



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - FACULDADE DE AGRONOMIA E

MEDICINA VETERINÁRIA

**DETECÇÃO SOROLÓGICA DE RIQUÉTSIAS DO  
GRUPO DA FEBRE MACULOSA E  
LEVANTAMENTO ACAROLÓGICO EM EQUINOS  
NO DISTRITO FEDERAL, BRASIL**

GUSTAVO PEREIRA MARTINS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA/DF

FEVEREIRO/2014



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - FACULDADE DE AGRONOMIA E

MEDICINA VETERINÁRIA

**DETECÇÃO SOROLÓGICA DE RIQUÉTSIAS DO  
GRUPO DA FEBRE MACULOSA E  
LEVANTAMENTO ACAROLÓGICO EM EQUINOS  
NO DISTRITO FEDERAL, BRASIL**

**GUSTAVO PEREIRA MARTINS**

Orientadora: Simone Perecmanis

Co-Orientador: Gilberto Salles Gazêta

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
EM SAÚDE ANIMAL**

**PUBLICAÇÃO: 094 / 2014**

**BRASÍLIA/DF**

**FEVEREIRO/2014**

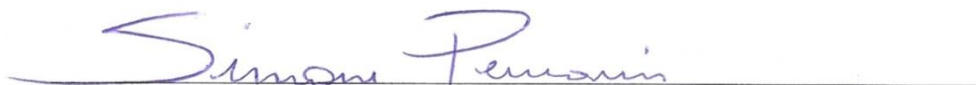
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

DETECÇÃO SOROLÓGICA DE RIQUÉTSIAS DO GRUPO DA FEBRE  
MACULOSA E LEVANTAMENTO ACAROLÓGICO EM EQUINOS NO  
DISTRITO FEDERAL, BRASIL

GUSTAVO PEREIRA MARTINS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL, COMO PARTE DOS  
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE  
MESTRE EM SAÚDE ANIMAL

APROVADO POR:



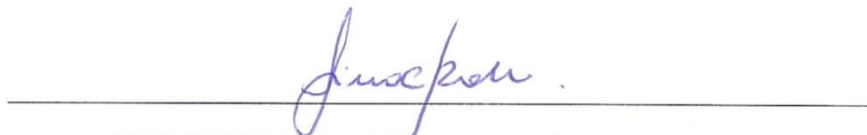
SIMONE PERECMANIS (ORIENTADORA)

Professora Doutora da Universidade de Brasília (UnB)



GIANE REGINA PALUDO (EXAMINADORA INTERNA)

Professora Doutora da Universidade de Brasília (UnB)



GINO CHAVES DA ROCHA (EXAMINADOR EXTERNO)

Professor Doutor da Universidade de Brasília (UnB)

Brasília, 28 de Fevereiro de 2014.

MARTINS, G.P. **DETECÇÃO SOROLÓGICA DE RIQUÉTSIAS DO GRUPO DA FEBRE MACULOSA E LEVANTAMENTO ACAROLÓGICO EM EQUINOS**DISTRITO FEDERAL, BRASIL. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2014, 41p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

#### FICHA CATALOGRÁFICA

Martins, Gustavo Pereira

Detecção sorológica de riquetsias do grupo da febre maculosa e levantamento acarológico em equinos no Distrito Federal, Brasília. Gustavo Pereira Martins.

Orientação de Simone Peregmanis – Brasília, 2014. 41 p.: il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2014.

1. Riquetsias 2. Febre Maculosa Brasileira 3. Carrapatos

CDD ou CDU

Agris/FAO

## AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a minha família por minha formação como pessoa, em caráter antes de veterinário, Adélio, Marilúcia e Thaís Helena. O conhecimento sem personalidade e ética é mal direcionado, trabalho sem fundação sólida não possui futuro.

Aos meus mentores iniciais nos estudos de Febre Maculosa, Simone Perecmanis e Gino Chaves da Rocha por toda a orientação em microbiologia, doenças parasitárias, acarologia e epidemiologia na UnB, Laurício da Cruz por abrir as portas e orientar-me em saúde pública e vigilância ambiental na DIVAL, fornecer imenso apoio no meu primeiro estudo de Febre Maculosa e a disposição em ajudar nos estudos e projetos seguintes.

A Gilberto Salles Gazêta, Erick e Nicolau Maués Serra-Freire pela instrução no Curso de Capacitação em Vigilância Ambiental para Febre Maculosa, a visita e intercâmbio de conhecimentos entre FIOCRUZ e UnB durante 3 anos e dois estudos.

A Lucílio Ribeiro, Pablo, todos os tratadores e funcionários da segurança da Gerência de Apreensão de Animais da SEAGRI por permitirem e ajudarem ao longo de um ano no trabalho com equinos, em uma rotina tranquila e com troca de conhecimentos. Aos equinos da SEAGRI por serem essenciais a esse estudo, e por em grande maioria terem um temperamento dócil e as vezes criarem situações inusitadas que são excelentes lembranças.

A Ana Íris, Gabriela Cristina de Castro Silva e Ivanir Martins do Nascimento por uma excelente experiência aprendendo a técnica de Imunofluorescência Indireta no Laboratório de Riquetsioses e Hantavirose na FUNED, Belo Horizonte.

A Giane Paludo, Wanessa Carlos, Filipe Carneiro, Simone Passarinho, Maurício Gomes, Maia Araújo, Marcela Scalon por me receberem na Patologia Clínica UnB.

E a Stela Sampaio Silva e Igor de Oliveira Poty pelo apoio nas longas noites de estudo e diversão que tornaram a experiência do Mestrado educativa, inspirada, equilibrada e sã.

## Conteúdo

Lista de Abreviações .....	7
Lista de Figuras .....	8
Resumo.....	9
Abstract .....	9
Introdução .....	10
Revisão de Literatura .....	11
Riquetsias .....	11
Patogênese.....	12
A Febre Maculosa .....	12
Vetores artrópodes e os efeitos da antropização do ambiente.....	14
Equinos e suas utilizações no Distrito Federal.....	16
Objetivos .....	17
Referências Bibliográficas .....	18
Capítulo 1: Detecção sorológica da circulação de <i>Rickettsia</i> em equinos de Brasília, Distrito Federal.....	21
Resumo.....	21
Abstract .....	21
Introdução .....	21
Material e Métodos .....	23
Coleta das amostras .....	23
Coleta de sangue.....	24
Coleta de ácaros .....	24
Identificação de ectoparasitos .....	25
Reação de Imunofluorescência Indireta .....	25
Resultados .....	27
Discussão.....	29
Conclusão.....	32
Referências Bibliográficas .....	33
Anexos.....	35
Anexo I: POP Coleta de artrópodes a campo .....	35
Anexo II: POP Reação de Imunofluorescência Indireta.....	38

## **Lista de Abreviações**

DF – Distrito Federal

DIVAL - Diretoria de Vigilância Ambiental

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro

FMB – Febre Maculosa Brasileira

FUNED – Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte

GA – Grupo Ancestral

GFM – Grupo da Febre Maculosa

GT – Grupo do Tifo

GTr – Grupo de Transição

OmpA – gene que codifica proteína externa da membrana

OmpB – gene que codifica proteína externa da membrana

pb – pares de base

PBS – tampão fosfato salino

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RIFI – Imunofluorescência Indireta

SEAGRI – Secretaria de Agricultura e Abastecimento

UnB – Universidade de Brasília

## **Lista de Figuras**

	Página
Figura 1: Riquetsias de importância veterinária	11
Tabela 1: Grupos das Riquetsias e espécies representantes dos grupos	12
Figura 2: localização GAA-SEAGRI	23
Figura 3: laboratório de Riquetsioses e Hantavirose FUNED	26
Figura 4: lâmina de microscopia Imunofluorescência indireta	27
Tabela 2: Distribuição das amostras positivas por pluviosidade relativa	27
Tabela 3: Gêneros de carrapatos por período de pluviosidade relativa	28



## **Resumo**

A febre maculosa brasileira (FMB) é uma zoonose causada pela bactéria *Rickettsia rickettsii* e transmitida a humanos por carrapatos. Procurou-se detectar a presença do principal agente etiológico da FMB circulando em equinos apreendidos no Distrito Federal, Brasil. Durante um ano foram coletadas amostras de sangue e ectoparasitos de 122 equinos. Após teste por reação de imunofluorescência indireta (RIFI), para anticorpos IgG anti *R. rickettsii* 21 amostras foram positivas em titulações variáveis de 1:64 a 1:512. Dos 618 carrapatos coletados, 449 pertenciam ao gênero *Anocentor*, 113 ao *Boophilus* e 36 do gênero *Amblyomma*. Como conclusão foi possível identificar a circulação de *Rickettsia* em equinos no DF, Brasil.

Palavras-chave: 1. Riquetsias 2. Febre Maculosa Brasileira 3. Carrapatos

## **Abstract**

The Brazilian spotted fever (BSF) is a zoonosis caused by the bacteria *Rickettsia rickettsii* and transmitted to humans by ticks. In this study we tried to detect the BSF ethiological agent in horses apprehended by animal control in Distrito Federal, Brazil. Over one year the blood and ectoparasites were sampled on 122 horses. The samples were tested by indirect immunofluorescence antibody assay (IFA) for *R. rickettsii* anti-IgG antibody, 21 samples were positive for titer ranging from 1:64 to 1:512. Among the 618 ticks collected, 449 belonged to the *Anocentor* genus, 113 to *Boophilus* and 36 were *Amblyomma*. The bacteria were detected in horses in Distrito Federal.

Keywords: 1. Rickettsias 2. Brazilian spotted fever 3. Ticks

## Introdução

Riquetsias são patógenos importantes, causadores de doenças potencialmente fatais ou de patogenicidade desconhecida (PERLMAN, HUNTER, ZHORI-FEIN, 2006). Este patógeno apresenta um ciclo de transmissão mediado por carrapatos vetores, pertencentes à família Ixodidae, e insetos Siphonaptera (pulgas), capazes de promover sua disseminação entre diferentes espécies hospedeiras, como cães, equinos, capivaras e o homem, geralmente participando desses ciclos como hospedeiro acidental (GEHRKE, 2010). Atualmente o gênero *Rickettsia* encontra-se dividido em 4 grupos, de acordo com análises filogenéticas: o Grupo da Febre Maculosa (GFM), o Grupo do Tifo (GT), o Grupo de Transição (GTr) e o Grupo Ancestral (GA) (GILLESPIE et al., 2007).

As riquetsias têm distribuição mundial com presença confirmada em todos os continentes (MOURA, 2012). No Brasil, encontramos as espécies *Rickettsia rickettsii* (KRAWCZAK et al., 2014), *R. parkeri*, *R. typhi*, *R. amblyommii*, *R. rhipicephali*, *R. monteiroi* (LABRUNA et al., 2011), *R. felis*, *R. bellii* (LOPES, 2012), nas regiões sudeste, sul, nordeste e norte. No Centro-Oeste, mais especificamente no Distrito Federal, recentemente foi registrada a circulação de riquetsias pertencentes ao GFM em cães caracterizando ciclos enzoóticos da infecção (ROCHA et al., 2013). Dentre esses cães, muitos eram procedentes de carroceiros coletores de material de reciclagem que possuíam equinos como animais de tração.

Sendo o cavalo uma espécie sentinela para as riquetsias do GFM (MORAES-FILHO et al., 2009) esse estudo teve como objetivo detectar a circulação de riquetsias, empregando a técnica de Imunofluorescência Indireta em amostras de soro equino e realizar um estudo acarológico com o intuito de identificar as espécies de carrapatos prevalentes. Também pretende ser a base para futuros projetos de pesquisa que contribuam para a construção de um programa de vigilância ambiental de uma infecção/doença que pode vir a ser caracterizada como emergente no Distrito Federal.

## Revisão de Literatura

### Riquétsias

As riquétsias são Alfabroteobactérias intracelulares obrigatórias, da ordem *Rickettsiales*, família *Rickettsiaceae* (GARRITY; BELL; LILBURN, 2004), Gram negativas, cocobacilares, pleomórficas, imóveis e não formadoras de esporos, distribuídas mundialmente e que possuem uma ampla variedade de hospedeiros susceptíveis e vetores artrópodes como pode ser visto na figura 1 (adaptada de QUINN, 2005).

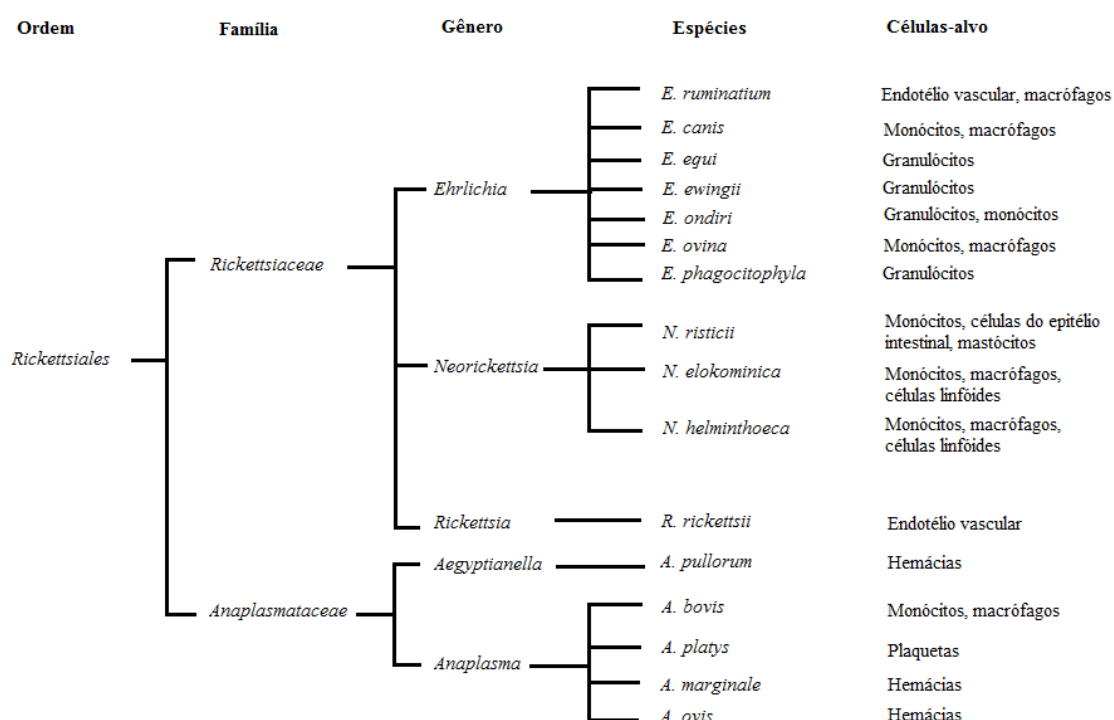


Figura 1 – Riquétsias de importância veterinária, adaptado de QUINN, 2005.

Dentre as classificações vigentes, o gênero *Rickettsia* encontra-se dividido em 4 grupos: Grupo da Febre Maculosa (GFM), Grupo do Tifo (GTr), Grupo de Transição e Grupo Ancestral (GA). A divisão em grupos é realizada empregando estimativa filogenética, comparando o conteúdo do plasmídeo conjugativo com genes cromossômicos (GILLESPIE et al., 2007). Exemplos de espécies pertencentes aos diferentes grupos podem ser visualizados na tabela 1.

<b>Grupo</b>	<b>Espécies</b>
<b>Grupo da Febre Maculosa</b>	<i>Rickettsia rickettsii</i> , <i>R. conorii</i> , <i>R. sibirica</i>
<b>Grupo do Tifo Epidêmico</b>	<i>Rickettsia prowazekii</i> , <i>R. typhi</i>
<b>Grupo Ancestral</b>	<i>Rickettsia bellii</i> , <i>R. canadensis</i>
<b>Grupo de Transição</b>	<i>Rickettsia felis</i> , <i>R. akari</i> , <i>R. australis</i>

Tabela 1: Grupos das Riquétsias e espécies representantes dos grupos de acordo com Gillespie, 2007; Sahni & Rydkina, 2009.

## **Patogênese**

As riquétsias por serem bactérias intracelulares obrigatórias apresentam mecanismos de invasão celular mediados por adesinas capazes de se ligarem a receptores celulares (SAHNI & RYDKINA, 2009). O microorganismo adere-se ao receptor Ku70 da célula por meio da adesina *OmpA* ou *OmpB*, recrutando a enzima ubiquitina ligase que liga-se ao receptor Ku70 conjuntamente com a proteína *RickA*, responsável pela polimerização da actina da célula, ativando o complexo Arp2/3 e iniciando a fagocitose da bactéria pela célula. No interior da célula, as riquétsias escapam do fagossomo, e sua consequente destruição, ao secretar a fosfolipase D e hemolisina C que rompem a membrana fagossomal (WALKER, 2007 e SAHNI & RYDKINA, 2009).

Após a invasão são observadas lesões celulares ocorridas por meio da produção de oxigênio reativo e aumento na permeabilidade microvascular, ocasionadas pela bactéria (WALKER, 2007 e SAHNI & RYDKINA, 2009). Clinicamente pode ser observada uma “vasculite riquetsial” que pode levar em casos severos a quadro neurológico de encefalite, insuficiência respiratória aguda, falência renal e raramente coagulação intravascular disseminada (SAHNI & RYDKINA, 2009).

## **A Febre Maculosa**

Inicialmente as riquetsioses foram denominadas coletivamente como tifo epidêmico, classificação que incluía doenças de origem não riquetsial, como por

exemplo, a febre tifoide. Posteriormente, as afecções foram reclassificadas em grupos após a identificação das espécies dos seus respectivos agentes etiológicos. Em 1909, foi pela primeira vez relatada a transmissão de riquetsias por piolhos em humanos, cujo agente etiológico foi identificado como *Rickettsia prowazekii* por Rocha-Lima em 1916 (KELLY, 2002). Na América os primeiros relatos de febre maculosa ocorrem na América do Norte sendo denominada inicialmente como febre maculosa das montanhas rochosas (KELLY, 2002).

Os primeiros relatos da febre maculosa brasileira surgiram no estado de São Paulo em 1929. Posteriormente foram relatados casos humanos nos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Piauí, Ceará e Rondônia (PINTER et al., 2011; LABRUNA et al., 2011).

A Febre Maculosa Brasileira (FMB), tem como principal agente patogênico a *Rickettsia rickettsii*, e os principais vetores são os carrapatos da família Ixodidae, que tem como reservatórios os pequenos mamíferos silvestres e carrapatos. Algumas espécies atuam como amplificadores no ciclo da *R. rickettsii*, como por exemplo o cão doméstico, a capivara e o equino, e o homem participando do ciclo como um hospedeiro acidental (MORAES-FILHO et al., 2009, KRAWCZAK et al., 2014).

Os sintomas mais relatados da Febre Maculosa Brasileira em humanos são: febre aguda, cefaléia e mialgia com presença ou não de exantema. Considerando-se os sintomas inespecíficos o Ministério da Saúde indica o diagnóstico diferencial para o agravo, o qual inclui leptospirose, dengue hemorrágica, hepatite viral, encefalite, febres hemorrágicas, pneumonia por *Mycoplasma pneumoniae*, malária, arbovirose e doenças com sintoma de exantema (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Dentre os animais domésticos susceptíveis a infecção por riquetsias, os equinos podem apresentar como sinais clínicos mais comuns a febre, letargia, petéquias e dor articular. Em cães os sinais clínicos são febre, hemorragia na retina, mialgia, dispneia, edema de extremidades, e em 80% dos animais afetados ocorrem sinais neurológicos tais como letargia, ataxia, rigidez no pescoço, nistagmo, convulsões (SANTIBÁÑES et al., 2013).

Inicialmente a FMB foi descrita em áreas rurais e silvestres e está adentrando às áreas periurbanas e urbana, sendo relatada em todas as regiões do país, com maior número de casos na região Sudeste (SILVA et al., 2009; FIOL et al., 2010). Foram diagnosticadas infecções em cães e equinos na região de focos de FMB (GEHRKE,

2010). Outra possível fonte de infecção é a presença de populações de carrapatos amplificadas por capivaras em parques urbanos (SOUZA et al., 2004). A *Rickettsia rickettsii* foi detectada no carrapato vermelho do cão, *Rhipicephalus sanguineus*, pela primeira vez, em 2009, no estado do Rio de Janeiro e possui o potencial como vetor em um ciclo urbano, porém essa espécie de carrapato raramente espolia humanos (GEHRKE et al., 2009).

Quando não tratada a FMB geralmente causa o óbito em 8 a 15 dias na forma clássica, e 1 a 5 dias na forma fulminante após o início dos sintomas, sendo assim podem ocorrer óbitos em por diagnóstico tardio e casos subnotificados (SILVA et al., 2009).

### **Vetores artrópodes e os efeitos da antropização do ambiente**

Os carrapatos são artrópodes da Classe Arachnida, Subclasse Acari e Ordem Ixodida. No Brasil a Família Ixodidae é mais frequentemente relatada na literatura em estudos da Febre Maculosa Brasileira. Os carrapatos parasitam diversas espécies de animais, sendo que as formas imaturas possuem menor especificidade de hospedeiros (OLIVEIRA et al., 2000).

Durante o seu ciclo de vida, o carrapato passa por diversos estágios e estádios, nos estádios de larva, ninfa e adulto o carrapato passa por mudanças graduais que são precedidos ou sucedidos por ecdises, ao final da qual é eliminada uma exúvia residual. As passagem do estágio de larva a ninfa é caracterizada pela transição de uma forma hexápode a octópode, as alterações do estágio de ninfa a adulto é mais gradual e caracterizada pela formação do poro genital; mudanças dentro de um mesmo estágio são denominados instar, como por exemplo, larva I (neolarva), larva II (metalarva), (SERRA-FREIRE; MELLO, 2006). Cada estágio evolutivo pode ser realizado em um ou diversos hospedeiros, sendo denominados, portanto como ciclos monoxenos (de um só hospedeiro), trioxenos (ciclo parasitário envolvendo três hospedeiros), passando pelo ambiente entre cada mudança de hospedeiro. Esse comportamento influencia no surgimento de ciclos epizoóticos ou enzoóticos (SERRA-FREIRE; MELLO, 2006).

A *Rickettsia rickettsii* foi detectada infectando carrapatos das espécies *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma cajennense*, *Anocentor nitens*<sup>1</sup>, *Boophilus (Rhipicephalus) microplus*<sup>2</sup> e *Rhipicephalus sanguineus*, *Ornithodoros* sp. e a espécie de pulga *Ctenocephalides felis* (GEHRKE, 2010). Dentre essas espécies o principal vetor da FMB no Brasil é o carrapato *Amblyomma cajennense* cujo ciclo é trioxeno, com baixa especificidade parasitária e distingue-se por parasitar intensamente o homem em suas formas imaturas (SILVA et al., 2009). *A. cajennense* possui uma geração por ano. Sazonalmente há predomínio da população de larvas em maio, de ninfas em julho e dos estádios adultos de agosto a maio (OLIVEIRA et al., 2000).

As fêmeas de carrapatos podem transmitir as bactérias de forma horizontal ou vertical, havendo diferença na eficiência da transmissão vertical. A fêmea teleógina de *Amblyomma cajennense* transmite *Rickettsia rickettsii* a menos de 50% de sua prole, e quando ocorre essa transmissão, menos de 50% das larvas são infectadas (KRAWCZAK et al., 2014). Já a espécie *Amblyomma aureolatum*, foi considerada mais importante para a disseminação de riquetsias na região metropolitana de São Paulo. Esta espécie consegue manter populações de carrapatos infectados por transmissão transovarial e transestadial, sendo mais eficiente na transmissão vertical (KRAWCZAK et al., 2014).

Fora das regiões metropolitanas das grandes cidades, a ação antropogênica foi capaz de afetar a quantidade e distribuição de carrapatos nos hospedeiros e ambientes. Estudos recentes apontaram que a presença dos carrapatos foi maior em pastos do que em áreas de conservação ambiental, e que alterações microclimáticas na temperatura e umidade relativa alteram a dinâmica populacional de hospedeiros e predadores naturais (CANÇADO et al., 2008). Ainda nesse contexto, Labruna et al., (2011), estudaram os fatores de risco da infestação de carrapatos para a equinocultura e relataram que a presença de *A. cajennense* é maior em fazendas com plantas invasoras e pastagens não manejadas, e menor em propriedades que realizam rodízio de pastagens.

---

<sup>1</sup> A espécie *Anocentor nitens* também é classificada como *Dermacentor nitens*. Fonte: HORAK, I.G., CAMICAS, J.L., KEIRANS, J.E. The Agarsidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. **Experimental and Applied Acarology**. 28:27-54, 200.

<sup>2</sup> A classificação da espécie *Boophilus microplus* é contestada por alguns autores como pertencente ao gênero *Rhipicephalus*. Fonte: Camicas, J.L., Hervy, J.P., Adam, F. & Morel, P.C. 1998. **Les tiques du monde (Acarida, Ixodida)**. Nomenclature, stades décrits, hôtes, répartition. ORSTOM, Paris, 233 pp.

## **Equinos e suas utilizações no Distrito Federal**

A população de equinos no DF é estimada em aproximadamente 4000 animais. Esses são utilizados para diversas finalidades, tais como o lazer, esporte, cerimonial, patrulhamento policial e frete. O uso destes animais para o lazer é exercido em diversas fazendas, haras e sociedades hípicas como a Federação Hípica de Brasília. O patrulhamento policial é realizado pelo Regimento de Polícia Montada e o uso cerimonial dos equinos é feito pelo 1º Regimento de Cavalaria da Guarda. (comunicação pessoal, 2012). A população de equinos que atua como animais de tração divide-se em duas utilizações típicas: o frete de materiais variados, que é um modelo de negócio exercido a partir do momento da construção de Brasília, em 1959, e mais recentemente o recolhimento de materiais recicláveis (KAARI, 2006). Infelizmente não foi possível, durante a realização do experimento, obter uma estimativa precisa do número de equinos que habitam o Distrito Federal, em decorrência da dificuldade de realização de dados mais precisos fornecidos pelos órgãos públicos oficiais.



## **Objetivos**

### **Gerais:**

1. Realizar levantamento sorológico para presença de anticorpos anti *Rickettsia* em soro equino obtido de animais no Distrito Federal.
2. Realizar levantamento acarológico em equinos do Distrito Federal.

### **Específico:**

Detectar a circulação de *Rickettsia* no Distrito Federal e a presença de potenciais vetores.

## Referências Bibliográficas

- CANÇADO, P. H. D. et al. Spatial distribution and impact of cattle-raising on ticks in the Pantanal region of Brazil by using the CO(2) tick trap. **Parasitology research**, v. 103, n. 2, p. 371–377, jul. 2008.
- FIOL, F. DE S. D. et al. Rocky Mountain spotted fever in Brazil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 27, n. 6, p. 461–466, jun. 2010.
- GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. **Bergey's Manual of systematic of bacteriology**. 2. ed. [s.l.] Baltimore, 2004.
- GAZÊTA, G. S. et al. Seasonal Analysis of the Number of Aeropiles in *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae) from the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 2001.
- GEHRKE, F. S. et al. *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia felis* and *Rickettsia* sp. TwKM03 infecting *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis* collected from dogs in a Brazilian spotted fever focus in the State of Rio De Janeiro/Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, p. 267–268, 2009.
- GEHRKE, F. DE S. **Detecção e caracterização molecular de riquetsias em humanos, potenciais vetores e animais domésticos da região sudeste do Brasil**. Tese de Doutorado—[s.l.] Universidade de São Paulo, 18 jun. 2010.
- GILLESPIE, J. J. et al. Plasmids and Rickettsial Evolution: Insight from *Rickettsia felis*, **PLoS ONE**, 2(3), 2007.
- KAARI, P. **A exploração de equídeos por carroceiros no Distrito Federal: Direito, Diagnóstico e Educação Ambiental**. Brasília: Universidade de Brasília, 2006.
- KELLY, D.J. et al. The Past and Present Threat of Rickettsial Diseases to Military Medicine and International Public Health. **Clin Infect Dis**. Número 34, suplemento 4, p. 145-169, 2002.
- KRAWCZAK, F. S. et al. Rickettsial infection in *Amblyomma cajennense* ticks and capybaras (*Hydrochoeros hydrochaeris*) in a Brazilian spotted fever-endemic area. **Parasites & Vectors**, 7:7,2014.
- LABRUNA, M. B.; ET AL. Rickettiosis en América Latina, el Caribe, España y Portugal. **Rev. MVZ Córdoba**, 16(2):2435-2457, 2011.
- LOPES, M. G. **Infecção por *Rickettsia* spp. em equídeos e carrapatos do Centro-Norte do Piauí**. São Paulo: USP, 2012.
- MARTINS, M. E. P. **Aspectos epidemiológicos da febre maculosa brasileira no município de Quirinópolis, Goiás, Brasil**. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Vigilância Epidemiológico**, 2006. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/febremaculosagve.pdf>>. Acesso em: 11 dez. 2011

MORAES-FILHO, et al., Pesquisa de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii* em equinos do Centro de Controle de Zoonoses do município de São Paulo (CCZ-SP). **Braz. J. Vet. anim. Sci**, volume 46, número 2, p. 85-91, 2009

MOURA, N. O. DE. **Deteção e caracterização molecular de riquetsias em potenciais vetores procedentes de focos ativos de febre maculosa do Estado do Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado**—[s.l.] Universidade de São Paulo, 10 fev. 2012.

OLIVEIRA, et al., Population dynamics of the free-living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) on pastures of Pedro Leopoldo, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 92(2000) p. 295-301, Goiania, Brazil, 2000.

PERLMAN, S.J.; HUNTER, M.S.; ZCHORI-FEIN, E. The emerging diversity of *Rickettsia*. **Proc. R. Soc. B**. número 273 p2097-2106, abril, 2006

PINTER, A. et al. **Febre Maculosa Brasileira BEPA Suplemento** , 2011. Disponível em: <[http://www.saude.sp.gov.br/resources/sucen/homepage/downloads/arquivos-de-febre-maculosa/bepa94\\_suplemento\\_fmb.pdf](http://www.saude.sp.gov.br/resources/sucen/homepage/downloads/arquivos-de-febre-maculosa/bepa94_suplemento_fmb.pdf)>

QUINN, P. J. **Microbiologia Veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

ROCHA, G. C. DA et al. **Primeiros registros da circulação de riquetsias do Grupo da Febre Maculosa, em ciclo enzoótico canino, no Planalto Central, Brasil**. In: II Encontro Nacional de Vigilância das Zoonoses. Gramado, 2013.

SAHNI, S.K., RYDKINA, E. Host-cell interactions with pathogenic *Rickettsia* species. **Future Microbiol**. Número 4, p. 323-339, abril, 2009.

SANTIBÁÑEZ, S. et al. Usefulness of rickettsial PCR assays for the molecular diagnosis of human rickettsioses. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 31, n. 5, p. 283–288, maio 2013.

SERRA-FREIRE, N. M.; MELLO, R. P. DE. **Entomologia e Acarologia na Medicina Veterinária**. [s.l.] LF Livros, 2006.

SILVA, E. A. et al. **Norma Técnica para Vigilância Epidemiológica da Febre Maculosa Brasileira no Município de São Paulo**. Secretaria Municipal de Saúde de São Paulo, 2009.

SOUZA, C.E. et al. O papel da capivaras *Hydrochaeris hydrochaeris* na cadeia epidemiológica da febre maculosa brasileira. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 13, 2004.

WALKER, D.H. Rickettsiae and Rickettsial Infections: The Current State of Knowledge. **Clinical Infectious Diseases**. 45: S39-44, Galveston, 2007.

## Capítulo 1: Detecção sorológica da circulação de *Rickettsia* em equinos de Brasília, Distrito Federal

### Resumo

A febre maculosa brasileira (FMB) é uma zoonose causada pela bactéria *Rickettsia rickettsii* e transmitida a humanos por carrapatos. Neste trabalho procurou-se detectar a presença do principal agente etiológico da FMB circulando em equinos apreendidos no Distrito Federal, Brasil. Durante um ano foram coletadas amostras de sangue e ectoparasitos de 122 equinos. Após teste por reação de imunofluorescência indireta (RIFI), para anticorpos IgG anti *R. rickettsii* 21 amostras foram positivas em titulações variáveis de 1:64 a 1:512. Dos 618 carrapatos coletados, 449 pertenciam ao gênero *Anocentor*, 113 ao *Boophilus* e 36 do gênero *Amblyomma*.

Palavras-chave: 1. Riquetsias 2. Febre Maculosa Brasileira 3. Carrapatos

### Abstract

The Brazilian spotted fever (BSF) is a zoonosis caused by the bacteria *Rickettsia rickettsii* and transmitted to humans by ticks. In this study we tried to detect the BSF ethiological agent in horses apprehended by animal control in Distrito Federal, Brazil. Over one year the blood and ectoparasites were sampled on 122 horses. The samples were tested by indirect immunofluorescence antibody assay (IFA) for *R. rickettsii* anti-IgG antibody, 21 samples were positive for titer ranging from 1:64 to 1:512. Among the 618 ticks collected, 449 belonged to the *Anocentor* genus, 113 to *Boophilus* and 36 were *Amblyomma*.

Keywords: 1. Rickettsias 2. Brazilian spotted fever 3. Ticks

### Introdução

As riquetsias são Alfabroteobactérias da família *Rickettsiaceae* causadoras de doenças com patologias variadas (GARRITY; BELL; LILBURN, 2004). Espécies de riquetsias foram detectadas infectando carrapatos de diversos gêneros, como, por exemplo, *Amblyomma*, *Rhipicephalus*, *Boophilus* e mesmo outros artrópodes, como a pulga *Ctenocephalides felis* (GEHRKE et al., 2009). Atualmente o gênero *Rickettsia* encontra-se dividido em 4 grupos de acordo com análise filogenética: Grupo da Febre Maculosa (GFM), Grupo do Tifo (GT), Grupo de Transição (GTr) e Grupo Ancestral (GA) (GILLESPIE et al., 2007).

Estes patógenos são importantes agentes causadores de doenças potencialmente fatais ou de patogenicidade desconhecida em humanos e diversas espécies animais (PERLMAN, HUNTER, ZCHORI-FEIN, 2006). Podem causar a denominada vasculite riquetsial, e são capazes de produzir sinais clínicos como febre, cefaléia, exantema, rash cutâneo, dores musculares, nistagmo, convulsão e morte (SANTIBÁÑES et al., 2013).

Estes microrganismos têm como hospedeiros, além de animais domésticos urbanos ou rurais, os animais silvestres tais como capivaras e cervídeos (FIGUEIREDO et al., 1999). Dentre os animais domésticos, o equino é uma espécie sentinela e amplificadora para as riquetsias (SANGIONI, 2003; MORAES-FILHO et al., 2009).

De posse desta informação, a utilização de levantamentos sorológicos equinos como indicadores da circulação de riquetsias vem sendo realizada em diversos estados. Em levantamentos recentes, no estado de São Paulo, um estudo realizado entre os anos de 2003 a 2005, apresentou resultados positivos em 17,6% de 363 amostras de soro equino (MORAES-FILHO et al, 2009). No Piauí, foram obtidos resultados positivos em 52,3% de 239 amostras de soros equídeos (LOPES, 2012) e estudos realizados no Mato Grosso apresentaram resultados positivos em soro equino na ordem de 59,34 % das 273 amostras testadas (AMORIM et al., 2013).

Embora não utilizando equinos, no Distrito Federal, o levantamento realizado por Rocha et al, (2013), demonstrou a circulação de *Rickettsia*, só que em cães, animais também considerados sentinelas (MORAES-FILHO et al., 2009).

Quanto à presença de vetores, no Brasil a Família *Ixodidae* foi mais frequentemente relatada na literatura em estudos da Febre Maculosa Brasileira, sendo que estes ácaros são encontrados em diversos estados brasileiros (OLIVEIRA et al., 2000). No Distrito Federal, Leocádio (2013) relatou a existência de *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma cajennense*, *Anocentor nitens*, *Amblyomma dubitatum*, *Boophilus (Rhipicephalus) microplus*.

Faz-se necessário também informar que entre 2012 e 2013 no DF, foram registrados 15 atendimentos pela Diretoria de Vigilância Ambiental (DIVAL) à locais com infestação de carrapatos com queixas de espoliação de animais e/ou humanos (LEOCADIO, 2013), o que levou a preocupação quanto a possível disseminação de doenças vetoradas por estes ácaros.

Com o indicativo da presença do agente etiológico circulando na população canina no DF, e tomando-se por base o trabalho de Rocha et al., (2013) que relata a presença de possíveis carrapatos vetores para o agente, este estudo teve como objetivo realizar a detecção de anticorpos para *Rickettsia*, em soro equino, utilizando a técnica de imunofluorescência indireta, e um levantamento acarológico nesta população para contribuir com o diagnóstico preciso de um quadro epidemiológico da FMB.

## Material e Métodos

### Coleta das amostras

Para a elaboração deste estudo, os equinos utilizados, para as coletas das amostras de carrapatos e de sangue, foram aqueles do curral da Gerência de Apreensão de Animais da Secretaria de Agricultura e Desenvolvimento Rural (SEAGRI), localizada no Setor Terminal Norte, coordenadas  $15^{\circ}43'50.2''S$   $47^{\circ}54'29.4''O$ , cuja localização é representada na figura 2. Esta gerência atua recolhendo animais encontrados irregularmente circulando livremente no Distrito Federal. A população de animais do curral é dinâmica, havendo alterações nos indivíduos com entrada constante de animais apreendidos e saída de animais recuperados pelos proprietários após pagamento de multa ou doação dos animais após o prazo máximo de permanência nas instalações da SEAGRI.

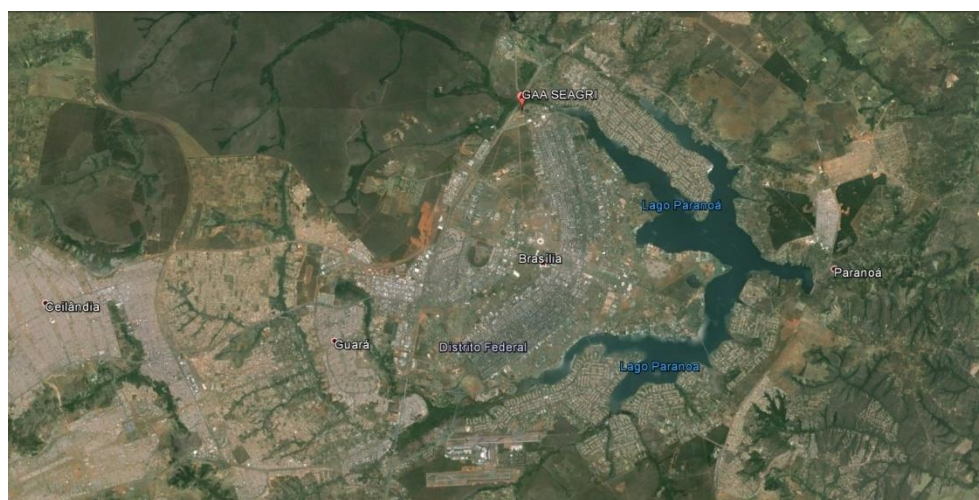


Figura 2: Marcação vermelha -Localização Curral de Apreensão da SEAGRI no Distrito Federal. Fonte: Google Digital Globe, 2014.

## **Coleta de sangue**

As amostras de sanguíneas de equinos foram coletadas de animais selecionados por amostragem de conveniência procurando alcançar pelo menos 33% dos animais presentes, parasitados ou não por ectoparasitos. Esses animais são separados em piquetes de entrada, para os recém-apreendidos e piquete de recuperação, destinado aos animais debilitados recebendo tratamento e estadia prolongada. A amostragem foi realizada em um período de 1 ano, compreendido entre setembro de 2012 a setembro de 2013, com frequência semanal de forma a incluir a sazonalidade anual do clima e parasitos.

Foram coletados 5 mL a 10 mL de sangue em tubos BD Vacutainer® de 10 mL contendo ativadores de coágulo e identificados com etiqueta adesiva branca com o número de ficha de coleta, os tubos foram centrifugados a 2500 rpm por cinco minutos para separação do soro. Ao final do procedimento de coleta cada amostra foi identificada e armazenada em microtubos para posterior análise. Os coágulos sanguíneos e soros obtidos foram congelados a -20 °C, sendo que os coágulos sanguíneos serão empregados em futuro estudo utilizando o método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

## **Coleta de ácaros**

Para realizar a coleta, foi adotado como procedimento de o uso dos seguintes equipamentos de proteção individual: macacão branco com capuz, botas brancas, luvas de procedimento e fita adesiva dupla face, apresentado com maiores detalhes no Anexo I.

Os animais foram contidos por meio de laços e cordas, para a realização de catação manual de ectoparasitos com o auxílio de pinça e pente fino. Para remover carrapatos foi utilizado um movimento de torção contínuo com a mão ou pinça com o cuidado de manter íntegras estruturas anatômicas importantes para a identificação da espécie de carrapato, como o hipostômio por exemplo. O pente fino foi passado no pelo no sentido horário e os ectoparasitos transferidos para os tubos de coleta.



Os ectoparasitos encontrados nos equinos foram conservados em isopropanol 100% P.A. em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL a 2 mL ou tubo Falcon 15 mL contendo todos os ectoparasitos de uma unidade experimental e resfriados em freezer - 20 °C.

### **Identificação de ectoparasitos**

Os ectoparasitos foram identificados por características anatômicas em observação com o auxílio de microscópio estereoscópio e comparados com a chave de identificação para gêneros e espécies do Brasil (ARAGÃO; FONSECA, 1961).

### **Reação de Imunofluorescência Indireta**

Para a detecção de riquetsias em amostras de soro foi utilizada a Técnica Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), o método sorológico padrão-ouro para diagnóstico laboratorial. Foram pesquisadas imunoglobulinas IgG, as quais são detectáveis a partir do sétimo ao décimo dia pós infecção e indicam um contato crônico com o microrganismo (QUINN, 2005).

A RIFI foi realizada no Laboratório de Riquetsioses e Hantavirose da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), em Belo Horizonte, Minas Gerais, ilustrado na figura 3, e o procedimento detalhado poderá ser consultado no Anexo II POP 61\_00 do Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da UnB.



Figura 3 Laboratório de Riquetsioses e Hantavirose na Fundação Ezequiel Dias.

Com a finalidade de detectar os anticorpos IgG para *Rickettsia rickettsii*, as amostras foram diluídas em razão 1:64 em tampão PBS pH 7,4 0,01 M (Sigma®), homogeneizadas em vortex e 20 µL da diluição foram inoculados por poço em lâminas de imunofluorescência contendo o antígeno riquetsial (Antigen Slide *Rickettsia rickettsii*, Scimedx Corporation ®). As amostras foram então incubadas em câmara úmida a 37 °C por 30 minutos.

As lâminas foram retiradas da incubadora e o excesso de reagentes removido com água destilada, e a seguir foram lavadas em solução de PBS pH 7,4 0,01 M em câmara com agitador magnético em baixa velocidade por cinco minutos. Após secagem das lâminas, cada poço foi coberto com 20 µL de conjugado para IgG anti-*Rickettsia*. Repetiu-se o procedimento de incubação e lavagem conforme descrito anteriormente. Após a última repetição de incubação e lavagem os poços foram cobertos com uma gota de glicerina tamponada, cobertas com lamínula e observadas no microscópio em aumento de 400X.

## Resultados

### Imunofluorescência

Com a reação de imunofluorescência indireta na diluição de triagem de 1:64, foram diagnosticadas 21 amostras positivas de um total de 122 testadas. Em subseqüentes diluições, como 1:128, foram encontradas 11 amostras positivas, na diluição de 1:256 foram encontradas 3 amostras positivas e apenas 01 amostra foi positiva para a diluição 1:512 (Dados exemplificados na tabela 2), sendo esta última diluição representada na figura 4.

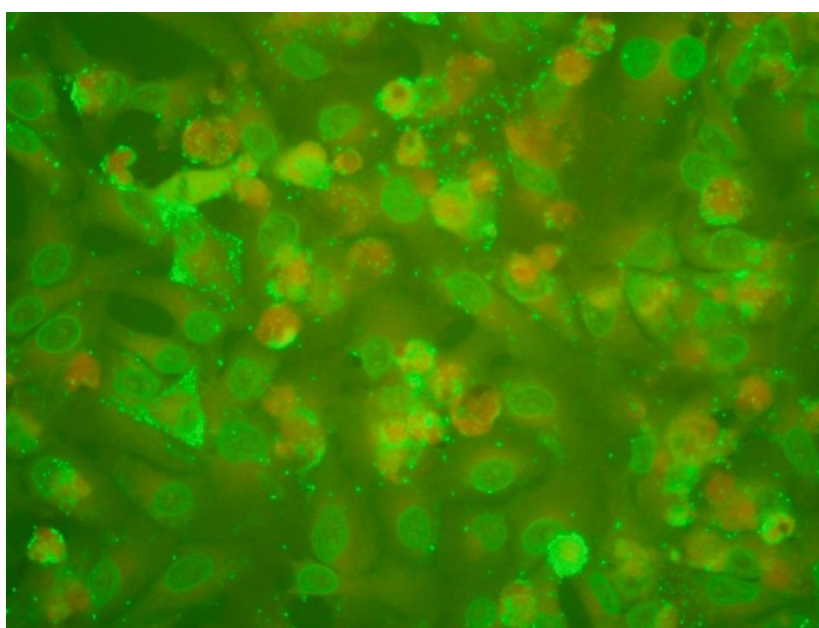


Figura 4 Amostra positiva na sorologia para *Rickettsia rickettsii* até diluição de 1:512, zoom 400X.

Período de coletas de acordo com a pluviosidade relativa	Diluição 1:64	Diluição 1:128	Diluição 1:256	Diluição 1:512
Outubro de 2012 a abril de 2013	3	6	1	1
Setembro de 2012 e maio de 2013 a setembro de 2013	3	5	2	0

Tabela 2: Distribuição das amostras positivas por sazonalidade pluviosidade relativa, período de chuvas (outubro de 2012 a abril de 2013) e estiagem (setembro de 2012 e e maio de 2013 a setembro de 2013).

## Levantamento acarológico

Dentre os 618 carrapatos coletados, 483 carrapatos eram fêmeas, 135 eram machos e foram identificados 449 carrapatos do gênero *Anocentor*, 133 *Boophilus* e 36 *Amblyomma*. No gênero *Anocentor* todos os indivíduos pertenciam a espécie *Anocentor nitens*, a totalidade dos *Boophilus* foram identificados como *Boophilus (Rhipicephalus) microplus*, no gênero *Amblyomma* foram coletados 35 *Amblyomma cajennense* e 1 *Amblyomma brasiliense*. Para maior compreensão de uma possível sazonalidade a Tabela 3 apresenta os dados por período pluviométrico da coleta.

<b>Período de coletas de acordo com a pluviosidade relativa</b>	<b>Gênero <i>Anocentor</i></b>	<b>Gênero <i>Boophilus</i></b>	<b>Gênero <i>Amblyomma</i></b>
<b>Outubro de 2012 a abril de 2013</b>	228	84	40
<b>Setembro de 2012 e maio de 2013 a setembro de 2013</b>	209	55	2

Tabela 3: Gêneros de carrapatos por período de pluviosidade relativa, período de chuvas (outubro de 2012 a abril de 2013) e estiagem (setembro de 2012 e maio de 2013 a setembro de 2013).

## Discussão

Os resultados da Imunofluorescência Indireta (RIFI) indicam a presença de bactérias do gênero *Rickettsia*, mais provavelmente a espécie *Rickettsia rickettsii* em equinos circulando livremente no Distrito Federal. A detecção de anticorpos IgG significa um contato crônico dos animais com as riquetsias, o qual pode ter ocorrido até um ano antes da coleta da amostra, um período de tempo anterior ao estudo que abrange até o início de 2012 (CDC, 2013).

Comparando dados obtidos em outros estudos, na região Centro Oeste, Martins, (2009), estudou os fatores epidemiológicos da febre maculosa em Quirinópolis, detectando por meio de RIFI uma soroprevalência de 28,6% nos equinos estudados, proporção superior a encontrada nesse estudo, onde tomando-se por base a diluição 1:64, observa-se uma soroprevalência de 17,21% das amostras testadas.

Outros trabalhos já anteriormente mencionados também apresentam resultados mais elevados como os de Lopes, 2012 no Piauí com resultados positivos em 52,3% de 239 amostras de soro equídeos e Amorim et al, 2013 com resultados positivos em soro equino na ordem de 59,34 % das 273 amostras testadas.

As variações nas diluições encontradas representam diferentes intervalos de tempo entre o contato do animal com a riquetsia, sendo que as amostras que fluoresceram em alíquotas mais diluídas apresentam uma probabilidade menor de reação cruzada. A confirmação se a espécie de todas as amostras é *Rickettsia rickettsii* está em andamento em novo estudo baseado nos testes da PCR e sequenciamento genético.

O projeto de Brasília, e em especial o Plano Piloto foi criado com o ideal de funcionar como um grande parque para estimular a prática de atividades ao ar livre, com amplos gramados e parques arborizados próximos a cursos de água, locais onde ocorre uma maior aproximação da população de ambientes propícios a presença de carrapatos. O Lago Paranoá e o parque nacional de Brasília Água Mineral são exemplos de grandes áreas com a presença desses elementos naturais. Existem também regiões de produção agropecuária em regiões urbanas e periurbanas nas quais o risco da presença de vetores é aumentada por pastos considerados sujos próximos a fontes hídricas. A utilização de parques ecológicos recreativos aproxima nossa espécie dos carrapatos transportados por

animais silvestres e quando os frequentadores dos parques estão acompanhados de cães e outros animais domésticos, podem transportar os carrapatos para os centros urbanos e residenciais. Em entrevistas realizadas no planejamento desse estudo, proprietários de equinos relataram deslocar-se diariamente distâncias de até 20 km entre a residência e o local de trabalho, realizando o trajeto por áreas urbanas e rurais (comunicação pessoal, 2014).

Na literatura, podemos encontrar também o destaque para animais silvestres, como capivaras e cervídeos, em contato com mamíferos domésticos tais como equinos, bovinos e cães compartilham os mesmos carrapatos (FIGUEIREDO et al., 1999), justificando a preocupação com os parques ecológicos de regiões periurbanas.

Apesar da escassez de estudos com riquetsioses e vetores no Distrito Federal, no ano de 2013, foi publicado o trabalho de Rocha et al., (2013) resultante de estudos multicêntricos e interinstitucionais entre UnB, DIVAL e FIOCRUZ-RJ, cuja publicação foi antecedida pelo curso de Capacitação em Vigilância Ambiental em outubro de 2012.

Durante a execução deste trabalho, foram identificadas espécies de carrapatos de ciclos monoxeno e trioxeno, como a espécie *Anocentor nitens* que é associada a manutenção de ciclos enzoóticos de riquetsias em equinos e a espécie *Amblyomma cajennense* que por seu ciclo trioxeno possui potencial para iniciar ciclos epizoóticos que afetem a população do Distrito Federal. Como esses carrapatos foram coletados a partir de uma população de equinos que realiza grandes deslocamentos entre a residência do carroceiro, áreas intermediárias de apoio que concentram amontoados de materiais recicláveis e animais e o destino final de venda de materiais (KAARI, 2006), se torna difícil estabelecer uma região mais especificamente vinculada a presença do agente bacteriano. Além disso, esses animais frequentemente são trocados entre diferentes proprietários e passar a seguir novas rotas de trabalho, podendo assim disseminar os carrapatos por uma área maior quando comparados com animais de haras e sociedades hípcas criados em confinamento.

Rocha et al., (2013) estudou a presença de carrapatos em cães domésticos (*Canis lupus familiaris*) no DF, além das espécies usualmente relatadas em estudo,

Leocadio, (2013), em apresentação do Programa de Vigilância Ambiental para FMB no DF, relatou carrapatos espoliando o réptil *Rhinella marinus*<sup>3</sup>.

Quando comparadas com o estudo anterior, as espécies encontradas também foram relatadas por Rocha et al., (2013); Leocadio, (2013), também relatou a presença de *Amblyomma dubitatum* e *Amblyomma rotundatum* coletados em Curso de Capacitação em Vigilância Ambiental da Febre Maculosa Brasileira (2012) foram realizados 126 ensaios de PCR com os carrapatos coletados para detectar material genético de riquetsias, obtendo-se resultados negativos em sua totalidade.

Fatores como a conservação do ambiente, sazonalidade do clima e capacidade eficiência de transmissão vertical afetam a quantidade de carrapatos presentes e a proporção de carrapatos infectados com riquetsias (FIGUEIREDO et al., 1999; CANÇADO et al., 2008; KRAWCZAK et al., 2014). De acordo com este trabalho, se for observada a tabela 3, podemos notar a diferença entre o período de estiagem e o chuvos que efetivamente só apresentou grandes diferenças quanto ao número de carrapatos do gênero *Amblyomma*, embora os três gêneros tenham sido encontrados em todo o período de coletas. Quanto aos dados apresentados na tabela 2, não foi possível observar diferenças significativas entre os períodos de estiagem e chuvoso quanto ao numero de resultados positivos sorológicos.

Finalizando, a caracterização molecular das riquetsias em amostras positivas detectadas por RIFI vem sendo realizada, pois há grandes variações na letalidade das doenças causadas por *Rickettsia rickettsii*, o agente causador da febre maculosa brasileira, que apresenta-se mais letal que a cepa encontrada na América do Norte.

Neste aspecto, foram registrados 506 casos confirmados do agravo no período de 2001 a 2006 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007), sendo que a maioria dos casos letais aconteceu na região Sudeste, com registros em todos os estados do Sudeste, todos os estados do Sul, Bahia, Ceará e apenas um caso registrado no Distrito Federal (LOPES, 2012).

---

<sup>3</sup> *Rhinella marinus*: no trabalho é adotada nomenclatura *Bufus marinus*.

## **Conclusão**

A Circulação de *Rickettsia* diagnosticada por imunofluorescência em soro de equinos evidencia mais um elemento do ciclo da Febre Maculosa Brasileira presente no Distrito Federal. É provável que o agente esteja presente na região há anos, hipótese possível quando considerada o conjunto de hospedeiros susceptíveis como o homem, equinos e caninos e espécies de carrapatos *Ixodidae* considerados vetores competentes. De acordo com o baixo número de notificações do agravo em humanos podemos suspeitar que esteja ocorrendo subnotificação de casos de Febre Maculosa na região.

Sabendo-se que a Febre Maculosa Brasileira é uma doença de tratamento efetivo, a vigilância de doenças emergentes vetoradas por carrapatos é essencial para estimular a prevenção e o tratamento correto, além de gerar informações para a população e médicos do sistema de saúde público ou particular. No interior do estado de São Paulo algumas cidades como Americana, Piracicaba e Ribeirão Preto já adotaram a prática de sinalizar áreas com risco elevado de exposição a carrapatos, a qual após um levantamento mais amplo de áreas importantes para a transmissão da doença é exemplo de recurso útil para a medicina preventiva no Distrito Federal.



## Referências Bibliográficas

AMORIM, M.V. Detecção de anticorpos anti-*Rickettsia* spp. em cães e equinos no estado do Mato Grosso, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**. Volume 34, número 6, p. 3755-3766, Londrina, 2013.

ARAGÃO, H.; FONSECA, F. **Chaves para famílias e para gêneros e espécies do Brasil**. Notas de Ixodologia. v. 59, p. 68, 1961.

CANÇADO, P. H. D. et al. Spatial distribution and impact of cattle-raising on ticks in the Pantanal region of Brazil by using the CO(2) tick trap. **Parasitology research**, v. 103, n. 2, p. 371–377, jul. 2008.

CDC. **Rocky Mountain Spotted Fever: Symptoms, Diagnosis, and Treatment** Centers for Disease Control, , 2013. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/rmsf/symptoms/>>. Acesso em: 12 nov. 2013

FIGUEIREDO, L. T. M. et al. Report on ticks collected in the Southeast and Mid-West regions of Brazil: analyzing the potential transmission of tick-borne pathogens to man. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 6, p. 613–619, dez. 1999.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. **Bergey's Manual of systematic of bacteriology**. 2. ed. [s.l.] Baltimore, 2004.

GEHRKE, F. S. et al. *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia felis* and *Rickettsia* sp. TwKM03 infecting *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis* collected from dogs in a Brazilian spotted fever focus in the State of Rio De Janeiro/Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, p. 267–268, 2009.

KAARI, P. **A exploração de equídeos por carroceiros no Distrito Federal: Direito, Diagnóstico e Educação Ambiental**. Brasília: Universidade de Brasília, 2006.

KRAWCZAK, F. S. et al. Rickettsial infection in Amblyomma cajennense ticks and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in a Brazilian spotted fever-endemic area. **Parasites & Vectors**, 7:72014.

LEOCADIO, A. DE M. **Doenças transmitidas por carrapatos experiência DF**. In: III SIMPÓSIO DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR CARRAPATOS. , 2013.

LOPES, M. G. **Infecção por Rickettsia spp em equídeos e carrapatos do Centro-Norte do Piauí**. São Paulo: USP, 2012.

MARTINS, M. E. P. **Aspectos epidemiológicos da febre maculosa brasileira no município de Quirinópolis, Goiás, Brasil**. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **FEBRE MACULOSA - Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan**, 2007. Disponível em:

<<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinan/fmaculosa/bases/febremaculosabr.def>>

MORAES-FILHO, et al., Pesquisa de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii* em eqüinos do Centro de Controle de Zoonoses do município de São Paulo (CCZ-SP). **Braz. J. Vet. anim. Sci**, volume 46, número 2, p. 85-91, 2009.

OLIVEIRA, et al., Population dynamics of the free-living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) on pastures of Pedro Leopoldo, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 92(2000) p. 295-301, Goiania, Brazil, 2000.

PERLMAN, S.J.; HUNTER, M.S.; ZCHORI-FEIN, E. The emerging diversity of *Rickettsia*. **Proc. R. Soc. B.** número 273 p2097-2106, abril, 2006.

QUINN, P. J. **Microbiologia Veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

ROCHA, G. C. DA et al. **Primeiros registros da circulação de riquetsias do Grupo da Febre Maculosa, em ciclo enzoótico canino, no Planalto Central, Brasil**. In: II ENCONTRO NACIONAL DE VIGILÂNCIA DAS ZONNOSES. Gramado, 2013.

SANGIONI, L.A. **Pesquisa de infecção por rickettsias do grupo da febre maculosa em humanos, cães, eqüídeos e em adultos de *Amblyomma cajennense*, em região endêmica e não endêmica no estado de São Paulo**. Tese de Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonose, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2003.

SANTIBÁÑEZ, S. et al. Usefulness of rickettsial PCR assays for the molecular diagnosis of human rickettsioses. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 31, n. 5, p. 283–288, maio 2013.

SANGIONI, L.A. **Pesquisa de infecção por rickettsias do grupo da febre maculosa em humanos, cães, eqüídeos e em adultos de *Amblyomma cajennense*, em região endêmica e não endêmica no estado de São Paulo**. Tese de Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonose, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2003.

## **Anexos**

### **Anexo I: POP Coleta de artrópodes a campo**

#### **Tarefa**

Informar sobre o equipamento de proteção individual e metodologia de coleta de carrapatos a campo, evitando o contato com artrópodes vetores de doenças infecciosas e preservando a amostra viável para análises.

#### **Local de execução**

Áreas exteriores ao Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária e seus setores de Bacteriologia e Micologia.

#### **Executante**

Professores, técnicos, residentes, estudantes de pós-graduação, estagiários, monitores, estudantes de graduação.

#### **Resultados esperados**

São esperados a minimização dos riscos de transmissão de doenças vetoradas por artrópodes e a obtenção de artrópodes para análise.

#### **Material necessário**

1. Macacão de manga comprida com capuz de cor branca ou clara
2. Pinça de ponta fina
3. Caneta de pigmento resistente a água e álcool
4. Tubos do tipo Eppendorf ou Falcon
5. Isopropanol 100%
6. Bolsa de coleta
7. Estante para tubos
8. Fita dupla face
9. Botas de cano alto de cor branca ou clara
10. Meião branco (dois pares)
11. Pente fino
12. Recipiente para água

13. Filtro de papel descartável

14. Funil

### Atividades

Vestir o macacão branco por cima da roupa comum, fechando-o completamente. O primeiro par de meiões devem ser calçados por cima da calça comprida de uso diário e o segundo passado por cima da perna do macacão branco.

Calçar a bota branca sobre o macacão branco e aplicar fita adesiva dupla face ao redor da margem superior do cano da bota branca criando uma barreira a passagem de artrópodes.

As luvas de procedimento devem ser calçadas sobre a manga comprida do macacão branco e afixadas com fita dupla face aplicada ao redor do pulso, em caso de trabalho próximo a árvores ou em condições de vento vestir o capuz sobre a cabeça.

Apalpar toda a superfície do animal ou quando não for possível todo um antímero procurando por carrapatos, pulgas e piolhos por tato e visão.

- Remoção de carrapatos: pinçar próximo a inserção na pele do hospedeiro e remover com um movimento de torção para evitar a ruptura do hipostômio.
- Remoção de piolhos e pulgas: remover os artrópodes com o pente fino e depositá-los no recipiente com água, finalizado o procedimento de catação passar a água por um filtro de papel em funil.

Artópodes coletados devem ser armazenados imediatamente em isopropanol 100% para conservar as estruturas anatômicas, DNA do parasito e inativar microorganismos. Identificar os tubos Eppendorf utilizando caneta resistente a água e álcool.

### **Cuidados especiais**

Em intervalos de até 30 minutos observar a EPI para a presença de artrópodes, repetir a observação ao final do trabalho para evitar transportar vetores de doenças infecciosas a outras áreas.

O macacão branco não deve ter bolsos ou outros acessórios que facilitem a entrada e ocultação de carrapatos.

Transportar a EPI em saco plástico fechado ao finalizar o trabalho a campo.

### **Ações em caso de não conformidade**

No caso de serem notados artrópodes parasitos sobre o corpo do pesquisador proceder a remoção imediata com o auxílio de pinças ou fita adesiva e armazenamento do artrópode em isopropanol 100%.

## Anexo II: POP Reação de Imunofluorescência Indireta

### Tarefa

Detectar a presença de *Rickettsia rickettsii* em amostras de sangue provenientes de equinos.

### Local de execução

Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária e seus setores de Virologia.

### Executante

Professores, técnicos, residentes, estudantes de pós-graduação, estagiários, monitores, estudantes de graduação.

### Resultados esperados

É esperado a detecção de riquetsias em amostras de sangue de equinos.

### Material necessário

15. Lâmina de Imunofluorescência com 12 poços (Antigen Slide *Rickettsia rickettsii*, Scimedx)
16. Tampão PBSpH 7,4 0,01 M (Sigma)
17. Caneta de pigmento resistente a água e álcool
18. Tubos do tipo Eppendorf
19. Pipetas de precisão calibradas
20. Ponteiras de 10 µL, 200 µL
21. Descarte de ponteiras com solução de hipoclorito de sódio 2%
22. Ficha para ensaio de imunofluorescência indireta
23. Estufa (Abbott Commander Dynamic Incubator)
24. Câmara úmida
25. Câmara de imersão para lâminas
26. Agitador magnético
27. Glicerina tamponada (IFI HIV Bio Manguinhos)
28. Jaleco de manga comprida

29. Óculos de proteção
30. Touca descartável
31. Máscara descartável
32. Luvas de procedimento
33. Microscópio com luz UV
34. Antígeno anti IgG Eq
35. Solução Azul de Evans (0,01 g Azul de Evans + 100 mL PBS)

### Atividades

Homogeneizar em vórtex as amostras de soro equino, diluir 10 µL da amostra de soro equino em 630 µL de tampão PBS de forma a obter a diluição 1:64, a qual é utilizada para triagem de amostras em Imunofluorescência Indireta.

A diluição é homogeneizada e 30 µL de cada amostra são inoculados em cada poço, inoculando da esquerda para a direita e reservando os dois poços da primeira coluna para os controles positivo e negativo, a correspondência de cada poço deve ser anotada em uma ficha de ensaio de imunofluorescência indireta.

Colocar as amostras no centro da câmara úmida e umedecer o papel da base da câmara com água destilada, incubar as amostras a 37 °C por 30 minutos no interior da câmara úmida, remover o excesso de reagentes com água destilada e a seguir lavar as lâminas em câmara de imersão submersas em tampão PBS por 5 minutos com agitador magnético.

Cada poço de amostra é coberto com uma gota de conjugado para IgG anti *Rickettsia*, são repetidos os procedimentos de incubação e lavagem descritos anteriormente. Ao final da lavagem as lâminas são deixadas para secar ao ambiente ou na estufa 37 °C por até 5 minutos, antes da observação das lâminas no microscópio fluorescente cada poço é coberto com uma gota de glicerina tamponada e é aplicada uma lamínula sobre os poços.

Observar cada poço de amostras no aumento 400X no microscópio de luz fluorescente e comparar a imagem com os controles negativos e positivos, a luminosidade do laboratório deve ser restringida desligando as

fontes de luz elétrica e tampando acessos de luz natural. As amostras positivas para diluição 1:64 são analisadas em diluições crescentes dobradas até que não apresentem fluorescência, são utilizadas as diluições 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, etc.

Para as diluições sucessivas são utilizadas alíquotas da diluição anterior homogenizada com solução tampão, com o cuidado de homogeneizar cada diluição nova antes de incubar ou produzir nova alíquota.

### **Cuidados especiais**

O pesquisador ao entrar no laboratório deve paramentar-se com o EPI, constituído por jaleco de manga comprida, luvas de procedimento, óculos de proteção e touca para o cabelo.

O laboratório no qual é realizado os ensaios de imunofluorescência deve possuir controle de temperatura ambiente e luminosidade.

Armazenar as lâminas de imunofluorescência em refrigerador em um intervalo de temperatura de 2 °C a 8 °C.

Ao inocular amostras e reagentes em lâmina de imunofluorescência inocular de forma que a ponteira não toque o fundo de cada poço e sem ocorrer transbordamento de material para a lâmina ou poços adjacentes.

Na ficha de ensaio de imunofluorescência indireta deve constar a posição de cada amostra nos poços da lâmina e informações sobre origem, fabricante, lote e validade de todos os reagentes utilizados no ensaio.

Durante as etapas de lavagem de lâminas em tampão PBS, as lâminas não devem tocar entre si ou nas paredes da câmara de submersão.

As amostras devem ser analisadas por pelo menos duas pessoas para reduzir o efeito de subjetividade. O modelo do microscópio e o tempo que a luz ultravioleta do microscópio permanece ligada influencia o grau de fluorescência das amostras.



### **Ações em caso de não conformidade**

Caso o controle positivo não apresente fluorescência ou o controle negativo apresente fluorescência, é necessário repetir a lâmina.

Caso a lâmina seja danificada por quedas, exposição a luminosidade excessiva ou outras situações comprometedoras da qualidade da imagem, repetir todo o processo a partir da inoculação das lâminas.