



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL**

**PESQUISA DE RIQUÉTSIA DO GRUPO DA FEBRE
MACULOSA EM CÃES NO DISTRITO FEDERAL,
BRASIL.**

LAURÍCIO MONTEIRO CRUZ

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

**BRASÍLIA
2016**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

**PESQUISA DE RIQUÉTSIA DO GRUPO DA FEBRE
MACULOSA EM CÃES NO DISTRITO FEDERAL,
BRASIL.**

LAURÍCIO MONTEIRO CRUZ

ORIENTADORA: PROF.^a DR.^a. SIMONE PERECMANIS

PUBLICAÇÃO: 130/2016

BRASÍLIA/DF
SETEMBRO/2016

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**PESQUISA DE RIQUÉTSIA DO GRUPO DA FEBRE MACULOSA EM CÃES
NO DISTRITO FEDERAL, BRASIL.**

LAURÍCIO MONTEIRO CRUZ

Dissertação de Mestrado submetida ao programa de pós-graduação em Saúde Animal, da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Saúde Animal. Orientadora Prof.^a Dr.^a. Simone Perecmanis.

APROVADO POR:

Simone Perecmanis, Prof.^a Dr.^a. (Universidade de Brasília)

Orientadora

Ligia Maria Cantarino da Costa, Prof.^a Dr.^a. (Universidade de Brasília)

Examinadora Externa

Ângela Patrícia Santana, Prof.^a Dr.^a. (Universidade de Brasília)

Examinadora Interna

BRASÍLIA, 27 DE SETEMBRO DE 2016

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

CRUZ, L. M. **Pesquisa de riquetsia do grupo da febre maculosa em cães no Distrito Federal, Brasil**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2016, 49p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando a reprodução dessa 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 dessa dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

| | |
|----|---|
| Mp | Monteiro Cruz, Laurício Pesquisa de riquetsia do grupo da febre maculosa em cães no Distrito Federal, Brasil. / Laurício Monteiro Cruz; orientador Simone Perecmanis. -- Brasília, 2016. 49 p. Dissertação (Mestrado - Mestrado em Saúde Animal) - Universidade de Brasília, 2016. 1. Febre maculosa. 2. Riquetsia. 3. Cães. I. Perecmanis, Simone, orient. II. Título. |
|----|---|

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos ao nosso Pai Eterno Deus por estar sempre guiando meus passos e iluminando meu caminho.

Agradeço aos meus pais Josias Monteiro da Cruz (*in memoriam*) e Guiomar Borges da Cruz, que me conduziram para o caminho do saber, ensinando as primeiras lições do conhecimento e da cidadania, a mim e os meus irmãos e irmãs.

Agradeço à Professora Doutora Simone Perecmanis, orientadora, pela a oportunidade, pela a paciência quanto aos questionamentos e pela a confiança de tudo daria certo.

Agradeço à Professora Doutora Ligia Maria Cantarino, pela as orientações para as correções da minha dissertação e pela a carta de apresentação para ingresso na Pós-graduação em Saúde Animal.

Agradeço à Professora Doutora Ângela Patrícia Santana, por ter aceitado participar da minha banca examinadora e pelos os seus ensinamentos.

Agradeço ao Professor Doutor (*in memoriam*) Nicolau Maués Serra-Freire, Professor Doutor Gilberto Salles Gazêta, pelo os ensinamentos e pela a carta de apresentação para ingresso na Pós-graduação em Saúde Animal.

Agradeço ao Coordenador do Programa de Nacional de Vigilância da Febre Maculosa Brasileira, Stefan Vilges de Oliveira, pelo a convivência e aprendizado.

Agradeço ao Professor Doutor Gino Chaves da Rocha, pelas as orientações recebidas.

Agradeço aos colegas e amigos da Diretoria de Vigilância Ambiental em Saúde: Divino Valero Martins, Edvar Yuri Pacheco Schubach, Lucía d'Andurain, Cleide Santana Damasceno, Frederico Torres Braz, Anderson Joaquim Pereira dos Santos, Josiene Félix de Barros Ferreira, Ivanildo de Oliveira Correia Santos, Antônio Fonseca da Cunha Neto, Nelci de Moraes, Divino Eterno dos Santos e a todos os servidores que contribuíram direta ou indiretamente na pesquisa, e que me motivavam diariamente.

E, em especial, agradeço aos cães, por serem essenciais a essa pesquisa em prol da Saúde Pública e da Saúde Animal.

Agradeço aos colaboradores do Laboratório de Microbiologia Médica da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília: à Professora Giane Paludo, Maurício Macêdo Rodrigues, Cléa Nunes Malheiro de Oliveira, Lilian Gonçalves do Nascimento.

Agradeço às Médicas Veterinárias Débora Marcolino Silva, Ana Izabel Passarella Teixeira e ao Médico Veterinário Vinicius Drummond por terem contribuído, em muito, para a realização do experimento.

Agradeço à minha amada esposa, Andreza Paulo dos Santos Monteiro, aos nossos amados filhos Felipe Santos Monteiro e Matheus Santos Monteiro que sempre estiveram junto a mim em todas as caminhadas apoiando com muito amor, ternura e compreensão para a realização desse sonho.

*Ninguém é tão grande que não possa
aprender, nem tão pequeno que não possa ensinar.*

Píndaro

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1 – Vetores e hospedeiros de riquetsias patogênicas do Grupo da Febre Maculosa..... | 20 |
| Quadro 2 – Oligonucleotídeos utilizados para identificação genotípica de riquetsias. | 37 |
| Quadro 3 – Reagentes utilizados para a amplificação do gene <i>OmpA</i> e do gene <i>gltA</i> | 38 |
| Quadro 4 – Ciclos e condições da Reação de PCR dos genes. | 38 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1– Características das riquetsias de importância na saúde.. | 18 |
| Figura 2 – Resultado da amplificação do gene <i>OmpA</i> em gel de agarose a 2%..... | 40 |
| Figura 3 – Resultado da amplificação do gene <i>gltA</i> em gel de agarose a 2%..... | 41 |

LISTA DE TABELA

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Casos confirmados de Febre Maculosa na Região Centro Oeste do Brasil, por estado, de 2000 a 2016..... | 23 |
|--|----|

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

μL – microlitro

BHI – Brain Heart Infusion

DF – Distrito Federal

DIVAL - Diretoria de Vigilância Ambiental em Saúde

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ETDA – ácido etileno-diamino-tetracético

Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz

FMB – Febre Maculosa Brasileira

GDF - Governo do Distrito Federal

GFM – Grupo da Febre Maculosa

GVAZ - Gerência de Vigilância Ambiental em Zoonoses

HRAN – Hospital Regional da Asa Norte

HRT – Hospital Regional de Taguatinga

LIRN – Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses

LPI – Local Provável de Infecção

mL - mililitro

MS – Ministério da Saúde

$^{\circ}\text{C}$ – graus Celsius

PCR – reação de polimerização em cadeia de DNA

primer – oligonucleotídeo iniciador

RIFI – Reação de imunofluorescência indireta

SES - Secretaria de Estado da Saúde

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

TBE – tri borato

VAS- Vigilância Ambiental em Saúde

VE – Vigilância Epidemiológica

RESUMO

A Febre Maculosa Brasileira (FMB), é uma zoonose reemergente, de notificação compulsória imediata, causada pela *Rickettsia rickettsii*. A transmissão ocorre por picada de carrapatos da família Ixodidae infectados, principalmente, *Amblyomma cajennense*, embora outros vetores como as pulgas, artrópodes pertencentes a classe *Insecta*, ordem *Siphonaptera*, também possam ser agentes transmissores. O objetivo desse estudo foi pesquisar por técnica de reação de polimerização em cadeia de DNA (PCR) a ocorrência da bactéria do gênero *Rickettsia* do Grupo Febre Maculosa em cães recebidos na Gerência em Vigilância Ambiental de Zoonoses do Distrito Federal. Foram analisadas 197 amostras de coágulo de sangue de cães no ano de 2015. Os genes amplificados foram específicos para gene *OmpA* e para o gene *gltA*. Os resultados encontrados foram negativos. Nesse estudo não foi possível detectar por PCR a circulação *Rickettsia* em cães.

Palavras-chave: Febre Maculosa. *Riquetsia*. Cães

ABSTRACT

The Brazilian Spotted Fever (BSF) is a reemerging zoonosis, immediately notifiable caused by *Rickettsia rickettsii*. Transmission is by the bite of infected ticks Ixodidae family mainly *Amblyomma cajennense*, although other vectors such as fleas, arthropods belonging to the class *Insecta*, order *Siphonaptera*, can also be transmitting agents. The objective of this study was to search for polymerization reaction technique on DNA chain reaction (PCR) the occurrence of the genus *Rickettsia* bacteria of the spotted fever group in dogs received in Management in Zoonosis Environmental Surveillance of the Federal District. Were analyzed 197 dog blood clot samples in 2015. The amplified genes were specific for the *ompA* gene and *gltA* gene. The results were negative. In this study, it was not possible to detect by PCR *Rickettsia* circulation in dogs.

Keywords: Spotted Fever. *Rickettsia*. Dogs

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| CAPITULO I | 15 |
| 1 INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 17 |
| 2.1 As riquetsias | 17 |
| 2.2 Histórico | 17 |
| 2.3 Classificação | 18 |
| 2.4 Aspectos epidemiológicos | 19 |
| 2.5 Ciclo biológico dos ixodídeos e correlação com a infecção por riquetsias | 20 |
| 2.6 Vigilância Epidemiológica e Ambiental | 21 |
| 2.7 Dados epidemiológicos de Febre Maculosa Brasileira | 22 |
| 2.8 Dados epidemiológicos de Febre Maculosa Brasileira na Região Centro Oeste | 22 |
| 2.9 O papel do diagnóstico laboratorial na vigilância da FMB | 23 |
| 2.10 Patogênese e aspectos clínicos | 25 |
| 2.11 Febre maculosa em cães | 25 |
| 3 OBJETIVO | 27 |
| REFERÊNCIAS | 28 |
| CAPITULO II | 32 |
| 1 INTRODUÇÃO | 34 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 36 |
| 2.1 Origem das amostras de sangue | 36 |
| 2.2 Protocolo de coleta e armazenamento | 36 |
| 2.3 Extração do DNA das amostras de sanguíneas | 36 |
| 2.4 Reação de Polimerização em Cadeia – PCR | 37 |
| 2.4. 1 Parâmetros de reação de amplificação para o fragmento do gene <i>OmpA</i> e do gene <i>gltA</i> (CS e CS2): | 37 |
| 2.5 Protocolo de amplificação definido para o gene <i>gltA</i> e <i>OmpA</i> | 38 |
| 2.6 Protocolo da visualização da PCR pela a eletroforese em gel de agarose a 2% | 38 |
| 3 RESULTADOS | 40 |
| 4 DISCUSSÃO | 42 |
| 5 CONCLUSÃO | 44 |
| REFERÊNCIAS | 45 |
| ANEXO A | 48 |

CAPITULO I

1 INTRODUÇÃO

As riquetsioses são doenças infecciosas causadas por bactérias Gram-negativas intracelulares obrigatórias, do gênero *Rickettsia*, que são transmitidas por vetores, principalmente por carrapatos. Entre estas doenças a febre maculosa (FM) destaca-se pela a gravidade do quadro clínico, em seres humanos e animais acometidos, (HOOHSTRAAL, 1967; AZA & BEARD, 1998; ACHA & SZYFRES, 1986; BRASIL, 2016c).

As riquetsias têm distribuição mundial com circulação em todos os continentes (MOURA, 2012). No Brasil, há presença das espécies *Rickettsia rickettsii* (KRAWCZAK, et al., 2014) *R. parkeri*, *R. typhi*, *R. amblyommii*, *R. rhipicephali* e *R. monteiroi* (LABRUNA et al., 2011), *R. felis* e *R. bellii* (LOPES, 2012).

A febre maculosa brasileira (FMB) é considerada uma zoonose reemergente, tem sua notificação compulsória no Brasil e apresenta importância na saúde pública devido ao diagnóstico médico tardio e alta letalidade em humanos (BRASIL, 2014c).

Os primeiros registros positivos para riquetsias pertencente ao grupo da febre maculosa (GFM) em cães, no Distrito Federal (DF) foram realizados por Rocha et al., (2013), em pesquisa conjunta com a Universidade de Brasília, Fundação Oswaldo Cruz e a Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal.

Em equinos os primeiros registros no DF foram realizados em pesquisa por Martins (2014), que detectou sorologia positiva para as riquetsias do GFM. Sendo assim, esses primeiros trabalhos são indicativos da circulação do agente etiológico no Distrito Federal.

A FM e outras riquetsioses constam na lista da Portaria N° 204, de 17 de fevereiro de 2016, que atualizou a Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças e agravos (BRASIL, 2016b).

No Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), consta que em Goiás, estado limítrofe do DF, foram notificados 10 casos de FMB humanos entre os anos de 2010 e 2016. O SINAN registrou a ocorrência de dois casos humanos de FMB no DF nos anos de 2005 e 2006 (BRASIL, 2016a).

Este estudo teve como objetivo principal a pesquisa do gênero *Rickettsia* do grupo da febre maculosa (GFM) pelo emprego da técnica de reação de polimerização de DNA

em cadeia, em cães recebidos para observação na Gerência de Vigilância Ambiental de Zoonoses do Distrito Federal em 2015.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 As riquétsias

As riquétsias são Alfabroteobactérias pertencentes a ordem *Rickettsiales* que apresenta duas famílias de importância na saúde pública: *Rickettiaceae* e *Anaplasmataceae*. Os gêneros *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, bioagentes de zoonoses, são microrganismos intracelulares obrigatórios, Gram-negativos, pleomórficos, imóveis, não formadores de esporos, visíveis em microscopia óptica comum, com distribuição geográfica mundial (GARRITY, BELL, LIBURN, 2004; QUINN et al., 2005; MOURA, 2012). Este agente etiológico apresenta duas proteínas de membranas imunogênicas os genes *OmpA*, *OmpB* e *gltA*, que contém epítomos espécie-específico utilizados em reações sorológicas (WALKER, 2007; SAHINI & RYDKINA, 2009).

As riquétsias podem ser visualizadas, ao microscópio, agrupadas em cadeia, formando cocobacilos em pares ou até mesmo isoladamente. A exceção é a *Rickettsia prowazekii*, que não apresenta flagelos; possui três camadas no seu envelope; uma membrana citoplasmática interna, uma parede celular rígida com composição química típica e com aspecto trilaminar (SANGIONI, 2010).

2.2 Histórico

Os primeiros estudos sobre as riquetsioses ocorreram a partir do século XIX, nos Estados Unidos da América (BRASIL, 2016c). As informações a respeito dos primeiros casos da doença foram registradas no ano de 1896 em Idaho, nos Estados Unidos. A doença foi primeiramente denominada de *Rocky mountain spotted fever* (febre maculosa das Montanhas Rochosas) e descrita como uma “doença febril endêmica” (HARDEN, 1990).

Segundo Weiss & Strauss (1991), em 1906 o Dr. Howard Taylor Ricketts identificou o agente etiológico da febre maculosa das Montanhas Rochosas, assim como o conhecimento do carrapato como transmissor da doença. Em homenagem ao pesquisador, o gênero da bacteriano foi denominado de *Rickettsia*.

A FMB teve os seus primeiros registros no Estado de São Paulo no ano de 1929, seguido dos estados do Rio de Janeiro, de Minas Gerais, do Espírito Santos, de Santa Catarina e, recentemente, nos estados do Paraná, Rio Grande Sul, Piauí, Bahia, Ceará,

Piauí, Rondônia, Mato Grosso do Sul, Goiás e o Distrito Federal (LABRUNA et al., 2009; BRASIL, 2016c).

2.3 Classificação

A febre maculosa brasileira (FMB) é causada por *Rickettsia rickettsii* (BRASIL, 2014).

Segundo Sangioni (2010) a Ordem *Rickettsiales* está no Filo das Proteobacterias, Família Rickettsiaceae, Subfamília: Rickettsiae e dos Gêneros: *Rickettsia*, *Coxiella* e *Orientea*. A ordem ainda apresenta a Subfamília Ehrlichiae, com os gêneros: *Ehrlichia* e *NeoRickettsia*, e a família Anaplasmataceae com o Gênero *Anaplasma* (Figura 1).

O Gênero *Rickettsia* foi dividido em quatro grupos de acordo com a filogenética, considerando o material do plasmídeo conjugado com os genes cromossômicos: 1) o Grupo do Tifo (GT) - *Rickettsia prowazekii*, *R. typhi*; 2) o Grupo da Febre Maculosa (FMB) - *Rickettsia rickettsii*, *R. conorii* e *R. sibirica*; 3) o Grupo de Transição (GTr) - *Rickettsia felis*, *R. akari* e *R. australis*; e 4) o Grupo Ancestral (GA) - *Rickettsia bellii* e *R. canadenses* (GILLESPIE et al., 2007).

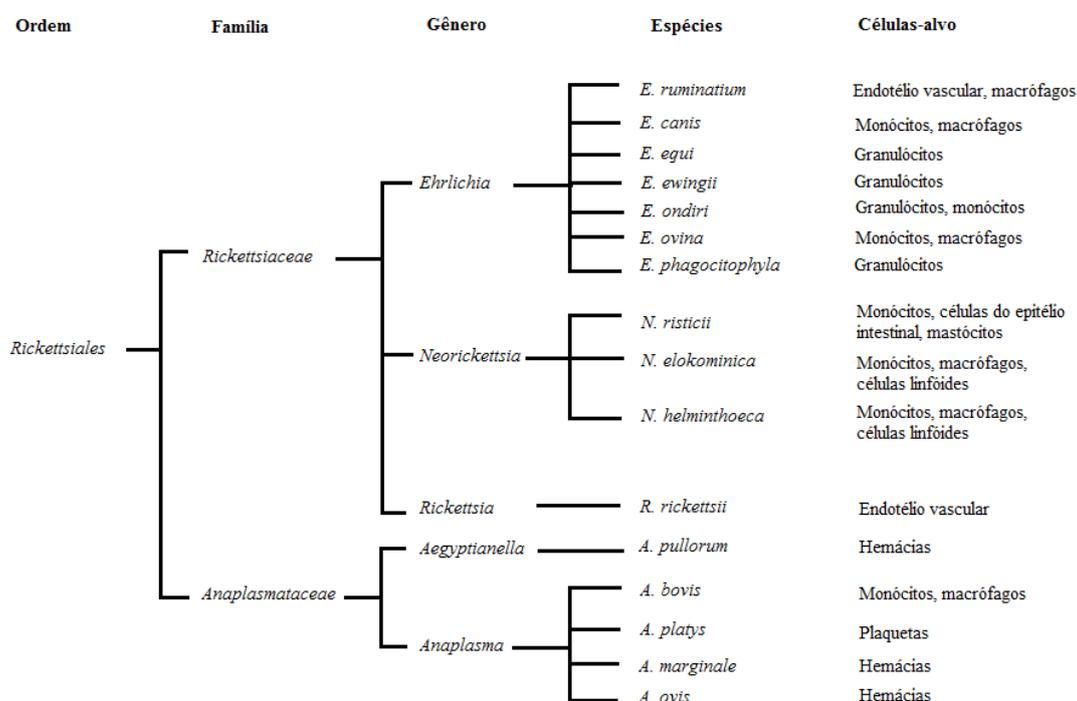


Figura 1– Características das riquetsias de importância na saúde. (Fonte: QUINN et al., 2005).

2.4 Aspectos epidemiológicos

Os casos de FMB tem sido registrada nos estados São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia, Santa Catarina, e partir do ano de 2005, nos estados do Paraná, Rio Grande do Sul, Distrito Federal e Goiás (BRASIL, 2016 a e BRASIL, 2016c).

Os animais vertebrados como cães, cavalos, gatos, capivara, marsupiais, pequenos roedores e outros animais silvestres são os principais hospedeiros da riquetsia e a transmissão podem ocorrer pela da picada de vetores (carrapatos ou pulgas) infectados com a riquetsias. O microorganismo está presente na saliva destes artrópodos (LEMOS, 2004; GAZÊTA et al., 2009).

Os cães podem participar do ciclo de transmissão da FMB, por viverem no domicílio humano e por serem susceptíveis à doença, são considerados animais sentinelas para FMB (PADDOCK et al., 2002; LABRUNA et al., 2009).

Os animais vertebrados podem manter ou amplificar o ciclo enzoótico da riquetsia. Além disso, esses animais podem dispersar carrapatos infectados para animais domésticos ou sinantrópicos, como pode ser visualizado no Quadro 1.

Segundo Labruna (2004) a disponibilidade de vetores em determinado ecótopo pode variar no espaço e no tempo assim como a presença de hospedeiros vertebrados, facilitando a circulação de riquetsias patogênicas.

A transmissão da riquetsia ocorre principalmente, por picada de carrapatos infectados pertencentes a família Ixodidae, sendo o *Amblyomma cajennense* o vetor mais importante da doença. Outros vetores como pulgas pertencentes a classe *Insecta*, ordem *Siphonaptera*, também podem ser agentes transmissores (GEHRKE, 2010).

Os carrapatos são os vetores responsáveis pela manutenção da bactéria *Rickettsia rickettsii* no ambiente silvestre Parola et al., (2014). Nos carrapatos ocorrem a transmissão transovariana e transestadial. Esse mecanismo permite com que uma fêmea ingurgitada transmita o agente para toda sua progênie (LABRUNA 2004; SERRA-FREIRE & MELO, 2006; SANGIONI, 2010).

No Brasil, ocorre a circulação das espécies *Rickettsia rickettsii* (KRAWCZAK et al., 2014) *R. parkeri*, *R. typhi*, *R. amblyommii*, *R. rhipicephali*, *R. monteiroi* (LABRUNA et al., 2009); *R. felis*, *R. bellii* (LOPES, 2012).

Quadro 1 – Vetores e hospedeiros de riquetsias patogênicas do Grupo da Febre Maculosa.

| Riquetsia | Vetor | Hospedeiro | Distribuição |
|---------------------------------|---|---|---|
| <i>Rickettsia rickettsii</i> | <i>Dermacentor andersoni</i> <i>Dermacentor variabilis</i> <i>Amblyomma americanum</i> <i>Rhipicephalus sanguineus</i> <i>Amblyomma cajennense</i> <i>Amblyomma aureolatum</i> | Pequenos mamíferos (roedores, marsupiais, coelhos), cães, eqüinos e aves. | América do Norte, Central e do Sul. |
| <i>Rickettsia conorii</i> | <i>Rhipicephalus sanguineus</i> <i>Rhipicephalus pumilio</i> | Pequenos mamíferos (roedores, marsupiais), cães e aves. | Europa, África, Ásia |
| <i>Rickettsia japonica</i> | <i>Haemaphysalis</i> sp. <i>Dermacentor taiwanensis</i> <i>Ixodes</i> sp. | Roedores, cães | Ásia (Japão, China) |
| <i>Rickettsia africae</i> | <i>Amblyomma variegatum</i> <i>Amblyomma hebraeum</i> | Bovinos, caprinos | África |
| <i>Rickettsia slovaca</i> | <i>Dermacentor reticulatus</i> <i>Dermacentor marginatus</i> | Suínos | Europa, Ásia (Rússia) |
| <i>Rickettsia parkeri</i> | <i>Amblyomma americanum</i> <i>Amblyomma maculatum</i> <i>Amblyomma triste</i> | Cães são apontados como prováveis hospedeiros. | América do Norte e do Sul |
| <i>Rickettsia sibirica</i> | <i>Dermacentor</i> sp. <i>Haemaphysalis</i> sp. <i>Rhipicephalus sanguineus</i> | Roedores, aves | Ásia, África |
| <i>Rickettsia aeschlimannii</i> | <i>Hyalomma marginatus</i> <i>Rhipicephalus appendiculatus</i> | Ovinos, caprinos e bovinos | África, Europa |
| <i>Rickettsia helvetica</i> | <i>Ixodes</i> sp. | Cão, gato, cervídeo | Europa, Ásia |
| <i>Rickettsia honei</i> | <i>Ixodes</i> spp. <i>Rhipicephalus</i> spp. | Lagartos, ofídeo, roedor (<i>Rattus</i>) | Austrália, Ásia |
| <i>Rickettsia australis</i> | <i>Ixodes holocyclus</i> | Roedores, marsupiais | Austrália |
| <i>Rickettsia akari</i> | <i>Liponyssoides sanguineus</i> <i>Alloderm</i> sp. | Roedores | América do Norte, Rússia, África |
| <i>Rickettsia felis</i> | <i>Ctenocephalides felis</i> | Cães, gatos, marsupiais | América do Norte e do Sul, Europa, África, Ásia |

Fonte: adaptado de Schriefer e Azad, 1994; Fournier, Raoult, 2005.

2.5 Ciclo biológico dos ixodídeos e correlação com a infecção por riquetsias

O ciclo biológico geral dos ixodídeos apresenta as fases de ovo, larva, ninfa e adultos. As fêmeas, após os repastos no hospedeiro, depositam seus ovos no solo. A

duração do período de postura pode ser de vários dias e após a oviposição as fêmeas morrem (MONTEIRO, 2010).

O período de eclosão dos ovos depende de condições climáticas, principalmente, de temperatura. Após a eclosão, temos as larvas hexápodes, que permanecem no meio ambiente sobre nas gramíneas e arbustos e evoluem para o estágio de metalarvas e posteriormente para ninfa, ocorrendo neste estágio o enrijecimento da cutícula. Estas ninfas ingurgitam-se e se transformam em adultos (MONTEIRO, 2010).

Os carrapatos se infectam quando fazem o repasto em animais vertebrados que estejam infectados pela *riquétsia*, onde ocorre também a transmissão transovariana e transestadial (SERRA-FREIRE; MELO, 2006; SANGIONI, 2010). O homem adquire a infecção acidentalmente, por meio da picada de vetores infectados, ao entrar em contato com áreas infestadas por carrapatos ou com cães infestados, que transportam os vetores infectados para os domicílios em áreas rurais e urbanas (SERRA-FREIRE; MELO, 2006; SANGIONI, 2010).

2.6 Vigilância Epidemiológica e Ambiental

A FM e outras riquetsioses constam na Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo território nacional (BRASIL, 2016c). Os órgãos de saúde, nas esferas municipal, estadual e federal são obrigados a notificarem a ocorrência da doença em até 24 horas após a suspeita da doença (BRASIL, 2016c).

A Vigilância epidemiológica (VE) é um conjunto de ações que proporcionam o conhecimento, a detecção ou a prevenção de quaisquer mudanças nos fatores determinantes e condicionantes de saúde individual ou coletiva, com a finalidade de recomendar e adotar as medidas de prevenção e controle das doenças ou agravos (BRASIL, 1990).

A Vigilância Ambiental em Saúde (VAS) é um conjunto de ações que proporciona o conhecimento, a detecção ou prevenção de qualquer mudança nos fatores determinantes e condicionantes do meio ambiente que interferem na saúde humana, com a finalidade de recomendar e adotar as medidas de prevenção e controle dos fatores de riscos e das doenças ou agravos, em especial as relativas a vetores, reservatórios, hospedeiros e animais peçonhentos e fatores não biológicos (BRASIL, 2002).

VE e VAS tem funções específicas com interfaces, desenvolvidas continuamente, no propósito de conhecer o comportamento da doença. Com finalidades de adotar ações de promoção para saúde pública (BRASIL, 2016c).

Brasil (2016c), a vigilância da FMB abrange a vigilância epidemiológica e ambiental dos vetores, reservatórios e dos hospedeiros, com objetivos de:

- Detectar e tratar precocemente os casos suspeitos visando reduzir a letalidade.
- Investigar e controlar surtos, mediante adoção de medidas de prevenção e controle.
- Conhecer a distribuição da doença, (lugar, tempo e pessoa).
- Identificar e investigar os locais prováveis de infecção - LPI.
- Recomendar e adotar medidas de prevenção e controle.

Para o conhecimento do ciclo em determinada área deve-se observar dois principais fatores:

1. O vetor capaz de manter o ciclo enzoótico da riquetsia infectando animais (GAZÊTA, 2012a).

2. Quais animais estão servindo como hospedeiros para os vetores e disseminando os carrapatos infectados em regiões sem a doença (GAZÊTA, 2012a).

O surgimento de surtos epidêmicos de casos humanos está fortemente associado a ocupação no ambiente rural pelo homem; com a sazonalidade dos vetores; e com a variação das condições ambientais, o que torna mais complexa a epidemiologia das riquetsioses (GAZÊTA, 2012b).

2.7 Dados epidemiológicos de Febre Maculosa Brasileira

No Sistema de Informação de Agravo de Notificação (SINAN) do Ministério da Saúde estão registrados em todo Brasil 1.525 casos da doença em humanos em uma série histórica dos anos de 2000 a 2016. Destes casos, 470 pacientes foram a óbito, o que representa uma letalidade de 30, 81% (BRASIL, 2016a).

2.8 Dados epidemiológicos de Febre Maculosa Brasileira na Região Centro Oeste

Entre os anos de 2000 e 2016 na Região Centro Oeste do Brasil (Tabela 1) ocorreram 12 casos confirmados de FMB. Entre esses, apenas 2 casos ocorreram no

Distrito Federal, sendo 1 caso no ano de 2005 e 1 em 2006. No Estado de Goiás foi confirmado o maior número com registro de 10 casos (BRASIL, 2016a).

Nos Estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul ainda não houve registro da doença. Não existe registro de óbito por FMB no Centro Oeste brasileiro (BRASIL, 2016a).

Tabela 1– Casos confirmados de Febre Maculosa na Região Centro Oeste do Brasil, por estado, de 2000 a 2016.

| Estados de notificação da Região Centro Oeste, do ano de 2000 a 2016 | | | | |
|---|-------------------------|--------------|--------------------|------------------------|
| Ano | Distrito Federal | Goiás | Mato Grosso | Mato Grosso Sul |
| 2000 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2001 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2002 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2003 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2004 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2005 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 2006 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 2007 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2008 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2009 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2010 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 2011 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2012 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| 2013 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2014 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| 2015 | 0 | 4 | 0 | 0 |
| 2016* | 0 | 1 | 0 | 0 |

Fonte: Brasil, (2016). * Informações até 27 de abril de 2016.

2.9 O papel do diagnóstico laboratorial na vigilância da FMB

O diagnóstico em tempo hábil e diferencial de outras riquetsioses e de outras doenças com sinais clínicos similares é determinante para o tratamento adequado do paciente. Auxilia também no direcionamento dos serviços de vigilância e contribui para a diminuição do número de novos casos e óbitos (GAZÊTA, 2012b; BRITES & DUARTE, 2010), bem como este diagnóstico é um instrumento essencial para definição de medidas preventiva e de controle (BRASIL, 2016c).

Os métodos diagnósticos mais utilizados para o diagnóstico riquetsioses são: as técnicas sorológicas, genômicas, detecção de antígenos e isolamento. Esses diagnósticos são realizados tanto em humanos quanto em animais hospedeiros, reservatórios e vetores (SCOLA & RAUOLT, 1997; BRITES & DUARTE, 2010; BRASIL, 2016c).

A reação de polimerização em cadeia é a amplificação de um segmento de específico de DNA dentro do genoma, que permite a replicação *in vitro* do DNA. Foi desenvolvido na década de 1980 pelo pesquisador Kary Mullis, que conseguiu pela primeira vez replicar fragmentos de DNA (Saiki et al., 1988).

A técnica de reação de polimerização em cadeia de DNA (PCR), que permite a detecção e identificação mais rápida e específica da riquetsia, vem sendo empregada para diagnósticos em animais, vetores e humanos. Esse método, com as recentes análises de sequências de bases de fragmentos de genes riquetsiais, permite a diferenciação de diferentes espécies de riquetsias (EREMEEVA & RAUOLT, 1994; SCOLA & RAUOLT, 1997; MILAGRES, 2004). Segundo Sangioni (2003), a PCR tem assumido relevância na detecção de espécies do gênero *Rickettsia* em animais, humanos e vetores. Sendo possível a caracterização de espécies já conhecidas como a *Rickettsia rickettsii* e outras como a *R. felis*.

A PCR tem como vantagem, a possibilidade de realizar o diagnóstico de infecções no seu processo agudo, com a detecção de DNA da riquetsia a partir de sangue e outros tecidos antes mesmo da formação de anticorpos (LEMOS, 2004).

O uso da PCR, realizada em amostras de sangue e coágulos formados a partir da centrifugação do sangue coletado assim como de outros tecidos, tem a vantagem de ser um método rápido de diagnóstico além de possibilitar melhor e mais adequada caracterização dos dois principais grupos de riquetsias (BRASIL, 2016c).

Outras formas de diagnóstico utilizam as técnicas da histopatologia e a imunohistoquímica e são realizadas em lesões de pele, fragmentos de pulmão, fígado, baço, coração, cérebro (BRITES & DUARTE, 2010; BRASIL, 2016c).

O isolamento do agente etiológico do GFM em humanos pode ser realizado a partir do coágulo de sangue ou de fragmento de tecidos (pele e pulmão obtidos por biópsia). As amostras desses tecidos devem ser imersas em infusão de *Brain Heart Infusion* (BHI) Brasil, (2014c) e podem ser cultivadas em monocamadas de células Vero (SCOLA & RAUOLT, 1997). Pode ser também realizado de hospedeiros e vetores, entretanto, técnicas de cultivo exigem nível de biossegurança 3 (NB 3) (BRASIL, 2016c).

A técnica recomendada e adotada como padrão ouro pelo o Ministério da Saúde é reação de imunofluorescência indireta (RIFI), adequada para detecção de anticorpos IgG e IgM após o período de 7 a 10 dias da infecção. Esta técnica apresenta como vantagens: ser simples, apresentar baixo custo, ter alta sensibilidade e especificidade para as riquetsioses (BRASIL, 2016c).

A RIFI é amplamente utilizada em estudos e inquéritos soroepidêmicos como diagnóstico de escolha na fase aguda da doença. A RIFI apresenta como desvantagens a ocorrência de reação cruzada com riquetsia do grupo tifo, dengue, leptospirose e outras doenças (GALVÃO et al., 2005; BRITES NETO & DUARTE, 2010; BRASIL, 2016c). De forma negativa, a RIFI não permite a identificação do gênero do microorganismo (SCOLA & RAUOLT, 1997).

A detecção de anticorpos pela sorologia pode demorar pelo menos duas semanas após a infecção e por este motivo é recomendado que sejam feitos testes pareados com uma coleta de soro no primeiro dia da doença e a segunda coleta entre 14 e 21 dias após o início dos sinais clínicos (BRASIL, 2016c; GANTA, 2016).

2.10 Patogênese e aspectos clínicos

As riquetsias por serem patógenos intracelulares obrigatórios apresentam um mecanismo de invasão intracelular mediado por adesinas, que são capazes de se ligarem a receptores celulares. O bioagente faz adesão ao receptor Ku70 da célula por meio de adesinas *OmpA* ou *OmpB*, a enzima ubiquitina ligase é atraída e liga-se ao receptor Ku70 juntamente com a proteína *RickA*, que ativa mecanismos de fagocitose da bactéria pela a célula. No interior da célula, a bactéria passa a comandar o funcionamento celular e posterior destruição celular (WALKER, 2007; SAHNI & RYDKINA, 2009).

Logo após a invasão intracelular ocorrem lesões celulares por meio da produção de oxigênio reativo e aumento na permeabilidade vascular, causada pela bactéria (WALKER, 2007; SAHNI & RYDKINA, 2009).

A FMB é uma doença multissistêmica, apresenta um curso variável, desde um quadro clínico clássico a abrupto. Os casos mais severos podem levar a quadro de neurológicos de encefalite, insuficiência respiratória, insuficiência renal. Os sinais são inespecíficos variando febre alta, cefaleia, mialgia intensa, náuseas, vômitos; podendo evoluir para exantema, equimoses e nos casos graves complicações sistêmicas, se não tratada pode chegar a uma letalidade de 80% (SAHNI & RYDKINA, 2009; BRASIL, 2016c).

2.11 Febre maculosa em cães

Nos Estados Unidos, principalmente em áreas de ocorrência de Febre Maculosa, vem sendo relatada a infecção em cães com sinais clínicos semelhantes a dos humanos

(DAVIDSON et al., 1990). Em *Rhipicephalus sanguineus*, o carrapato do cão, foi detectada pela primeira vez em 2009 no estado do Rio de Janeiro, a *Rickettsia rickettsii* (GEHRKE, 2010). Os cães são considerados importantes hospedeiros sentinelas da FMB por ser susceptíveis *Rickettsia rickettsii* (BRITES NETO & DUARTE, 2010).

A FMB tem sido descrita em seres humanos em vários estados brasileiros, no entanto, esse fenômeno não tem ocorrido com a população de cães, mesmo sendo muito mais expostos aos vetores potenciais de *Rickettsia rickettsii* e outras *rickettsias* (FORTES et al., 2011).

3 OBJETIVO

Pesquisar por técnica de reação de polimerização em cadeia de DNA (PCR) a ocorrência da bactéria do gênero *Rickettsia* do Grupo Febre Maculosa em cães recebidos na Gerência em Vigilância Ambiental de Zoonoses do Distrito Federal.

REFERÊNCIAS

ACHA, M.A.; SZYFRES, B., **Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre e a los animales**. 2. ed. Washington (DC): Organización Panamericana de la Salud; 1986. (OPAS - Publicacion Cientifica, 503).

AZA, A. F.; BEARD, C. B. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. **Emerging infectious diseases**. Atlanta, v.4, n. 2 p. 179-186, 1998.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Febre Maculosa: Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN, 2016a, disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/693-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/febre-maculosa/11269-situacao-epidemiologica-dados>. Acesso em: 11 jun. 2016.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. Vigilância Ambiental em Saúde. Brasília: FUNASA, 2002. 42p. disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_sinvas.pdf. Acessado em: 28 ago. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Nº 204, de 17 de fevereiro de 2016b, Define a Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo território nacional, nos termos do anexo, e dá outras providências. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/>. Acesso em: 21 jul. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2016c. 1. ed. 773 p. disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/>. Acesso em: 26 out. 2016.

BRASIL. Lei 8080 de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L8080.htm. Acesso em: 28 ago.2016.

BRITES-NETO, J.; DUARTE, K.M.R. Diagnostic assays for Rickettsiosis infectiveness. *Revue Méd. Vet.*, Toulouse, FR, v. 161, n. 4 p. 167-172, 2010.

DAVIDSON, M. G.; et al., Vascular permeability and coagulation during *Rickettsia rickettsia* infection in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, n. 1 p. 165-170, 1990.

EREMEEVA, M.; RAOULT, D., Differentiation among spotted fever group rickettsiae species by analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR – amplified DNA. **J. Clin. Microbiol**, n. 32, p. 803-810. 1994.

FORTES, F. S. et al., **Febre Maculosa em cães**. *Ciências Agrárias*, v.32 n.1 p. 339-354, Londrina, 2011.

FOURNIER, P. E.; and RAOULT, D. Mediterranean spotted fever and other tick-bone rickettsioses. In: Goodman, J. L.; Denis, D. T.; Sonenshine, D. E. ed. **Tick-Bone Dis. Hum.** Asm Press, Washington, DC. p. 418, 2005.

GALVÃO, M. A. et al., Spotted fever rickettsiosis in Coronel Fabriciano, Minas Gerais State, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** n. 36 p. 479-481, 2005.

GANTA, R.R. **Rickettsiaceae e Coxiellaceae.** Cap. 40, In: MCVEY, D. Scott; KENNEDY, Melissa; CHENGAPPA, M.M., 3. ed. Microbiologia Veterinária – Rio de Janeiro, editora: Guanabara Koogan, 2016, p. 301 – 302.

GARRITY, G.M.; BELL, J. A.; LILLBURN, T. G. **Bergey`s Manual of systematic of bacteriology.** n. 2. Ed. Baltimore, 2004.

GAZÊTA, G.S et al., Potential vectors and hosts of Rickettsia spp: epidemiological studies in the Vale do Paraíba, state of Rio de Janeiro/Brazil. **Clin. Microbiol. Infect.** n.15 p. 269 – 270, 2009.

GAZÊTA, G.S. **Diagnóstico das riquetsias aplicado à vigilância do ambiente.** Brasília, Ministério da Saúde, Fiocruz. Curso de Capacitação em Vigilância de Ambientes de Febre Maculosa e outras riquetsioses. Brasília. Material em mídia eletrônica. 2012a.

GAZÊTA, G.S. **Vetores e hospedeiros de riquetsia.** Brasília, Ministério da Saúde, Fiocruz. Curso de Capacitação em Vigilância de Ambientes de Febre Maculosa e outras riquetsioses. Material em mídia eletrônica. 2012b.

GEHRKE, F. de S. **Deteção e caracterização molecular de riquetsias em humanos, potenciais vetores e animais domésticos da região sudeste do Brasil.** Tese de Doutorado em Zoonose – Departamento de Zoologia. Universidade de São Paulo, 2010.

GILLESPIE, J. J. et al., **Plasmids and Rickettsial Evolução:** Insight from Rickettsia felis, PLoS ONE, v. 2 n. 3, 2007.

HARDEN, V. A. **Rocky mountain spotted fever.** Baltimore: The Johns Hopkins University Press, p. 8, 1990.

HOOGSTRAAL, H. Ticks in relation to human diseases caused by Rickettsia species. **Annu Rev. Entomol,** n. 12, p. 377-420, 1967.

KRAWCZAK, F. S. et al. Rickettsial infection in Amblyomma cajennense ticks and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in a Brazilian spotted fever-endemic area. **Parasites & Vectors,** 2014.

LABRUNA, M. B.; et al.; Rickettsiosis en América Latina, el Caribe, España y Portugal. **Rev. MVZ Córdoba,** v.16 n. 2 p. 2435-2457, 2011.

LABRUNA, M. B. et al., Rocky Mountain spotted fever in dogs, Brazil. **Emerging Infectious Diseases,** v. 15, n. 3, p. 458-460, 2009.

LABRUNA, M.B. **Carta Acarológica Brasileira de Parasitologia Veterinária,** Ouro Preto, v.13, p. 199-202, set. 2004.

LABRUNA, M.B. **Ecology of rickettsia in South America**. Ann N Y Acad Sci. n. 1166 p.156 – 166, 2009.

LEMOS, E. R.S. Investiga o sobre as rickettsioses: diagnósticos e avanços, In: **consulta de especialistas OPAS/OMS sobre rickettsioses nas américas**. Ouro Preto, p. 53, 2004.

LOPES, M. G., **Infec o por Rickettsia spp em equídeos e carrapatos do Centro-Norte do Piaul **. Disserta o de Mestrado - Universidade de São Paulo: USP, 2012.

MARTINS, G. P., **Detec o sorológica de riquétsias do grupo da febre maculosa e levantamento acarol gico em equinos no Distrito Federal, Brasília**. Disserta o de Mestrado – Universidade de Brasília – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2014.

MILAGRES, B.S., **Perfil sorológico de alguns infec es em capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) capturas nos estados de São Paulo e Minas Gerais, Brasil**. 2004. 65p. Disserta o (Mestrado) – Univerdade de Federal de Viçosa, 2004.

MONTEIRO, S.G., **Parasitologia na medicina veterinária**. Ed. 1 ed., São Paulo: ROCA 2010, p. 8-12.

MOURA, N. O., **Detec o e caracteriza o molecular de riquétsias em potenciais vetores procedentes de foco ativos de febre maculosa do Estado do Rio de Janeiro**. Disserta o de Mestrado – Universidade de São Paulo – 2012.

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

PAROLA, P., et al. Update on Tick-Borne *Rickettsioses* around the World: a Geographic Approach. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 27 n.1 p.166. 2014.

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

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

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

SAIKI, R. K. et al. **Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase**. *Science* 239, 487 – 491 1988.

SANGIONI, L.A. **Pesquisa de infec o por riquétsias do grupo da febre maculosa em humanos, cães, equinos e em adultos de *Amblyomma cajennense*, em região endêmica e não endêmica do estado de São Paulo**, 2003. 86f. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo e Zootecnia, 2003.

SANGIONI, L.A. **Rickettsias**. Cap. 17, In: MONTEIRO, S. G., 1. ed. Parasitologia na Medicina Veterinária. São Paulo, editora ROCA, 2010, p. 169 – 178.

SCHRIEFER, M.E.; AZAD, A. F. **Changing ecology of Rocky Mountain spotted fever**. In: SONENSHINE, D.E.; MATHER, T. N.; eds. Ecological Dynamics of Tick-Borne Zoonoses. Oxford: Oxford University Press, p. 314, 1994.

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

SERRA-FREIRE, N.M.; MELO, R.P. **Entomologia e Acarologia na Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, LF livros, 2006. 200 p.

WALKER, D.H. Rickettsiae and Rickettsial Infections: The Current State of Knowledge. **Clinical Infectious Diseases**. v. 45 p. 39-44, Galveston, 2007.

WEISS, E.; STRAUSS, B. The and career of Howard Taylor Ricketts. **Review of Infectious Diseases**. v.13, p.1241 – 1242. 1991.

CAPITULO II

RESUMO

A Febre Maculosa Brasileira (FMB), é uma doença infecciosa reemergente, de notificação compulsória imediata, causada pela *Rickettsia rickettsii*. A transmissão ocorre por picada de carrapatos da família Ixodidae infectados, principalmente, *Amblyomma cajennense*, embora outros vetores como as pulgas, artrópodes pertencentes a classe *Insecta*, ordem *Siphonaptera*. O objetivo desse estudo foi pesquisar por técnica de reação de polimerização em cadeia de DNA (PCR) a ocorrência da bactéria do gênero *Rickettsia* do Grupo Febre Maculosa em cães recebidos na Gerência em Vigilância Ambiental de Zoonoses do Distrito Federal. Foram analisadas 197 amostras de coágulo de sangue de cães no ano de 2015. Os genes amplificados foram específicos para gene *ompA* e para o gene *gltA*. Os resultados encontrados foram negativos. Nesse estudo não foi possível detectar por PCR a circulação *Rickettsia* em cães.

Palavras-chave: Febre Maculosa. Riquetsia. Cães.

ABSTRACT

The Brazilian Spotted Fever (BSF) is an infectious disease notifiable mainly caused by *Rickettsia rickettsii* transmitted by ticks. Transmission is by the bite of infected ticks Ixodidae family mainly *Amblyomma cajennense*, although other vectors such as fleas, arthropods belonging to the class *Insecta*, order *Siphonaptera*, can also be transmitting agents. The objective of this study was to search for polymerization reaction technique on DNA chain reaction (PCR) the occurrence of the genus *Rickettsia* bacteria of the spotted fever group in dogs received in Management in Zoonosis Environmental Surveillance of the Federal District. Were analyzed 197 dog blood clot samples in 2015. The amplified genes were specific for the *ompA* gene and *gltA* gene. The results were negative. In this study, it was not possible to detect by PCR *Rickettsia* circulation in dogs.

Keywords: Spotted Fever. *Rickettsia*. Dogs.

1 INTRODUÇÃO

A Febre Maculosa Brasileira (FMB) e outras riquetsioses são doenças infecciosas causadas por bactérias pertencentes a ordem *Rickettsiales*, família *Rickettiaceae*, gênero *Rickettsia*. Após estudos filogenéticos o gênero *Rickettsia* foi dividido em quatro grupos: 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 são microorganismos intracelulares obrigatórios, Gram-negativos, cocobacilares, pleomórficos, imóveis, não formadores de esporos, visíveis em microscopia óptica comum (HOOHSTRAAL, 1967; GARRITY, BELL & LIBURN, 2004).

Apresentam distribuição mundial, com vários hospedeiros vertebrados, sendo transmitidas por vetores, principalmente por carrapatos da família Ixodidae, cujos membros servem como reservatórios capazes de manter a bactéria por gerações, através da transmissão transovariana e transtadial (HOOHSTRAAL, 1967; GARRITY, BELL & LIBURN, 2004; LABRUNA 2004).

As espécies *Amblyomma cajennense*, *A. cooperi* (*dubitatum*) e *A. aureolatum* são os principais vetores e reservatórios, entretanto, a espécie *Rhipicephalus sanguineus*, pode também ser um potencial vetor e reservatório. A transmissão aos hospedeiros pode ocorrer através do repasto de carrapatos infectados e com tempo médio de fixação no corpo de 4 a 6 horas (BRASIL, 2016c). As pulgas, da classe Insecta, ordem Siphonaptera, também são, ocasionalmente, transmissoras da afecção (GEHRKE, 2010).

Segundo Moura (2012), as riquetsias têm distribuição geográfica em todos os continentes, com casos confirmados. No Brasil, a circulação das espécies *Rickettsia rickettsii* (KRAWCZAK et al., 2014), *R. parkeri*, *R. typhi*, *R. amblyommii*, *R. rhipicephali*, *R. monteiroi* (LABRUNA et al., 2009) e *R. felis*, *R. bellii* (LOPES, 2012), tem sido notificada nas regiões do sudeste, nordeste, sul e norte.

A FMB causada por *Rickettsia rickettsii*, se apresenta de forma endêmica nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais, Santa Catarina, Mato Grosso do Sul, Goiás, Distrito Federal, Bahia, Ceará e Rodônia (BRASIL, 2016c).

Atualmente, FMB é considerada uma zoonose reemergente no Brasil, de importância na saúde pública devido ao diagnóstico médico tardio e alta letalidade em humanos (BRASIL, 2016c).

A FM e outras riquetsioses são doenças de Notificação Compulsória (Brasil, 2014c). No Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) do Ministério da Saúde estão registrados no Brasil 1.525 casos da doença em humanos em uma série histórica do ano de 2000 a 2016. Destes casos, 470 pacientes foram a óbito. O que representa um índice de letalidade em média 30, 81% (BRASIL, 2016a).

No Distrito Federal (DF) nos anos de 2005 e 2006, foram confirmados dois casos de Febre Maculosa Brasileira em humanos (BRASIL, 2016a).

Os animais vertebrados, principalmente os silvestres, são os hospedeiros da *Rickettsia rickettsii*. Os cães participam deste ciclo como carreadores de carrapatos dos ambientes de animais silvestres para o peri domicílio (PADDOCK et al., 2002; LABRUNA et al., 2009) e exercem um papel relevante na ecoepidemiologia da FMB, pois esses animais podem atuar como sentinelas e contribuir, diretamente, para esclarecer os aspectos ecológicos e sanitários do comportamento e dinâmica da doença (PADDOCK et al., 2002; LABRUNA et al., 2009).

No DF, Rocha et al. (2013), relataram, os primeiros registros soropositivos em cães para *riquétsia* pertencente ao grupo da febre maculosa (GFM) e, mais recentemente Martins (2014), detectou sorologia positiva para as *riquéstias* do GFM em equinos.

Sabendo que cães e equinos no DF apresentaram resultados positivos ao teste de imunofluorescência para a afecção, este estudo teve como objetivo principal a pesquisa do gênero *Rickettsia* pelo método de reação de polimerização em cadeia do DNA, em amostras sanguíneas obtidas de cães encaminhados para observação na Gerência de Vigilância Ambiental de Zoonoses do Distrito Federal.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Origem das amostras de sangue

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animal, CEUA – Universidade Brasília (UnBDOC N° 14487/2015).

A pesquisa foi realizada entre os meses de janeiro a dezembro do ano de 2015 e foram utilizadas 197 amostras de sangue de cães domésticos (*Canis lupus familiaris*) para o diagnóstico por (PCR).

As amostras foram provenientes de animais que deram entrada e foram alojados na Gerência de Vigilância Ambiental em Zoonoses (GVAZ) da Diretoria de Vigilância Ambiental em Saúde (DIVAL), oriundos de várias localidades do Distrito Federal. Os animais alojados foram classificados como: cães errantes, cães recolhidos e ou cães entregues no Canil da GVAZ. Os animais utilizados no projeto foram escolhidos de forma aleatória, independentemente de idade, raça e gênero, constituindo uma amostra de conveniência.

2.2 Protocolo de coleta e armazenamento

As coletas de sangue foram realizadas de segunda a sexta-feiras, no período da manhã. Todos os cães foram identificados, de acordo com a ficha própria de identificação da DIVAL onde constavam os seguintes dados: Número de identificação, data coleta, nome do proprietário, localidade, cidade, nome do cão, raça, idade, gênero e cor da pelagem.

Foram coletados 5 mL de sangue, de cada animal, por meio de punção venosa periférica da veia cefálica. Estas amostras sanguíneas foram acondicionadas em tubos de ensaio de 10 mL sem anticoagulante.

Após a coleta o sangue foi centrifugado em centrífuga de bancada NT 810 na velocidade de 5000 rotações por 10 minutos. Posteriormente foram separados o soro dos coágulos sanguíneos. Em seguida, os coágulos foram armazenados em freezer a -20°C .

2.3 Extração do DNA das amostras de sanguíneas

Os coágulos de sangue canino foram submetidos ao protocolo empregado para as extrações do DNA genômico, conforme recomendação do fabricante do Kit Extract-N-Amp™ Tissue PCR da SIGMA-ALDRICH®. As extrações foram realizadas no

Laboratório de Microbiologia Médica da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília e no Laboratório de Diagnóstico de Raiva da Gerência de Vigilância Ambiental de Zoonoses do Distrito Federal.

2.4 Reação de Polimerização em Cadeia – PCR

A PCR foi realizada utilizando-se o DNA genômico extraído dos coágulos sanguíneos, conforme descrito anteriormente. Os *primers* utilizados foram os do gênero-específicos (*gltA*) para a detecção de *Rickettsia prowazekii* (Azad & Beard, 1990) e *primers* grupo-específicos para detecção de *R. rickettsii* (*OmpA*) (Regnery, Spruill e Plikaytis, 1991) em reação realizada de acordo com (EREMEEVA et al., 1994) (Quadro 2).

Os parâmetros e protocolos de reação para os genes os *genes gltA* e *OmpA* encontram-se demonstrados nos Quadros 3 e 4.

Como controle positivo, foram utilizados os *genes gltA* e *OmpA*, gentilmente cedidos pelo Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses, da Fundação Oswaldo Cruz, LIRN/Fiocruz/RJ e como controle negativo foi utilizada água miliQ. Para a visualização do fragmento de DNA amplificado, as amostras serão submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2%, coradas por brometo de etídeo e observadas em luz de ultravioleta (SAMBROOK, et. al., 2001).

Quadro 2 – Oligonucleotídeos utilizados para identificação genotípica de riquetsias.

| Gene | Espécie de origem | Pares de “Primer” | Sequência de nucleotídeo (5’ – 3’) | Amplicon (pb) |
|-------------|----------------------|----------------------------|---|---------------|
| <i>OmpA</i> | <i>R. rickettsii</i> | Rr 190.70p Rr 190.602n | ATGGCGAATATTTCTCCAAA AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT | 532 |
| <i>gltA</i> | <i>R. prowazekii</i> | Rp CS. 877p RpCS. 1258n | GGGGCCTGCTCACGGGGG ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA | 381 |

Fonte: Regnery, Spruill, Plikaytis, 1991; Eremeeva et al., (1994) Nota: PB= Pares de bases (tamanho do produto amplificado)

2.4. 1 Parâmetros de reação de amplificação para o fragmento do gene *OmpA* e do gene *gltA* (CS e CS2):

A relação dos reagentes e suas respectivas concentrações na mix utilizada no processo de amplificação do alvo de *OmpA* (190) – 532 pares de bases e do *gltA* – 381 pares de bases das riquetsias, conforme descritas para os genes (Quadro 3).

Quadro 3 – Reagentes utilizados para a amplificação do gene *OmpA* e do gene *gltA*.

| Reagentes | Concentração do gene <i>OmpA</i> | Concentração do gene <i>gltA</i> | Volume |
|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------|
| Extract- N- Amp PCR reaction mix | - | - | 10 µL |
| Primer F | 10 mM/ µL | CSF 10 mM/ µL | 0.75 µL |
| Primer R | 10 mM/ µL | CSR 10 mM/ µL | 0.75 µL |
| H2O MiliQ | - | - | 5 µL |
| DNA | 25 ng/uL | 25 ng/uL | 4 µL |

2.5 Protocolo de amplificação definido para o gene *gltA* e *OmpA*

As amostras e etapas do processo de amplificação do gene *gltA* (CS e CS2) 381 pares de bases – 30 ciclos e do gene *OmpA* (190) – 532 pares de bases– 35 ciclos - foram colocadas no Termociclador BIO-RAD®, conforme as condições descritas para gene (Quadro 4).

Quadro 4 – Ciclos e condições da Reação de PCR dos genes.

| Etapas dos genes | Temperatura gene <i>gltA</i> | Duração gene <i>gltA</i> | Temperatura gene <i>OmpA</i> | Duração gene <i>OmpA</i> |
|--|------------------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------|
| Etapa 1 - desnaturação | 95°C | 3 minutos | 95°C | 5 minutos |
| Etapa 2 – desnaturação – anelamento e extensão | 95°C | 15 segundos | 95°C | 20 segundos |
| Anelamento e extensão | 48°C | 30 segundos | 48°C | 30 segundos |
| Anelamento e extensão | 72°C | 30 segundos | 60°C | 2 segundos |
| Etapa 3 – extensão final | 72°C | 7 minutos | 60°C | 10 minutos |
| Final | 4 °C | ∞ | 4 °C | ∞ |

2.6 Protocolo da visualização da PCR pela a eletroforese em gel de agarose a 2%

As amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2% (foi adicionado solução de 1X TBE 0.13 M Tris borato, 2.5 de EDTA e pH 7.0,

Sigma®), em cuba horizontal com tampão de corrida à 70 volts por aproximadamente uma hora (SAMBROOK et al., 2001).

As amostras foram coradas em solução de brometo etídio (0,5 µg/mL) por 20 minutos e a observação dos amplicons (positivo - controle) foi realizada em transiluminador ultravioleta (SAMBROOK et al., 2001).

3 RESULTADOS

Os genes *OmpA* e *gltA* não foram amplificadas em nenhuma das 197 amostras de de DNA utilizadas. Não foi possível a detecção de *Rickettsia* nas amostras neste estudo (Figuras 2 e 3).

Não houve amplificação para o gene *OmpA*, com tamanho esperado de 532pb em nenhuma das amostras testadas para PCR (amplicons)

Os resultados das amostras analisadas foram considerados negativos.

Por não ter sido possível detectar o gene, não foram selecionadas amostras para caracterização do bioagente.

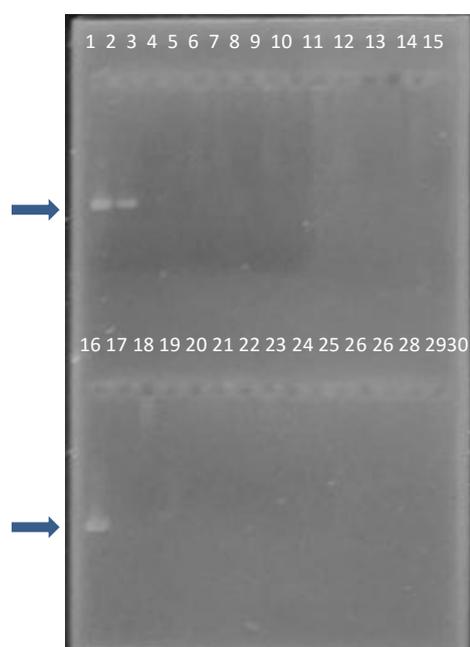


Figura 2 – Resultado da amplificação do gene *OmpA* em gel de agarose a 2%.

Os amplicons 1, 2 e 16 apresentam a amplificação dos controles positivos para o gene *OmpA*, com tamanho esperado de 532pb (setas).

Não houve amplificação para o gene *gltA*, com tamanho esperado de 381pb nas amostras testadas para PCR (amplicons).

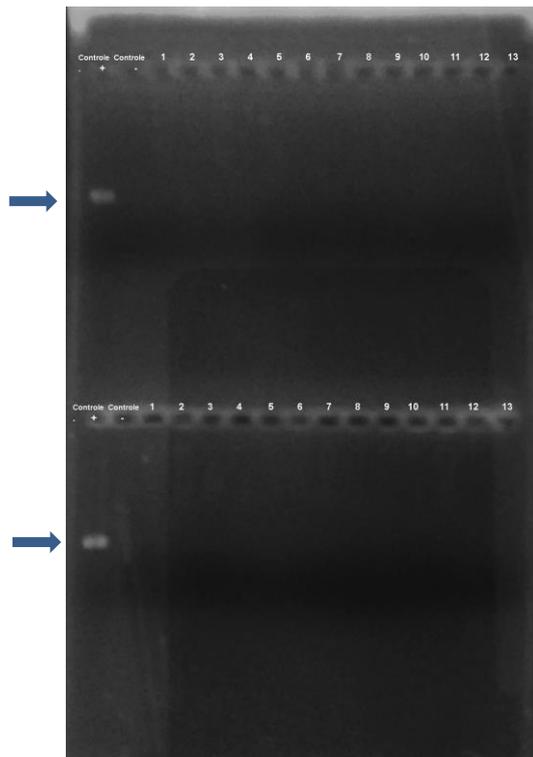


Figura 3 – Resultado da amplificação do gene *gtlA* em gel de agarose a 2%.

Os amplicons marcados são as amplificações dos controles positivos para o gene *gtlA*, com tamanho esperado de 381pb. O amplicon 1 apresenta a amplificação do controle positivo com tamanho esperado de 381pb.

4 DISCUSSÃO

Os resultados negativos obtidos por PCR para amplificação dos genes *OmpA* e gene *gltA* nessa pesquisa foram semelhantes aos relatados por Navarro (2014) em Minas Gerais onde, em uma área endêmica de FMB com sorologia positiva, a PCR realizada também apresentou resultados negativos.

No DF, Rocha et al., (2013), em seus estudos obtiveram resultados de sorologia reagentes para *riquétsias* pertencente do grupo da febre maculosa por meio da RIFI em sangue (soro) de cães.

Em estudo por Piranda et al., (2008) em Minas Gerais, cães infectados por *R. rickettsii*, apresentaram um período de riquetsemia variável entre 3 a 13 dias. Sendo curto período de riquetsemia desenvolvido em animais infectados. E logo, após esse período, os cães apresentaram sinais de febre, letargia, anorexia e lesões oculares. Em presente estudo os animais não foram por imunofluorescência e nem avaliado clinicamente.

Em áreas silenciosas e endêmicas para FMB as espécies canina e equina podem atuar como dispersores, ampliando e contribuindo para o avanço da doença. Inquéritos soropidemiológico nessas espécies que são considerados sentinelas para circulação de riquetsia (HORTA et al., 2004).

Os estudos de FMB em cães estão relacionados em região de caráter endêmico, principalmente onde há a ocorrência de óbitos humanos, com o diagnóstico laboratorial em animais pela técnica de RIFI (SANGIONNI, 2003).

No Vale do Paraíba, no Rio de Janeiro, Gazêta et al. (2009) investigaram infecção por riquetsias em sangue de cães, equinos e bovinos pela técnica de RIFI e encontraram soroprevalência elevada. No Brasil, este trabalho de Gazêta et al. (2009) constitui um marco da epidemiologia molecular para riquetsia. Foi a primeira vez que utilizaram a PCR e sequenciamento de *R. rickettsii* em cães e equinos naturalmente infectados em área de foco endêmico de ocorrência da FMB em humanos, ressaltando a importância da técnica molecular para caracterizar o agente etiológico.

Em estudos e inquéritos soropidêmicos a RIFI é amplamente utilizadas. A limitação dessa técnica são as reações cruzada que podem ocorrer com riquetsia do grupo tifo, dengue, leptospirose e outras doenças (GALVÃO et al., 2005; BRITES NETO & DURTE, 2010; BRASIL, 2016c). Além de não permitir a identificação do gênero do microorganismo (SCOLA & RAUOLT, 1997). Ainda sim, tem a desvantagem da

detecção anticorpos demorar pelo menos duas semanas após a infecção (BRASIL, 2016c; GANTA, 2016).

A técnica de PCR, com as recentes análises de sequencias de bases de fragmentos de genes riquetsiais, permite a diferenciação de espécies e a detecção e identificação mais rápida e específica da riquetsia. E vem sendo empregada para diagnóstico em animais, vetores e humano (EREMEEVA, 1994; SCOLA & RAUOLT, 1997; MILAGRES, 2004). Outra vantagem da PCR é fazer diagnóstico de infecções no seu processo agudo, a partir de sangue, pele e outros tecidos (LEMOS, 2004).

5 CONCLUSÃO

Nesse estudo *Rickettsia* do GFM pelo o método da PCR, em amostras de coágulo sanguíneos obtidas de cães da Gerência de Vigilância Ambiental de Zoonoses do Distrito Federal, não foi possível identificar cães positivos. Esses resultados podem indicar um cenário de baixa prevalência da FMB no DF, fato corroborado com o registro de apenas 2 casos humanos (BRASIL, 2016c).

Embora não tenham sido encontrados resultados positivos, devemos considerar o papel importante dos cães na cadeia ecoepidemiológica da FMB, principalmente pela existência de parques ecológicos em diversas localidades no DF, que são utilizadas como áreas de lazer e diversão para crianças e adultos, geralmente acompanhados de seus cães, e a presença, nestes parques, de reservatórios e vetores para a doença.

REFERÊNCIAS

AZA, A. F.; BEARD, C. B. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. **Emerging infectious diseases**. Atlanta, v.4, n. 2 p. 179-186, 1998.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Febre Maculosa: **Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN**, 2016a, disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/693-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/febre-maculosa/11269-situacao-epidemiologica-dados>. Acesso em: 11 jun. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Nº 204, de 17 de fevereiro de 2016b, **Define a Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo território nacional, nos termos do anexo, e dá outras providências**. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/>. Acesso em: 21 jul. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016c. 1. ed. 773 p. disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/>. Acesso em: 26 out. 2016.

BRITES-NETO, J.; DUARTE, K.M.R. Diagnostic assays for Rickettsiosis infectiveness. **Revue Méd. Vet.**, Toulouse, FR, v. 161, n. 4 p. 167-172, 2010.

EREMEEVA, M.; RAOULT, D., Differentiation among spotted fever group rickettsiae species by analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR – amplified DNA. **J. Clin. Microbiol**, n. 32, p. 803-810. 1994.

GALVÃO, M. A. et al., Spotted fever rickettsiosis in Coronel Fabriciano, Minas Gerais State, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. n. 36 p. 479-481, 2005.

GANTA, R.R. **Rickettsiaceae e Coxiellaceae**. Cap. 40, In: MCVEY, D. Scott; KENNEDY, Melissa; CHENGAPPA, M.M., 3. ed. Microbiologia Veterinária – Rio de Janeiro, editora: Guanabara Koogan, 2016, p. 301 – 302.

GARRITY, G.M.; BELL, J. A.; LILLBURN, T. G. **Bergey's Manual of systematic bacteriology**. n. 2. Ed. Baltimore, 2004.

GAZÊTA, G.S et al., Potential vectors and hosts of Rickettsia spp: epidemiological studies in the Vale do Paraíba, state of Rio de Janeiro/Brazil. **Clin. Microbiol. Infect.** n.15 p.269 – 270, 2009.

GAZÊTA, G.S. **Diagnóstico das riquetsias aplicado à vigilância do ambiente**. Brasília, Ministério da Saúde, Fiocruz. Curso de Capacitação em Vigilância de Ambientes de Febre Maculosa e outras riquetsioses. Brasília. Material em mídia eletrônica. 2012a.

GAZÊTA, G.S. **Vetores e hospedeiros de riquetsia**. Brasília, Ministério da Saúde, Fiocruz. Curso de Capacitação em Vigilância de Ambientes de Febre Maculosa e outras riquetsioses. Material em mídia eletrônica. 2012b.

GEHRKE, F. de S. **Deteção e caracterização molecular de riquetsias em humanos, potenciais vetores e animais domésticos da região sudeste do Brasil.** Tese de Doutorado em Zoonose – Departamento de Zoologia. Universidade de São Paulo, 2010.

GILLESPIE, J. J. et al., **Plasmids and Rickettsial Evolução:** Insight from Rickettsia felis, PLoS ONE, v. 2 n. 3, 2007.

HOOGSTRAAL, H. Ticks in relation to human diseases caused by Rickettsia species. **Annu Rev. Entomol**, n. 12, p. 377-420, 1967.

HORTA, M. C. **Pesquisa de infecção por riquetsias do grupo da febre maculosa em humanos, equídeos, caninos e em diferentes estádios de vida de *Amblyomma cajennense*, provenientes de uma área endêmica do Estado de São Paulo:** 72 f. Dissertação de mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, 2014.

KRAWCZAK, F. S. et al. Rickettsial infection in Amblyomma cajennense ticks and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in a Brazilian spotted fever-endemic area. **Parasites & Vectors**, 2014.

LABRUNA, M. B. et al., Plasmids and Rickettsial Evolução Rocky Mountain spotted fever in dogs, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 3, p. 458-460, 2009.

LABRUNA, M.B. **Carta Acarológica Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Ouro Preto, v.13, p. 199-202, set. 2004.

LEMOS, E. R.S. Investigação sobre as rickettsioses: diagnósticos e avanços, In: **consulta de especialistas OPAS/OMS sobre rickettsioses nas américas**. Ouro Preto, p. 53, 2004.

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

MARTINS, G. P., **Deteção sorológica de riquetsias do grupo da febre maculosa e levantamento acarológico em equinos no Distrito Federal, Brasília.** Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2014.

MILAGRES, B.S., **Perfil sorológico de alguns infecções em capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) capturadas nos estados de São Paulo e Minas Gerais, Brasil.** 2004. 65p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Federal de Viçosa, 2004.

MOURA, N. O., **Deteção e caracterização molecular de riquetsias em potenciais vetores procedentes de foco ativos de febre maculosa do Estado do Rio de Janeiro.** Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo – 2012.

NAVARRO, D. L. **Soroepidemiologia e pesquisa de riquetsias no sangue de cães e equinos como indicador da circulação de riquetsia na região do Médio Paraibuna, Minas Gerais, Brasil**, 38f. 2014.

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

PERLMAN, S. J.; HUNTER, M. S.; ZCHORI-FEIN, E. The emerging diversity of *Rickettsia*. **Proc. R. Soc. B.** n. 273 p. 2097-2106, abr. 2006.

PIRANDA, E. M. et al., Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical and laboratory findings: **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, n.103, p.696-701, 2008.

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

ROCHA, G. C. 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.

SAMBROOK, J.; FRISTSCH, E. F.; MANIATIS, T., **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold spring harbor laboratory press, 2001.

SAIKI, R. K. et al., Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Revista Science* n. 239 – 487. 1988.

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

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

ANEXO A

Descrição dos casos de FMB no DF extraídas dos formulários das investigações ambientais.

Registro 1.

“Em 3/11/2005, o senhor V.R., ocupação vigilante, diz que retirou um carrapato no seu pescoço. Entre o dia 12 e 13 de novembro 2005, começou a apresentar sinais de febre, dor no corpo, cefaleia, e “caroços no corpo”. Foi a uma clínica particular em Brasília. O médico prescreveu doxicilina por 10 dias. No dia 14 de novembro de 2005, foi feita a busca ativa do paciente em casa. Nesse momento o paciente estava sem febre e sem exantema. Foi feita a ficha de notificação e de investigação para FMB e coletada primeira amostra de sangue. A segunda amostra de sangue foi coletada em 14/12/2005. Não houve internação. Os exames laboratoriais foram solicitados e as duas amostras de sangue, com intervalo de 30 dias, foram colhidas e enviadas à Fundação Oswaldo Cruz - RJ, conforme protocolo do MS. Após tratamento com antibiótico o paciente evoluiu para a cura. A notificação chegou a Vigilância Ambiental em Saúde 4/5/2006. Em 5/5/2006, os técnicos da Vigilância Epidemiológica foram realizar a investigação ambiental. O paciente trabalhava na Escola Superior de Administração Fazendária (ESAF), localizada entre a rodovia DF 001 e a Área do Jardim Botânico de Brasília e morava no Residencial Oeste – São Sebastião DF. Os técnicos informaram que as sorologias foram positivas para FMB. O paciente relatou presença de carrapato no seu cão e quintal. No dia 04/07/2006 foi feita ação ambiental para captura de carrapato. Na área externa da ESAF foram distribuídas nove armadilhas de pano branco e de gelo seco em valas. Todas as armadilhas removidas estavam negativas para carrapatos. No relatório ambiental em saúde não há menção sobre coleta de sangue e de carrapato do cão morava no endereço do paciente”.

Registro 2.

“Em 5/2/2006, o senhor C.C.R.S, de 19 anos de idade, pintor de carros visitou a chácara na região do Rodeador em Brazlândia, DF, localizada entre o Texas Clube e o Poço Azul. Nos dias 21 e 26, buscou atendimentos médicos, primeiramente, no Hospital Regional de Taguatinga (HRT) e por último no Hospital Regional da Asa Norte (HRAN). A queixa do paciente era dor na garganta, seguida de febre. O paciente foi internado no HRAN com suspeita de FMB, onde ficou 16 dias, para investigação e tratamento médico. O médico prescreveu oxacilina e cloranfenicol por 7 dias, com melhora do quadro e clínico e alta

hospitalar. A notificação do caso foi feita em 2/3/2006. Em 4/6/2006, o paciente retorna ao HRT, com os sintomas clínicos de febre, mialgia, cefaleia e exantema difuso pelo o corpo, onde ficou internado. Nesse momento foi prescrito ciprofloxacina e clindamicina mantidos por 7 dias. Houve melhora do quadro e posterior alta hospitalar. A solicitação para a coleta de duas amostras de sangue para sorologia com intervalo de 15 dias, foram colhidas e enviadas à Fundação Osvaldo Cruz - RJ, conforme protocolo do MS. Os resultados das sorologias chegaram em junho de 2006. A notificação à Vigilância Ambiental foi em 29/6/2006. Neste mesmo dia, os técnicos visitaram o paciente em sua residência em Taguatinga – DF. Na investigação ambiental constatou-se que o paciente trabalhava em oficina e não possuía cão. O mesmo não confirmou ter sido picado por carrapato, afirmou conhecer o que é carrapato. O paciente informou que a chácara visitada não tinha atividade econômica, não tinha animais domésticos, sendo utilizada eventualmente para lazer. Informou também que o ambiente silvestre ficava distante da casa cerca de 100 metros. No relatório da vigilância ambiental em saúde não há menção sobre coleta de sangue em cão, nem captura de carrapatos no ambiente e em animais”.