R. bellii* infecting ticks, there is no description of this *Rickettsia* infecting humans, horses or dogs (HORTA et al., 2004; LABRUNA et al., 2007c).

Some studies showed that dogs parasitized with ticks infected with *R. bellii* were negative to *R. bellii* by IFA (PINTER et al., 2008). In contrast to the study described by Pacheco et al. (2007), there is a possible infection of *R. belli* in capybaras shown by serological test.

This study showed the importance of epidemiological studies in the State of Paraná, and the infection with rickettsia species is frequent in humans and animals studied.

In conclusion, the presence of homologues antibodies to *R. parkeri* in dogs, and homologues antibodies to *R. rickettsii* antigen in horses and humans shows a potential risk for human BSF in the studied area.

Table 1 – Antibodies detected by Indirect Immunofluorescence Assay, using *R. rickettsii* and *R. parkeri* as antigen, in human, horse and dog, at two rural localities (Alvorada do Sul – Area 1 and Araongas – Area 2), North Paraná state, Brazil.

Sera	Area 1		Area 2	
	<i>R. rickettsii</i> n positives/n total (%)	<i>R. parkeri</i> n positives /n total (%)	<i>R. rickettsii</i> n positives/n total (%)	<i>R. parkeri</i> n positives/n total (%)
Human	21/88 (24.1%)	14/88 (16.1%)	13/138 (9.4%)	6/138 (4.3%)
Horse	10/18 (55.6%)	4/18 (22.2%)	1/18 (5.6%)	1/18 (5.6%)
Dog	19/83 (22.9%)	15/83 (18.1%)	12/90 (13.3%)	11/90 (12.2%)

Table 2 – Homologous antigens by Indirect Immunofluorescence Assay in human, horse and dog at Alvorada do Sul (area 1) and Arapongas (area 2), North Paraná state, Brazil.

Study Area	Sera	IFA Titers		PAIHR
		<i>R. rickettsii</i>	<i>R. parkeri</i>	
Area 1	Dog 20	256	2048	<i>R. parkeri</i>
Area 1	Dog 71	NR	128	<i>R. parkeri</i>
Area 1	Dog 73	NR	128	<i>R. parkeri</i>
Area 1	Dog 75	512	NR	<i>R. rickettsii</i>
Area 1	Horse 6	128	NR	<i>R. rickettsii</i>
Area 1	Horse 10	256	64	<i>R. rickettsii</i>
Area 1	Horse 11	128	NR	<i>R. rickettsii</i>
Area 1	Horse 13	512	NR	<i>R. rickettsii</i>
Area 1	Horse 14	128	NR	<i>R. rickettsii</i>
Area 1	Horse 18	512	NR	<i>R. rickettsii</i>
Area 1	Human 4	128	NR	<i>R. rickettsii</i>
Area 1	Human 10	128	NR	<i>R. rickettsii</i>
Area 1	Human 57	256	NR	<i>R. rickettsii</i>
Area 1	Human 87	128	NR	<i>R. rickettsii</i>
Area 2	Dog 124	NR	128	<i>R. parkeri</i>
Area 2	Human 110	128	NR	<i>R. rickettsii</i>
Area 2	Human 111	128	NR	<i>R. rickettsii</i>
Area 2	Human 115	128	NR	<i>R. rickettsii</i>
Area 2	Human 129	128	NR	<i>R. rickettsii</i>
Area 2	Human 151	128	NR	<i>R. rickettsii</i>

PAIHR: Possible antigen involved in a homologous reaction nonreactive at titer 64 or higher for IFA

NR: nonreactive

Table 3 – Indirect Immunofluorescence Assay (IFA) titers using *R. rickettsii* antigen in Alvorada do Sul (area 1) and Arapongas (area 2), North of Parana state, Brazil.

Study Areas	Animals	n° samples/ IFA Titers against <i>R. rickettsii</i>					
		64	128	256	512	1024	2048
Area 1	Dog	6	4	4	2	3	0
	Horse	1	6	3	0	0	0
	Human	10	7	3	0	1	0
Area 2	Dog	2	1	3	3	1	1
	Horse	0	1	0	0	0	0
	Human	5	7	1	0	0	0

Table 4 – Indirect Immunofluorescence Assay (IFA) titers using *R. parkeri* antigen in Alvorada do Sul (area 1) and Arapongas (area 2), North of Parana state, Brazil.

Study Areas	Animals	n° samples/ IFA Titers against <i>R. parkeri</i>					
		64	128	256	512	1024	2048
Area 1	Dog	1	4	0	6	3	1
	Horse	4	0	0	0	0	0
	Human	8	3	2	0	1	0
Area 2	Dog	0	4	1	3	0	2
	Horse	0	1	0	0	0	0
	Human	2	3	1	0	0	0

Table 5 – Variables statistically significant using *R. rickettsii* and *R. parkeri* as antigen, in Alvorada do Sul (Area 1), North Paraná state, Brazil.

Antigen	samples	Variables	Option	Positives/ Total (%)	p value	OR (IC95%)
	Dog	-	-	-	-	-
<i>R. rickettsii</i>	Horse	Tick control	Sim	3/10	0,022*	0,06 (0,00–1,02)
			Não	7/8		
	Human	Positive horse	Sim	8/16	0,011*	4,54 (1,24–16,92)
			Não	13/72		
<i>R. parkeri</i>	Dog	Presence of tick	Sim	15/65	0,017	-
			Não	0/18		
	Horse	Tick control	Sim	0/10	0,022*	-
			Não	4/8		
	Human	-	-	-	-	-

* Fisher exact

* Fisher Exact

Table 6 – Variable statistically significant using *R. rickettsii* and *R. parkeri* as antigen, in Arapongas (Area 2), North Paraná state, Brazil.

Antigen	samples	Variables	Option	Positives/ Total (%)	p value	OR (IC95%)
	Dog	Ciliary Forest contact	Sim	8/41	0,025	6,0 (1,10 – 32,81)
			Não	4/49		
<i>R. rickettsii</i>	Horse	-	-	-	-	-
	Human	-	-	-	-	-
<i>R. parkeri</i>	Dog	Ciliary forest localization	< 100 m	4/10	0,012*	8,11 (1,40 – 48,30)
			> 100 m	6/80		
	Horse	-	-	-	-	-
	Human	-	-	-	-	-

*Fisher Exact

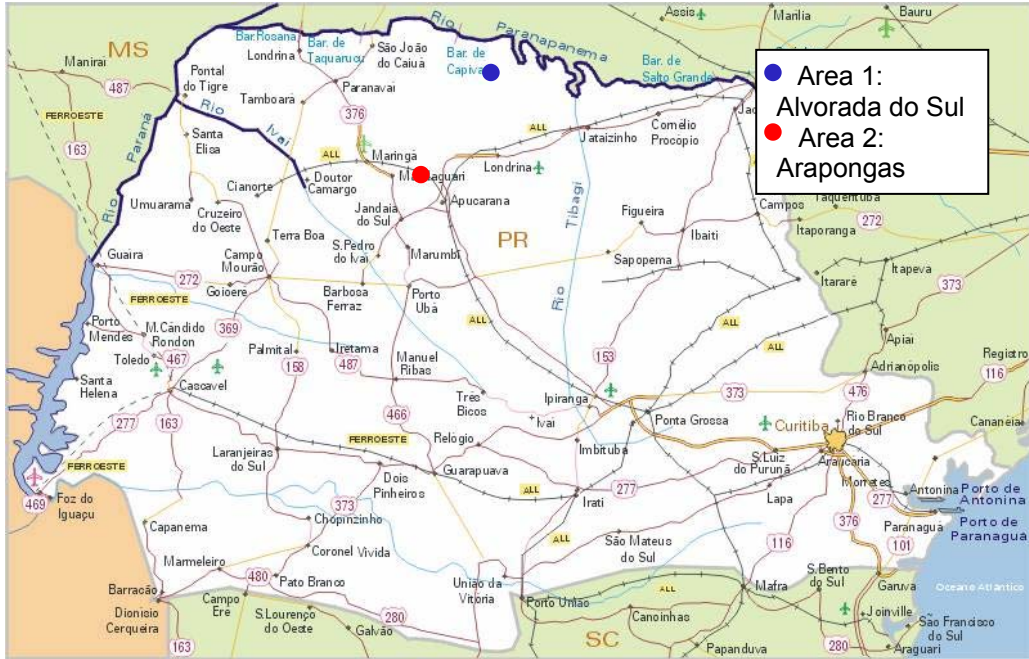


Figure 1 – map of the localization of the two studied areas.

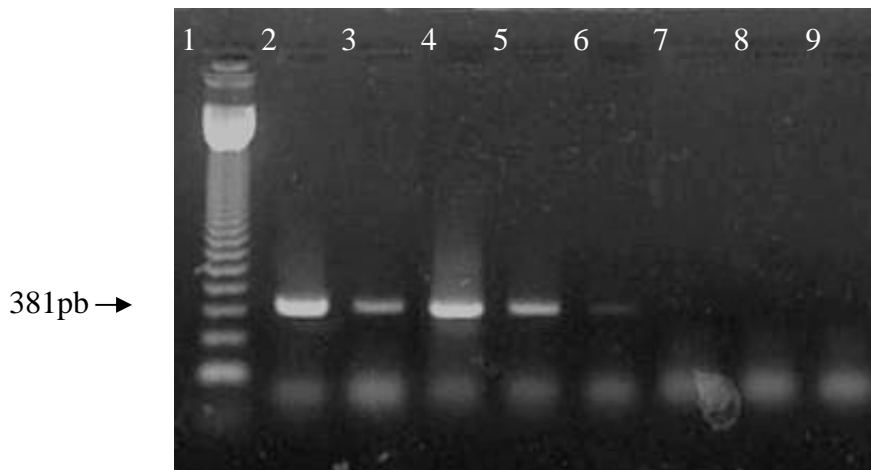


Figure 2 – Detection of PCR product amplified with *gltA* gene showed in 1.5% agarosis gel realized in *Amblyomma ovale* extracted. Lane 1 (1) 123-bp DNA size marker ladder; (2) Positive control; (3, 4, 5, 6) positive samples extracted from *A. ovale*; (7) negative sample; (8) nucleic acid extraction negative control and (9) PCR negative control.

REFERENCES

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Arquivos casos maculosa 1997- 2006, Brasília, 2007.

DUMLER J. S., BARBET A. F., BEKKER C. P., DASCH G. A., PALMER G. H., RAY S.C., RIKIHISA Y., RURANGIRWA F.R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.51, p.2145-65, 2001.

FENG H. M.; WALKER D. H. Cross-protection between distantly related spotted fever group rickettsiae. **Vaccine**, 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, 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.

GALVAO M. A., CARDOSO L.D., MAFRA C.L., CALIC S.B., WALKER D. H. Revisiting brazilian spotted fever focus of Caratinga, Minas Gerais State, Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.1078, p.255-256, 2006.

HOOGSTRAAL, H. Argasid and Nuttalliellid ticks as parasites and vectors. **Advances in Parasitology**, v. 1, n. 24, p. 135-238, 1985.

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 state of São Paulo, Brazil: Serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another Spotted Fever Group Rickettsia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.71, n.1, p. 93–97, 2004.

HORTA, M. C., LABRUNA, M. B., PINTER, A., LINARDI, P. M., SCHUMMAKER, 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., WHITWORTH, T., BOUYER, D. H., MCBRIDE, J. W., CAMARGO, L. M. A., CAMARGO, E.P., POPOV, V., WALKER, D.H. *Rickettsia belli* and *Rickettsia amblyommi* in *Amblyomma* ticks from the state of Rondonia, Western Amazon, Brazil. **Journal Medical of Entomology**. v.41, n.6, p.1073-1081, 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**. v.42, p.90-98, 2004b.

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

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. **Microbial Ecology**. v.54, p.126-133, 2007a.

LABRUNA, M. B.; PACHECO, R. C.; RICHTZENHAIN, L. J.; SZABO, M. P. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* from ticks *Haemaphysalis juxtakochi* in

the state of São Paulo, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.869-873, 2007b.

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 Zoonotic Disease**, v.7, p.249-255, 2007c.

LEMOS, E. R. S., MACHADO, R. D., COURA, J. R. Rocky Mountain Fever in an endemic area in Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 4, p. 479-501, 1994.

LEMOS, E. R. S., MACHADO, R. D., COURA, J. R., GUIMARÃES, M. A. A., FREIRE, N. M. S., AMORIM, M., GAZETA, G. S., Epidemiological aspects of the Brazilian spotted fever: seasonal activity of ticks collected in an endemic area in São Paulo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.30, n.3, p.181-185, 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 a endemic area in the state of São Paulo. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.65, n.4, p.329-334, 2001.

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

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

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

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.; FILHO, J. M.; 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. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n.2, p. 247-252, 2008.

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

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.

SAITO T., CUNHA F. N., PACHECO R. C., FERREIRA F., PAPPEN F., FARIAS N., LARSSON C., LABRUNA M. B. Canine infection by rickettsiae in southern Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.79, n.1, p.102-108, 2008.

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

SANGIONI L. A. **Aspectos epidemiológicos da febre maculosa brasileira no município de Cerro Largo – Rio Grande do Sul**. In: XVCONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, II SEMINARIO DE PARASITOLOGIA VETERINARIA DOS PAISES DO MERCOSUL. 2008, Curitiba, **palestras**.

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.

TOLEDO R. S. **Aspectos epidemiológicos de rickettsias do grupo da febre maculosa em humanos, cães, equinos e carrapatos em Londrina, PR. 2008.** (Dissertação: Mestrado em Ciência Animal) – UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

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.

CAPÍTULO 2

Serosurvey of antibodies against Spotted Fever Group *Rickettsia* spp in horse farms in North Parana state, Brazil

Brazilian Spotted Fever (BSF) is an emergent disease caused by *Rickettsia* spp of Spotted Fever Group and the most important species involved is *Rickettsia rickettsii*. It is transmitted by *Amblyomma* ticks and *A. cajennense* is an important vector because humans are frequently bitten by this species. The objective of this study was to evaluate the prevalence of antibodies against BSF rickettsias in equines from six horse farms located in Londrina County. The study was attended by six owners of horse farms situated in Cambé, Santa Fé, Guaraci and Londrina municipalities. All the farms are located in areas considered silent area for BSF and a total of 273 horses were sampled. The sera were submitted to the Indirect Immunofluorescence Assay (IFA) with *R. Rickettsii* and *R. parkeri* as antigen, considering as positive, reaction with titers ≥ 64 . From a total of 273 sera, 15 (5.5%) sera reacted against *R. rickettsii* and 5 (1.8%) to *R. parkeri*. It was found seropositive animals in five of six farms studied and the rate of seropositivity varied from 0% to 13%, except for one farm where all horses were negative. The titers varied from 64 to 518, with final titer being detected in four samples. Nine of all positive animals reacted to *R. rickettsii* four-fold higher than *R. parkeri* which indicates the circulation of *Rickettsia* spp homologue to *R. rickettsii* in these horse farms studied. This study suggests the presence of some rickettsia very close to *R. rickettsii* infecting horses in Northern Parana state, Brazil.

Keywords: Brazilian Spotted fever. *Amblyomma* spp. *Rickettsia* spp. Horse farms.

INTRODUCTION

The genus *Rickettsia* is an obligatory intracellular bacterium, responsible for causing zoonotic diseases in many parts of the world. This genus is classified in three groups: the Ancestral Group, Typhus Group (TG) and the Spotted Fever group (SFG). The last group is composed of several rickettsia species, but just few of them are considered pathogenic for humans, and most of these *Rickettsia* are transmitted by ticks (RAOULT; ROUX, 1997; RAOULT et al., 2002).

In Brazil this disease is named Brazilian Spotted Fever (BSF) and the most important species responsible to cause this disease in human beings is *R. rickettsii*. Recently *R. parkeri* has been reported infecting *A. triste* in Brazil and there are many studies showing serological evidence of this *Rickettsia* species in dogs (HORTA et al., 2004; SILVEIRA et al., 2007; LABRUNA et al., 2007). The *R. bellii* is frequently reported in Brazil, but the pathogenicity is still unknown (LABRUNA et al., 2007b).

The first case of BSF occurred in 1929 in São Paulo State (DIAS; MARTINS, 1939) and nowadays this BSF has been reported in many other states such as Minas Gerais, Rio de Janeiro, Santa Catarina, Rio Grande do Sul and in Parana (MADEIRA; WIEBRICH, 2004, Ministerio da Saúde, 2007). BSF is an acute tick-borne disease and the clinical signs caused by *R. rickettsii* are fever, headache, myalgia, nausea and rash.

Indirect Immunofluorescence Assay (IFA) is the currently test choice for diagnosing rickettsiosis in human and animals. The problem of this serological diagnosis is the cross-reactivity among different rickettsias species. The geographic origin of the infection is important to identify the species of rickettsia. It is possible to know the probable species of rickettsia by IFI comparing titers among different antigens, because homologous antibodies titers are higher than heterologous

antibodies titers (LASCOLA; RAOULT, 1997; HORTA et al., 2004; PACHECO et al., 2007).

These *Rickettsia* spp are transmitted by ticks of *Amblyomma* genus and the most important specie responsible to transmit BSF is *A. cajennense*, which is frequently related to have bitten humans (MOREIRA; MAGALHÃES, 1935). However, nowadays there is the *A. aureolatum* that has been studied, another important tick responsible to transmit BSF in São Paulo and Rio de Janeiro states of Brazil (PINTER; LABRUNA, 2006). Horses are primary hosts for all parasitic stages of *A. cajennense* and in many studies it is shown that horses are excellent sentinels for BSF (SANGIONI et al., 2005; HORTA et al., 2007; PINTER et al., 2008).

The objective of this study was to obtain epidemiological information about rickettsias of the SFG in horse farms located in the northern of Paraná state by sampling horses by IFA using as antigens *R. rickettsii* and *R. parkeri*.

MATERIAL AND METHODS

Study Areas

This study was carried out in six horse farms, located in Londrina County, a region considered silent area for BSF. The number of samples collected in each farm was: 50 in Cambé (23° 16' 35" S 51° 36' 20" W), 44 in Santa Fé (23° 01' 58" S 51° 49' 51" W), 25 in Guaraci (22° 58' 12" S 51° 39' 20" W), 35 in Londrina 1 (23° 18' 39" S 51° 09' 53" W), 34 in Londrina 2 (23° 18' 39" S 51° 09' 53" W), and 85 in Londrina 3 (23° 27' 26" S 50° 59' 58" W). Only Londrina 1 is located in an urban area of the city. This area is an equitation school where the horses were kept on stables and without contact with pastures. All of the others farms were located in a rural area and the animals were kept in pastures and some of the horses had contact with forest area.

Samples

A total of 273 horse blood samples were collected and the sera samples were separated by spinning and then stored at -20°C, until be used. This project was previously approved by Ethic Committee of Animal Experimental of Universidade Estadual de Londrina (N° 82/2006). The ticks were collected from horses and maintained in absolute alcohol. The identification of tick species followed Aragão & Fonseca, (1961) and Guimarães et al. (2001).

Indirect Immunofluorescence Assay (IFA)

The IFA was performed according to Horta et al. (2004). The sera samples were submitted to IFA twice using *R. Rickettsii* and *R. parkeri* antigens. To prepare the IFA glass, each *Rickettsia* strain was cultivated in Vero cells until they reached a total of 100% of infected cells.

The horse sera was diluted with PBS starting from 1:64 dilution and afterwards it was added to the glass and incubated at 37C° for 30 min in a humid chamber. The glasses were washed twice in PBS for 15 min and reacted with fluorescein isothiocyanate labeled goat anti-horse IgG (Sigma-Aldrich) for 30 min and washed two times. The slides were read using microscope epifluorescent (Olympus, Japan) at 400x magnification and only titers ≥ 64 were considered positive.

Statistic analysis

In this study, an epidemiological questionnaire was conducted to know relevant information like as age of the animals, sex, race, presence of ticks and the presence of forest in the propriety. To analyze the significance of the variables it was used Qui-Square Test or Exact the Fisher. These calculations were done with Epiinfo6 program (CDC/Atlanta).

RESULTS

The Table 1 summarizes the serological results of the IFA for the six studied horse farms. From a total of 273 sera, 15 (5.5%) reacted against *R. rickettsii* and 5 (1.8%) to *R. parkeri*. The samples that reacted against *R. rickettsii* antigen were: 6 (12%) in Cambé, 1 (2.3%) in Santa Fé, 1 (1.4%) in Guaraci, 0% in Londrina 1, 4 (11.8%) in Londrina 2, and 3 (3.5%) in Londrina 3. When the samples were submitted to *R. parkeri* antigen, 2 (5.9 %) in Londrina 2 and 3 (3.5%) in Londrina 3 were positives.

The titers found among the seropositives varied from 64 to 512 and among 15 positive sera, 11 presented titers to *R. rickettsii* at least four-fold higher than to *R. parkeri* antigen. These sera were considered homologue with *R. rickettsii* or very closely related genotype (Table 2).

In this study were detected two different ticks on the horses during the sampling, which were identified as *A. cajennense* and *Anocentor nitens*.

From variables studied the presence of ciliary forest ($p=0.029$) and wild animals ($p=0.029$) in these horse farms were considerate statistically significant. Only animals more than one year of age were positive for *R. rickettsii*. There were no differences of seropositivity between sexes and race, of the animals. The presence of ticks was found in only 2.9% of the horses studied.

DICUSSION

Among six horse farms studied, five showed seropositive horses, with rates of seropositivity varying from 2.3% to 12.0%, except in the propriety Londrina 1, where there were no positive animals. This situation could be explained because this propriety is situated in an urban area in the Londrina city, where the horses are kept all the time stabled and used for practicing of sports or for hobby and having no chances for tick infestations. Even though in the other horse farms located in rural areas with seropositive animals, where the horses were living in contact with grass, only in 2,9% of these animals were found *A. cajennense*.

The percentage of positives found in this work is in agreement with others papers described in nonendemic regions, like as described by Horta et al 2007, that the seropositivity was 19%, and according to Lemos et al., (1996) of 27.3% of seropositivity in horses. Other study in nonendemic area was negatives to IFA (SANGIONI et al., 2005). According to Freitas (2007), the seropositivity of horses, in an urban area of São José dos Pinhais – PR, was 9.33%. Another study with labor horses in an urban area of Londrina city, Paraná state, the seroprevalence was 38.50% (TOLEDO, 2008).

Horses are primary hosts for all parasitic stages of *A. cajennense*, but in situations in which there is presence of a massive number of *A. cajennense* infesting horses, these ticks will consequently parasite secondary hosts such as dogs or humans (LABRUNA et al., 2001, 2002; HORTA et al., 2007).

In our study was found only a few number of *A. cajennense* on the horses and it was detected low percentage of seropositivity in these animals. Consequently the probability of *rickettsia* infection in humans transmitted by *A. cajennense* in these studied areas is remote, because of the lowest exposure of humans to these ticks,

and due to the fact that until the moment there were no cases of humans infected in the studied area.

Sangioni et al. (2005) recommended surveys of horse sera as a useful method of BSF surveillance in areas where humans are exposed to *A. cajennense* ticks. However, the low percentage of seropositivity, these horses can not be used as sentinel animals, because of the low exposure of the horses with *Amblyomma* spp ticks and consequently lower risk to humans and other animals that are living in these areas.

The titers found in this study varied from 64 to 518 and the titer 518 reacted in only four samples. Nine of all positive animals reacted to *R. rickettsii* four-folds higher than *R. parkeri* antigen that indicates circulation of *Rickettsia* spp homologue to *R. rickettsii* in these studied populations.

A. cajennense is the main responsible for the serologic reactivity of horses and humans to *R. rickettsii* antigen (HORTA et al., 2004). Our results are in agreement with this affirmative, indicating the presence of *Rickettsia* spp homologue to *R. rickettsii*.

IFI is the gold standard test to diagnose infection in humans and animals (LASCOLA; RAOULT, 1997). However, cross-reactive antibodies among *Rickettsia* species are common and the identification of *Rickettsia* species that is affecting the infection of BSF is difficult (HORTA et al., 2004; LABRUNA et al., 2004; PACHECCO, 2007).

This study showed important evidences of *Rickettsia* spp circulation in Northern of Paraná state, by the fact that it can prevent BSF future infection in humans that are exposed to ticks and it is important to continue these epidemiological studies in Parana state.

Table 1 – Percentage of seropositive horses by Indirect Immunofluorescence Assay (IFA) with two different antigens in six horse farms from north regions of Parana state, Brazil.

Farms studied	IFA positive reaction/total collected (%) in two different	
	Antigens	
	<i>R. rickettsii</i>	<i>R. parkeri</i>
Cambé	6/50 (12)	0/50 (0)
Santa Fé	1/44 (2.3)	0/44 (0)
Guaraci	1/25 (4)	0/25 (0)
Londrina 1	0/35 (0)	0/35 (0)
Londrina 2	4/34 (11.8)	2/34 (5.9)
Londrina 3	3/85 (3.5)	3/85 (3.5)
Total	15/273 (5.5)	5/273 (1.8)

Table 2 – Antibody titers by Indirect Immunofluorescence Assay (IFA) for two different *Rickettsia* spp in horses from six farms from north of Parana state, Brazil.

Sera	Area	IFA titers		Probably reaction of homologue antigen
		<i>R. rickettsii</i>	<i>R. parkeri</i>	
H2	Cambé	518	NR	<i>R. rickettsii</i>
H7	Cambé	64	NR	-
H16	Cambé	518	NR	<i>R. rickettsii</i>
H25	Cambé	256	NR	<i>R. rickettsii</i>
H37	Cambé	256	NR	<i>R. rickettsii</i>
H42	Cambé	256	NR	<i>R. rickettsii</i>
H109	Guaraci	64	NR	-
H112	Londrina 2	128	64	-
H117	Londrina 2	128	NR	<i>R. rickettsii</i>
H138	Londrina 2	512	256	-
H144	Londrina 2	128	NR	<i>R. rickettsii</i>
H191	Londrina 3	64	64	-
H207	Londrina 3	64	64	-
H226	Londrina 3	256	64	<i>R. rickettsii</i>
H184	Santa Fé	128	NR	<i>R. rickettsii</i>

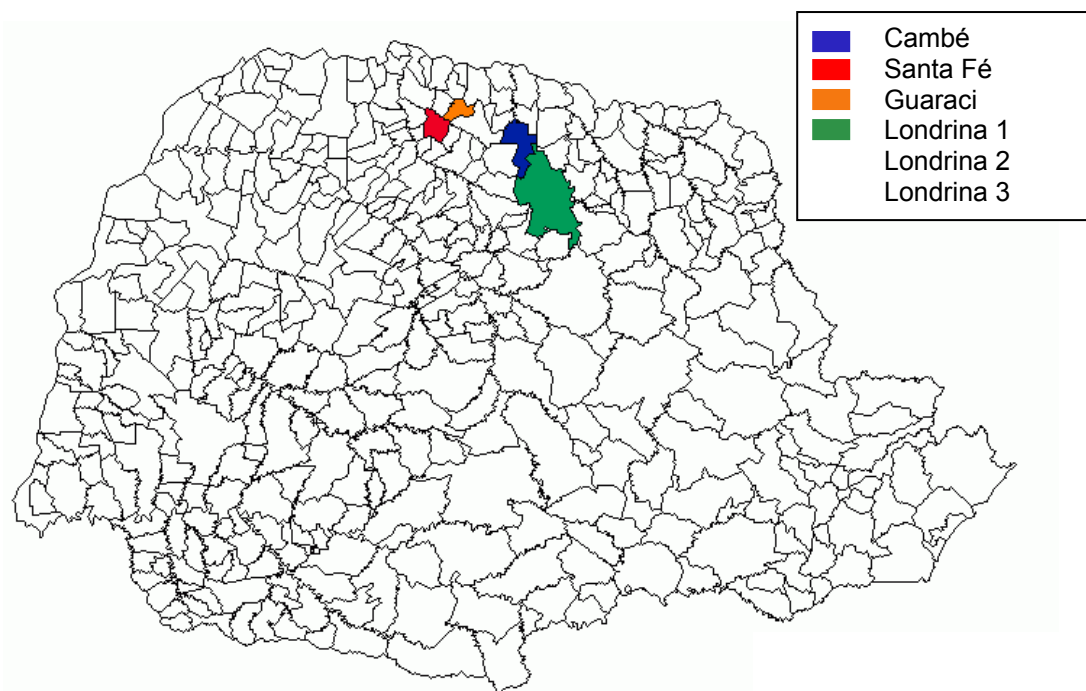


Figure 1 – Map showing the localization of the horse farms studied.

REFERENCES

- DIAS, E., MARTINS, A. V. Spotted fever in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine**, v.19, p.103-108, 1939.
- 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.
- HORTA M. C., LABRUNA M. B., SANGIONI L. A., VIANNA M. C. B., GENNARI M. S., GALVAO M. A. M., et al. 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: serological evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group rickettsia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.71, p.93–97, 2004.
- HORTA, M. C., LABRUNA, M. B., PINTER, A., LINARDI, P. M., SCHUMMAKER, 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., KASAI 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.65–72, 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 Zoonotic Disease**, v.7, p.249-255, 2007.

LASCOLA B.; RAOULT D. Laboratory diagnosis of Rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new *Rickettsial* diseases. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.2715-2727, 1997.

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 area in the state of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 38, n.6, p. 427-430, 1996.

MADEIRA, A., WEISBRICH, J. Surto de Febre Maculosa no estado de Santa Catarina. CONGRESSO BRAISILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINARIA, SIMPOSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 2003, Ouro Preto, **Anais**, p. 364.

MOREIRA, J. A.; MAGALHÃES, O. Thypho exanthematico em Minas Gerais. **Brasil Médico**, v. 44, p. 465-470, 1935.

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

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.; FILHO, J. M.; 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. **Caderno de Saúde publica**, v. 24, n.2, p. 247-252, 2008.

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.

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

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

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.

TOLEDO R. S. **Aspectos epidemiológicos de rickettsias do grupo da febre maculosa em humanos, cães, equinos e carrapatos em Londrina, PR. 2008.** (Dissertação: Mestrado em Ciência Animal) – UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

CONCLUSÕES

- Há evidências sorológicas da presença de *R. rickettsii* e de *R. parkeri* nas regiões estudadas, embora tenha sido detectado apenas *R. bellii* infectando carrapatos da espécie *A. ovale*;
- A presença de anticorpos homólogos a *R. rickettsii* encontrado em soros de humanos sugerem uma possível ocorrência de casos silenciosos FMB na região de Londrina;
- O maior número de animais, bem como, o contato mais direto dos animais e seres humanos com carrapatos no assentamento de Alvorada do Sul deve ser a explicação para a soroprevalência de anticorpos mais elevada encontrada neste local em relação aos demais locais estudados;
- Os resultados da sorologia dos equinos em Alvorada do Sul reforçam a hipótese destes animais serem utilizados como sentinelas para FMB;
- As espécies de carrapatos encontrados nos dois estudos foram: *A. cajennense*, *A. ovale* e *R. sanguineus* parasitando cães e *A. cajennense* e *Anocentor nitens* em eqüinos.

ANEXOS

ANEXO 1 –

**COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

OF. CIRC. CEEA Nº 82/2006

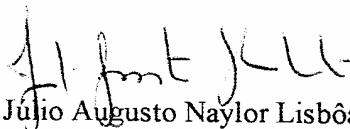
Londrina, 14 de novembro de 2006.

Prezado Pesquisador

O CEEA/UEL, reunido aos 14 de novembro do ano corrente, avaliou o projeto de pesquisa intitulado “**Epidemiologia de patógenos das famílias Rickettsiaceae, Anaplasmataceae e Babesidae em carrapatos da família Ixodidae e avaliação soroepidemiológica em animais no Estado do Paraná**”, registrado no CEEA sob o nº 49/06, projeto de Tese junto ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal do CCA, desenvolvido sob sua responsabilidade e orientação, julgando-o *aprovado* para execução por entender que os princípios éticos postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal estão respeitados.

Sem mais para o momento, subscrevo-me.

Cordialmente,



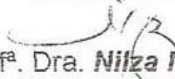
Prof. Dr. Julio Augusto Naylor Lisboa
Coordenador do CEEA/UEL

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

ANEXO 2 –



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
 Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná
 Registro CONEP 268

Parecer Nº 0124/07 CAAE Nº 0065.G.268.000-07 FOLHA DE ROSTO Nº 12999	Londrina, 06 de julho de 2007.
PESQUISADOR: ODILO VIDOTTO	
<p>Ilmo Sr,</p> <p>O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná" (Registro CONEP 268) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e complementares, avaliou e aprovou as respostas, datada de 02 de julho, ao parecer 124/07 de 10 de maio de 2007 referente ao projeto:</p> <p>"EPIDEMIOLOGIA DE PATÓGENOS DAS FAMÍLIAS RICKETTISIACEAE, ANAPLASMATACEAE E BABESIDAE EM CARAPATOS DA FAMÍLIA IXODIDAE E AVALIAÇÃO SOROEPIDEMIOLÓGICA EM ANIMAIS NO ESTADO DO PARANÁ".</p> <p>Segue em anexo o parecer consubstanciado e análise das respostas.</p> <p>Informamos que o Sr. deverá apresentar ao CEP/UEL relatório final da pesquisa, bem como comunicar, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da mesma.</p>	
Situação do Projeto: APROVADO	
<p>Atenciosamente,</p> <p> Prof.ª Dra. Nilza Maria Diniz Coordenadora Comitê de Ética em Pesquisa-CEP/UEL</p>	

ANEXO 3 –

PROJETO ASSENTAMENTO

Laboratório de Protozoologia – DMVP/CCA – UEL

QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

Propriedade nº: _____ Data: / /

Entrevistado Nome: _____

Função: _____

Proprietário: _____ Fone: _____

1. Há quanto tempo mora no assentamento atual? _____
2. Já morou fora do Assentamento? () sim, () não. Onde? _____
3. Qual o tipo de trabalho realizado no assentamento? () doméstico, () com lavoura, () com animais () outros: _____
4. Visita área de mata/mata ciliar? () sim, () não.
5. Frequência: () todos os dias, () 1x semana, () 1x mês, () 1x ano
6. Presença de carrapato? () sim, () não.
7. Época do ano que aparecem:
() primavera () Verão () Outono () Inverno () Ano todo
8. Onde pegou carrapato? () Mata () Pasto () Outros

Pre

sença de bosques/reserva/mata ciliar próximo à residência? () até 100m, () >100 a 500m.

PROJETO ASSENTAMENTO

Laboratório de Protozoologia – DMVP/CCA – UEL

QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

Propriedade nº: _____ Data: / /
 Entrevistado Nome: _____
 Função: _____
 Proprietário: _____ Fone: _____

Questionário individual de Cães

1. Nome e nº do canino							
2. Idade e sexo do animal							
3. Há quanto tempo o cão mora no local?							
4. O cão tem pelo longo ou curto?							
5. O cão visita área de mata/mata ciliar?							
6. O cão tem o hábito de caçar?							
7. O cão acompanha nas atividades diárias como lida com o gado, lavoura ou pescaria?							
12. Presença de carrapato?							
13. Época que observa os carrapatos nos animais							
14. Controle de carrapatos? Qual produto?							
15. Frequência do controle de carrapatos							

Questionário individual de Equinos

1. Nome e nº do equino							
2. Idade e Sexo do Animal							
3. Há quanto tempo o equino mora no local?							
4. O Equino vai área de mata/mata ciliar?							
12. Presença de Carrapato?							
13. Época em que observa os carrapatos nos animais							
14. Controle de carrapatos? Qual produto?							
15. Frequência do controle de carrapatos							

ANEXO 4 –

INVESTIGAÇÃO DE DOENÇAS TRANSMITIDAS PELO CARRAPATO
LABORATÓRIO DE PROTOZOOLOGIA - DMVP/UEL
QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

Propriedade nº: _____ Data: / /

Entrevistado Nome: _____

Função: _____

Proprietário: _____ Fone: _____

1. Atividades desenvolvidas:

(1) Agricultura (2) Pecuária (3) outros: _____

2. População nas proximidades: (1) Sim (2) Não

3. Local de criação do animal:

(1) Pasto (2) Estábulo (3) Outro: _____

4. Presença de outros animais:

(1) Cão (2) Gato (3) Bovinos (4) Roedores (5) Animais silvestres

5. Quais animais silvestres observados: _____

6. Presença de pasto: (1) Sim (2) Não

7. Presença de mata próxima: (1) Sim (2) Não

8. Presença de carrapatos: (1) Sim (2) Não

9. Época que aparecem:

(1) primavera (2) verão (3) Outono (4) Inverno (5) Ano todo

10. Carrapatos fixos a pele humana: (1) Sim (2) Não

11. Controle de carrapatos: (1) Sim (2) Não

Questionário individual de Equinos

1. Nome: _____

2. Idade:

(1) menos 1 ano (2) 1-5 anos (3) 6-10 anos (4) acima de 10 anos

3. Sexo: (1) Macho (2) Fêmea

4. Raça: _____

5. Presença de carrapato: (1) Sim (2) Não

ANEXO 5 –**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 6 –

Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), 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.