

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
VETERINÁRIAS**

**TESE**

**Aspectos epidemiológicos de *Rickettsia* sp. e *Babesia caballi* em equinos e carrapatos vetores em duas microrregiões do estado do Rio de Janeiro**

**Marcus Sandes Pires**

**2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE *RICKETTSIA SP.* E *BABESIA CABALLI* EM EQUINOS E CARRAPATOS VETORES EM DUAS MICRORREGIÕES DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

**MARCUS SANDES PIRES**

*Sob a orientação do Professor*  
**Carlos Luiz Massard**

*e Co-orientação da Doutora*  
**Elba Regina Sampaio de Lemos**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração Parasitologia Veterinária.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2013

636.1089

P667a

T

Pires, Marcus Sandes, 1980-

Aspectos epidemiológicos de *Rickettsia* sp. e *Babesia caballi* em eqüinos e carrapatos vetores em duas microrregiões do Estado do Rio de Janeiro/ Marcus Sandes Pires. - 2013.

126 f.: il.

Orientador: Carlos Luiz Massard.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Inclui bibliografias.

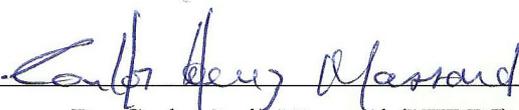
1. Cavalo - Doenças - Teses. 2. *Rickettsia* - Epidemiologia - Rio de Janeiro (Estado) - Teses. 3. Babesiose em cavalo - Epidemiologia - Rio de Janeiro (Estado) - Teses. 4. Carrapato como transmissor de doenças - Teses. 5. Parasitologia veterinária - Teses. I. Massard, Carlos Luiz, 1947- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**MARCUS SANDES PIRES**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências** no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

TESE APROVADA EM 27/02/2013

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Carlos Luiz Massard (UFRRJ)  
(Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Jairo Dias Barreira (UNIRIO)

  
\_\_\_\_\_  
Dr.<sup>a</sup>. Maria Inês Doria Rossi (FIOCRUZ)

  
\_\_\_\_\_  
Dr.<sup>a</sup>. Cristiane Divan Baldani (UFRRJ)

  
\_\_\_\_\_  
Dr.<sup>a</sup>. Sandra Maria Gomes Thomé (UFRRJ)

## DEDICATÓRIA

Á Deus, por me proporcionar esta oportunidade em desenvolver meus conhecimentos científicos e educacionais, através deste trabalho, associado com a oportunidade de convivência com diferentes indivíduos, que me proporcionaram momentos inesquecíveis de aprendizado pessoal e profissional, contribuindo de forma ímpar para o meu desenvolvimento espiritual.

Aos meus pais, Elizabeth Tavares Sandes e José Manuel dos Santos Pires, por toda a confiança, tolerância, atenção, preocupação, entusiasmo, carinho e principalmente, de amor. Tenham certeza que a contribuição de vocês, com todos estes sentimentos direcionados à mim, estão relacionados a concretização deste trabalho.

A todos os meus amigos que muitas vezes, acreditaram mais do que eu, no triunfo deste trabalho. Tenham convicção que a ajuda direta e indireta de vocês foi fundamental para a realização deste trabalho.

A todos que de alguma forma, estiveram comigo nesta caminhada, e me auxiliaram para a concretização deste objetivo.

*“Quem não Vive para Servir, não Serve Para Viver...”*  
*Mahatma Gandhi*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela oportunidade de cursar toda a Graduação, e de ingressar no Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, tanto ao nível de Mestrado, quanto de ao nível de Doutorado.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos, que foi fundamental nesta jornada.

Ao Professor Dr. Carlos Luiz Massard, pela oportunidade, ajuda, apoio, amizade, incentivos e companheirismo sempre presentes. Além de todas estas considerações, gostaria de agradecer em especial ao professor por toda a confiança depositada, que mesmo sem me conhecer muito bem, confiou em mim para a realização deste trabalho. Agradeço pela sua sincera amizade e por me promover esta grande oportunidade de crescimento profissional e pessoal, fato este que jamais esquecerei. Por tudo isso, deixo aqui registrado os meus sinceros agradecimentos.

A Pesquisadora Dr<sup>a</sup>. Elba Regina Sampaio de Lemos da FIOCRUZ por aceitar ser co-orientadora deste trabalho, por toda a sua ajuda, seu auxílio e apoios científicos dados neste projeto. E da mesma forma que o Professor Massard, eu deixo em especial o meu agradecimento a Dr<sup>a</sup>. Elba, por sua confiança depositada sobre mim, mesmo sem me conhecer muito bem. Saiba que eu jamais esquecerei o gesto da senhora, e por tudo isso, deixo aqui também registrado os meus sinceros agradecimentos.

A todos os membros da equipe do laboratório de Hantavírus e Rickettsioses do IOC/FIOCRUZ, e em especial para Raphael Gomes da Silva, Alexandro Guterres, Adonai Alvinho Pessoa Junior, Endiá Lucena e Cristiane dos Santos Manoel da Silva, que desde o primeiro contato foram muito solícitos e prestativos ao me auxiliarem; tendo participação direta na realização de uma das principais etapas deste estudo. O apoio de vocês foi fundamental para a conclusão deste projeto; muito obrigado a todos!

Aos Professores Dr. Huarrisson Azevedo Santos e Dr. Tiago Marques dos Santos, que hoje, excelentes professores, mais acima de tudo, grandes amigos no decorrer da caminhada científica ao longo de toda a minha estadia na UFRRJ. Agradeço a vocês, por todo auxílio, confiança, paciência e acima de tudo pela grande amizade e carinho que obtive dos dois durante esta época de convivência. Saibam que vocês tiveram participação direta na conclusão deste trabalho. Muito obrigado!

Ao Professor Dr. Leandro Azevedo Santos, pelas idéias e apoio em ceder o Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas para execução de parte das análises e pela ótima convivência.

A Professora Dr<sup>a</sup>. Cristiane Divan Baldani, pelo incentivo, apoio, confiança, auxílio dado no decorrer da elaboração deste estudo, e por todo o seu carinho e companheirismo, em especial sempre presente em nossa convivência na UFRRJ.

Ao Professor Dr. Argemiro Sanavria, pelo apoio, amizade e incentivo ao longo de nossa toda convivência na UFRRJ. Saiba que o senhor teve uma grande parcela de participação na minha jornada acadêmica e que sem o seu primeiro apoio, dado ao longo do curso de mestrado, também nesta Universidade, talvez eu jamais tivesse concluído este trabalho. Gostaria de deixar registrado também o grande respeito que tenho pelo senhor, admiração e acima de tudo, um grande amigo. Muito obrigado por tudo.

Aos Professores Dr. Fernando Queiroz de Almeida e Dr. Paulo de Tarso Landgraf Botteon, por me iniciarem no mundo da pesquisa científica durante a graduação na UFRRJ.

A todos os professores do Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias pelos conhecimentos transmitidos e em especial ao Professor Dr. Wagner Tassinari, por todo seu auxílio prestado, sendo de fundamental importância para a realização deste estudo.

Aos meus companheiros e amigos de laboratório, Maristela Peckle Peixoto, Érica Cristina Rocha Roier, Claudia Bezerra da Silva, Joice Aparecida Rezende Vilela, Aline Falqueto Duarte, Juliana Macedo, Andresa Guimarães, Gabriela Vitari e Renata Lins por todo o carinho, companheirismo e incentivo dado por vocês ao longo desta trajetória. A vocês, deixo também resgistrado os meus sinceros agradecimentos, pela ajuda do dia-a-dia, pelas alegrias e tristezas durante o período de convivência, pela amizade de todas vocês, e acima de tudo, pela enorme paciência. Aprendi muito com todas vocês durante esta caminha e por isso sou muito grato; muito obrigado por tudo.

A todos os meus amigos da Estação de Pesquisa Parasitológica W.O. Neitz, por todas as alegrias, brincadeiras, incentivos, ajudas, conselhos e principalmente, pela ótima convivência no ambiente de trabalho.

Ao meu amigo Henrique Trevisan, pela sua sincera amizade e companheirismo, sempre presente, demonstrado ao longo de todos os seus conselhos de cunhos acadêmicos e pessoais, pertinentes ao meu aprendizado.

Aos meus amigos Julio Aguiar e Vinicius Pimentel Silva, pelo companheirismo, amizade, incentivo, mesmo quando estes, já não podiam mais estar tão presentes no meu dia-a-dia.

Aos meus companheiros de Alojamento da UFRRJ, por todo aprendizado e companheirismo de vocês ao longo da minha estadia na residência estudantil, assim como a todos os meus amigos e colegas do curso de pós-graduação em Ciências Veterinárias.

A todos os criadores e/ou tratadores dos animais utilizados neste estudo que gentilmente aceitaram participar deste trabalho, possibilitando assim sua realização.

Aos meus pais, por todo o apoio, incentivo e carinho sempre presentes.

Aos meus familiares, sempre confiantes no meu retorno promissor.

A todas as pessoas que de alguma forma tenham contribuído para realização deste trabalho.

Aos meus Mestres e Mentores, que sempre me auxiliaram de forma incondicional e que através Deles, obtive as orientações e forças necessárias para triunfar neste trabalho.

## BIOGRAFIA

MARCUS SANDES PIRES, filho de José Manuel dos Santos Pires e Elizabeth Tavares Sandes, nasceu em 22 de outubro de 1980, no município do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro.

Cursou o Ensino Fundamental na Escola Estadual Menezes Cortes, em Jacarepaguá, Rio de Janeiro, e o Ensino Médio no Colégio Pedro II, na Tijuca, Rio de Janeiro.

Ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em 2000, no curso de Medicina Veterinária.

Durante a graduação foi estagiário no Laboratório de Microbiologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, desenvolvendo atividades de diagnóstico de bactérias patogênicas presente em amostras de produtos lácteos (Convênio entre a UFRRJ/EMBRAPA). Foi também estagiário do Hospital Veterinário de Grandes Animais da UFRRJ e durante um ano foi estagiário do Setor de Veterinária da Cavalaria da Polícia Militar do Estado do Rio de Janeiro (RPMont).

Durante dois anos foi Bolsista de Iniciação Científica (PIC-UFRRJ) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, participando de projetos de pesquisa e publicações do Grupo de Pesquisa/CNPq relacionados à Produção e Saúde dos Equinos, com ênfase em nutrição e patologia clínica Veterinária, sob orientação dos professores Dr. Fernando Queiroz de Almeida e Dr. Paulo de Tarso Landgraf Botteon.

Concluiu o Curso de Graduação em Medicina Veterinária em 2005.

Ingressou no Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, nível Mestrado, área de concentração Sanidade Animal, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no ano de 2006, sob a orientação do Professor Dr. Argemiro Sanavria e co-orientação do Pesquisador Dr. Antonio Thadeu Medeiros de Barros da EMBRAPA-Pantanal. Ao longo do curso de mestrado desenvolveu trabalhos, juntamente com seus orientadores e a equipe de trabalho do laboratório de Doenças Parasitárias. Estes trabalhos tinham como tema principais tratamentos convencionais e fitoterápicos de endo e ectoparasitos de animais domésticos e de produção, assim como também sobre a biologia, criação e manutenção de colônias de dípteros de interesse Médico-Veterinário.

Em 2008, concluiu o curso de Mestrado, e em 2009 ingressou para o Doutorado no Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Parasitologia Veterinária, também na UFRRJ, sob a orientação do Professor Dr. Carlos Luiz Massard e co-orientação Dr<sup>a</sup>. Elba Regina Sampaio de Lemos.

Durante o curso de Doutorado, com o apoio de seus orientadores e toda a equipe de trabalho do laboratório de Hemoparasitas e Vetores da UFRRJ, desenvolveu trabalhos que foram publicados em congressos nacionais e periódicos científicos com temas relacionados ao diagnóstico de hemoparasitas de importância médico-veterinária em animais de produção e companhia. Realizou também trabalhos com temas relacionados aos aspectos epidemiológicos de hemoparasitas de importância Veterinária.

Atualmente, participa do Grupo de Pesquisa “Diagnóstico, Epidemiologia e Caracterização de Hemoparasitoses, Hemoparasitos e Seus Vetores Relacionados a Animais Domésticos no Estado do Rio de Janeiro”, sob coordenação do professor Dr. Carlos Luiz Massard. Atua na área de Parasitologia Veterinária, com ênfase em doenças parasitárias, hemoparasitas e seus vetores.

## RESUMO GERAL

PIRES, Marcus Sandes. **Aspectos epidemiológicos de *Rickettsia* sp. e *Babesia caballi* em equinos e carrapatos vetores em duas microrregiões do estado do Rio de Janeiro.** 2013. 126p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Este trabalho foi desenvolvido nas microrregiões de Itaguaí e Serrana no estado do Rio de Janeiro, e teve por objetivo avaliar aspectos epidemiológicos de *Rickettsia* sp. e *Babesia caballi* em equinos e carrapatos vetores presentes nestas regiões, destacando os possíveis fatores associados à infecção dos animais e a infestação por carrapatos. Foram coletadas amostras de sangue e carrapatos de equinos. Amostras de soro foram subsequentemente obtidas a partir de centrifugação da amostra de sangue e armazenadas à -20°C até análise sorológica através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Foi realizada a extração do DNA das amostras de sangue, sendo posteriormente submetidos à reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção molecular dos respectivos agentes etiológicos. Um questionário epidemiológico foi aplicado aos proprietários dos animais para avaliar possíveis fatores relacionados com a infecção dos animais e a infestação por carrapatos vetores destes agentes. Foram observadas três espécies de carrapatos, *Amblyomma cajennense*, *Dermacentor nitens* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, promovendo o parasitismo em diferentes níveis de infestação nos equinos. A pesquisa molecular de rickettsias foi realizada somente nas amostras de DNA de *A. cajennense* e do DNA do sangue dos equinos destas duas microrregiões. As amostras de soro dos equinos foram submetidas à RIFI para a detecção de anticorpos da classe IgG anti-*Rickettsia rickettsii*. Do total de amostras de soro analisadas, 8,8% (n=21/240) foram consideradas sororreativas para rickettsias do grupo da febre maculosa (RGFM), sendo a maior frequência observada nos equinos da microrregião de Itaguaí (11,1%; n=15/135). Após análise multivariada, apenas a infestação por carrapatos foi o fator associado mais influente para a soropositividade dos animais (p<0,05; OR=6,1; IC: 1,1 - 32,9), e a presença da espécie *A. cajennense* mais relacionada com a soropositividade dos equinos (OR=11,1; IC: 2,3 - 51,7). Não foi detectada a presença de DNA rickettsial nas amostras de sangue e carrapatos dos equinos testados, a partir da PCR. Em relação aos fatores associados à infestação dos equinos por *A. cajennense*, observou-se que criações em regiões de baixas altitudes (OR=3,69; IC: 2,3 - 5,8), em propriedades com manejo zootécnico e sanitário insatisfatório (OR=5,92; IC: 3,8 - 9,2) e em sistema de criação extensiva (OR=4,25; IC: 2,1 - 8,5) foram fatores associados (p<0,05) à presença e à intensa infestação nos equinos por este carrapato. Em relação à detecção de *B. caballi* nos equinos, observou-se a frequência de 17,2% de animais infectados, sendo a maior frequência nos animais da microrregião de Itaguaí (28,9%; n=70/242). A partir da análise do questionário epidemiológico, juntamente com dados individuais de cada equino analisado foi possível observar que os animais menores de dois anos (OR=3,33; IC: 1,7 - 6,5), criados em regiões de baixas altitudes (OR=3,52, IC: 1,7 - 7,3) e infestados por carrapatos da espécie *D. nitens* (OR=1,91; IC=1,1- 3,4) foram fatores associados à positividade dos equinos por este hemoparasito. Os resultados do presente estudo mostram a importância da vigilância epidemiológica destes carrapatos vetores e sua associação tanto com agentes infecciosos de importância em saúde pública, como na produção animal, e particularmente, no mercado equino do estado do Rio de Janeiro.

**Palavras-chave:** *Rickettsia* sp., *Babesia caballi*, Epidemiologia.

## GENERAL ABSTRACT

PIRES, Marcus Sandes. **Epidemiological Aspects of *Rickettsia* sp. and *Babesia caballi* in Equine and tick vectors in two microregions of Rio de Janeiro state.** 2013. 126p. Tesis (Doctor Science in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

This work was carried out in the Itaguaí and Serrana microregions in the state of Rio de Janeiro, and aimed to evaluate the epidemiological aspects of *Rickettsia* sp. and *Babesia caballi* in horses and ticks vectors present in these regions, highlighting the possible factors associated with animals' infection and tick infestation. Blood samples and ticks were collected from horses. Serum samples were subsequently obtained by centrifugation in the blood samples and stored at -20°C until serological analysis by indirect fluorescent antibody test (IFAT). DNA was extracted of the blood samples and subsequently subjected to polymerase chain reaction (PCR) for molecular detection of the respective etiological agents. An epidemiological questionnaire was applied to the owners of animals to evaluate possible factors related to animal infection and infestation by tick vectors of these agents. Three species of ticks were observed, *Amblyomma cajennense*, *Dermacentor nitens* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, promoting parasitism at different levels of infestation in the horses. A molecular survey of rickettsiae was only performed on the DNA samples from *A. cajennense* and DNA from blood of horses of these two microregions. Serum samples from horses underwent to IFAT for the detection of IgG class antibodies anti-*Rickettsia rickettsii*. Of all serum samples analyzed, 8.8% (n = 21/240) were considered sero-reactive to rickettsiae of the spotted fever group (SFG), being the higher frequency observed in horses of Itaguaí microregion (11.1%; n = 15/135). After multivariate analysis, only tick infestation was the most influential factor associated with seropositivity to animals (p<0.05; OR= 6.1, CI: 1.1 - 32.9), and the presence of the species *A. cajennense* more related to the equine seropositivity (OR=11.1; CI: 2.3 - 51.7). The presence of rickettsial DNA was not detected in blood samples of horses and ticks tested from the PCR. Regarding factors associated with equine infestation by *A. cajennense* noted that creations in low altitudes regions (OR=3.69; CI: 2.3 - 5.8), in properties with unsatisfactory zootechnical and sanitary management (OR=5.92; CI: 3.8 - 9.2) and extensive breeding system (OR=4.25; CI: 2.1 - 8.5) were associated factors (p<0.05) to the presence and the intense infestation in horses for this tick. Regarding to detection of *B. caballi* in horses, there was the frequency of 17.2% of infected animals, with the highest frequency in the animals of the Itaguaí microregion (28.9%; n = 70/242). From the analysis of epidemiological questionnaire, together with individual data for each horse examined could be observed that animals under two years (OR=3.33; CI: 1.7 - 6.5), created in regions of low altitude (OR=3.52; CI: 1.7 - 7.3) and infested by ticks of the species *D. nitens* (OR=1.91; CI = 1.1 - 3.4) were factors associated with positive equine by this hemoparasite in the microregions studied. The results of this study show the importance of epidemiological surveillance of tick vectors and their association both with infectious agents of public health importance, as in animal production, particularly in the equestrian market of the state of Rio de Janeiro.

**Keywords:** *Rickettsia* sp., *Babesia caballi*, Epidemiology.

## LISTA DE TABELAS

### CAPITULO I

<b>Tabela 1.</b>	Análise descritiva das propriedades a partir da detecção de anticorpos da classe IgG anti- <i>Rickettsia rickettsii</i> em equinos através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) nas microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.....	20
<b>Tabela 2.</b>	Análise bivariada e multivariada da frequência de equinos soropositivos através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para anticorpos da classe IgG anti- <i>Rickettsia rickettsii</i> , em função dos fatores associados, como gênero, idade, definição racial, manejo dos animais, origem, sistema de criação, contato com bovinos e presença de carrapatos nas propriedades das microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.....	21
<b>Tabela 3.</b>	Análise bivariada e multivariada da frequência de equinos soropositivos através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para anticorpos da classe IgG anti- <i>Rickettsia rickettsii</i> , em função da presença de carrapatos nos animais das microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.....	22
<b>Tabela 4.</b>	Análise bivariada e multivariada frequência de equinos soropositivos através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para anticorpos da classe IgG anti- <i>Rickettsia rickettsii</i> , em função da altitude da propriedade das microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.....	22
<b>Tabela 5.</b>	Análise bivariada da presença de pelo menos um equino soropositivo através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para anticorpos da classe IgG anti- <i>Rickettsia rickettsii</i> , em função da microrregião, do manejo utilizado, do sistema de criação, do contato com bovinos e da infestação por carrapatos da espécie <i>Amblyomma cajennense</i> nos animais da propriedade, estado do Rio de Janeiro.....	23

### CAPITULO II

<b>Tabela 1.</b>	Análise descritiva das propriedades e equinos infestados por <i>Amblyomma cajennense</i> nos municípios de Petrópolis, Teresópolis, Mangaratiba, Itaguaí e Seropédica, estado do Rio de Janeiro.....	51
<b>Tabela 2.</b>	Análise descritiva das propriedades e equinos infestados por <i>A. cajennense</i> nas microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.....	53
<b>Tabela 3.</b>	Análise bivariada e multivariada dos fatores associados à infestação por <i>Amblyomma cajennense</i> em equinos, de acordo com o gênero, idade, definição racial, e manejo dos animais nas propriedades das microrregiões	54

	Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.....	
<b>Tabela 4.</b>	Análise bivariada e multivariada dos fatores associados à alta infestação por <i>Amblyomma cajennense</i> em equinos, de acordo com gênero, idade, definição racial e manejo dos animais nas propriedades localizadas nas microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.....	54
<b>Tabela 5.</b>	Análise bivariada e multivariada dos fatores associados à ocorrência e elevado nível de infestação por <i>A. cajennense</i> em equinos, em função da altitude da propriedade das microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.....	55
<b>Tabela 6.</b>	Análise bivariada dos fatores associados à infestação por <i>A. cajennense</i> em propriedades com mais de 30% dos equinos infestados, em função da microrregião, do manejo utilizado, do sistema de criação e do contato com bovinos, estado do Rio de Janeiro.....	56
<b>Tabela 7.</b>	Frequência de equinos e propriedades infestadas por <i>Amblyomma cajennense</i> de acordo com o tratamento, intervalo de aplicação e base química utilizada nas microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.....	56

### CAPITULO III

<b>Tabela 1.</b>	Análise descritiva das propriedades e equinos infectados por <i>Babesia caballi</i> nas microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.....	77
<b>Tabela 2.</b>	Análise bivariada e multivariada da frequência de <i>Babesia caballi</i> nos equinos analisados, através da <i>nested</i> PCR, em função dos fatores associados, como gênero, idade, definição racial, e manejo dos animais nas propriedades das microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.....	78
<b>Tabela 3.</b>	Análise bivariada e multivariada da frequência de <i>Babesia caballi</i> nos equinos analisados, através da <i>nested</i> PCR, em função da espécie de carrapato observada nos animais das microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.....	79
<b>Tabela 4.</b>	Análise bivariada e multivariada da frequência de <i>Babesia caballi</i> nos equinos analisados através da <i>nested</i> PCR, em função do grau de infestação da espécie de carrapato observada nos animais das microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.....	79
<b>Tabela 5.</b>	Análise bivariada e multivariada da frequência de <i>Babesia caballi</i> nos equinos analisados através da <i>nested</i> PCR, em função da altitude da propriedade das microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.....	79

	Janeiro.....	
<b>Tabela 6.</b>	Análise bivariada da presença de pelo menos um equino positivo para <i>Babesia caballi</i> nas propriedades analisadas, através da <i>nested</i> PCR, em função da microrregião, do manejo utilizado, do sistema de criação, do contato com bovinos e da ocorrência de animais com elevada infestação por <i>Dermacentor nitens</i> na criação, estado do Rio de Janeiro.....	80
<b>Tabela 7.</b>	Frequência de equinos e propriedades com equinos infectados por <i>Babesia caballi</i> de acordo com o tratamento carrapaticida, nas microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.....	81
<b>Tabela 8.</b>	Valores médios dos parâmetros relacionados ao eritrograma, sólidos totais e fibrinogênio de equinos em função do resultado da <i>nested</i> PCR para <i>Babesia caballi</i> na microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.....	82
<b>Tabela 9.</b>	Valores médios dos parâmetros relacionados ao leucograma de equinos em função do resultado da <i>nested</i> PCR para <i>Babesia caballi</i> na microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.....	83
<b>Tabela 10.</b>	Valores médios dos parâmetros relacionados ao eritrograma, sólidos totais e fibrinogênio de equinos em função do resultado da <i>nested</i> PCR para <i>Babesia caballi</i> na microrregião Serrana, estado do Rio de Janeiro.....	87
<b>Tabela 11.</b>	Valores médios dos parâmetros relacionados ao leucograma de equinos em função do resultado da PCR para <i>Babesia caballi</i> na microrregião Serrana, estado do Rio de Janeiro.....	88

## LISTA DE FIGURAS

### CAPITULO I

- Figura 1.** Gel de agarose (1%) com produtos da amplificação do fragmento de 381pb do gene *gltA*, específico para o gênero *Rickettsia*. PM: Peso molecular de 100pb; A1-A7: Amostras de DNA positivas para RGFM, através da PCR convencional, em diluições seriadas (10ng/μL até 10<sup>-4</sup>ng/μL)..... 24
- Figura 2.** Gel de agarose (1%) com produtos da amplificação do fragmento de 532pb do gene *ompA* específico para RGFM. PM: Peso molecular de 100pb; A1-A7: Amostras de DNA positivas para RGFM, através da PCR convencional, em diluições seriadas (10ng/μL até 10<sup>-3</sup>ng/μL)..... 24

### CAPITULO II

- Figura 1.** Nível de infestação por *A. cajennense* em equinos dos municípios de Petrópolis, Teresópolis, Mangaratiba, Itaguaí e Seropédica, estado do Rio de Janeiro..... 52
- Figura 2.** Níveis de infestação de *A. cajennense* em equinos em função da altitude de localização da propriedade analisada, estado do Rio de Janeiro..... 52

### CAPITULO III

- Figura 1.** Gel de agarose (1%) com produtos da amplificação do fragmento de 430pb do gene BC48, específico para *B. caballi*. PM: Peso molecular de 1kb; A1 (Controle Positivo); A2 (Controle negativo); A3, A5, A6, A9 e A10 (Amostras negativas); A4, A7 e A8: Amostras de DNA positiva através da PCR (seta branca)..... 76
- Figura 2.** Frequência das alterações observadas no valor do hematócrito, no número de eritrócitos, na concentração de hemoglobina, na concentração de hemoglobina corpuscular média, na hemoglobina corpuscular média e no volume corpuscular médio, em função do resultado da *nested* PCR para *B. caballi*, nos equinos da microrregião de Itaguaí. <sup>a</sup>Letras iguais entre as colunas de mesma legenda não diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de 5% de confiança..... 84
- Figura 3.** Frequência das alterações observadas no valor dos sólidos totais, na amplitude de distribuição das hemácias, no número de plaquetas e no valor de fibrinogênio em função do resultado da *nested* PCR para

*Babesia caballi*, nos equinos da microrregião de Itaguaí. <sup>a</sup>Letras iguais entre as colunas de mesma legenda não diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de 5% de confiança..... 85

**Figura 4.** Frequência das alterações observadas no número de leucócitos totais, número de linfócitos, número de neutrófilos, número de eosinófilos e número de monócitos em função do resultado da *nested* PCR para *Babesia caballi*, nos equinos da microrregião de Itaguaí. <sup>a</sup>Letras iguais entre as colunas de mesma legenda não diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de 5% de confiança..... 86

**Figura 5.** Frequência das alterações observadas no valor do hematócrito, no número de eritrócitos, na concentração de hemoglobina, na concentração de hemoglobina corpuscular média, na hemoglobina corpuscular média e no volume corpuscular médio, em função do resultado da *nested* PCR para *Babesia caballi*, nos equinos da microrregião Serrana. <sup>a</sup>Letras iguais entre as colunas de mesma legenda não diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de 5% de confiança..... 89

**Figura 6.** Frequência das alterações observadas no valor dos sólidos totais, na amplitude de distribuição das hemácias, no número de plaquetas e no valor de fibrinogênio em função do resultado da *nested* PCR para *Babesia caballi*, nos equinos da microrregião de Serrana. <sup>a</sup>Letras iguais entre as colunas de mesma legenda não diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de 5% de confiança..... 90

**Figura 7.** Frequência das alterações observadas no número de leucócitos totais, número de linfócitos, número de neutrófilos, número de eosinófilos e número de monócitos em função do resultado da *nested* PCR para *Babesia caballi*, nos equinos da microrregião Serrana. <sup>a</sup>Letras iguais entre as colunas de mesma legenda não diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de 5% de confiança..... 91

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>CAPITULO I - Pesquisa de <i>Rickettsia</i> sp. em equinos e carrapatos da espécie <i>Amblyomma cajennense</i> nas microrregiões Serrana e Itaguaí, estado do Rio de Janeiro</b> .....	3
<b>RESUMO</b> .....	4
<b>ABSTRACT</b> .....	5
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	6
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	8
2.1 Breve Histórico e Etiologia.....	8
2.2 Ecologia e Epidemiologia das Rickettsias no Brasil.....	9
2.3 Carrapatos associados à RGFM.....	10
2.4 Hospedeiros Vertebrados.....	11
2.5 Métodos de Diagnóstico.....	12
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	14
3.1 Descrição da Área de Estudo.....	14
3.1.1 Microrregião de Itaguaí.....	14
3.1.2 Microrregião de Serrana.....	14
3.2 Tamanho Amostral no Estudo de RGFM nos Carrapatos e Equinos.....	14
3.2.1 Carrapatos.....	14
3.2.2 Equinos.....	15
3.3 Questionário Epidemiológico.....	15
3.4 Coleta de Sangue e Soro.....	16
3.5 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	16
3.6 Extração de DNA das Amostras de Carrapatos e Sangue.....	16
3.7 Sensibilidade Analítica da PCR na Detecção de RGFM.....	17
3.8 Ensaio da PCR.....	17
3.9 Análise Estatística.....	18
<b>4 RESULTADOS</b> .....	20
4.1 Aspectos Soro-epidemiológicos de RGFM nos Equinos do Estudo.....	20
4.2 Detecção Molecular de RGFM em Amostras de DNA de Equinos e Carrapatos.....	23
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	26
5.1 Aspectos Soro-epidemiológicos de RGFM nos Equinos do Estudo.....	26
5.2 Detecção Molecular de RGFM em Amostras de DNA de Equinos e Carrapatos.....	29
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	32
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	33
<b>CAPITULO II - Fatores associados à infestação por carrapatos da espécie <i>Amblyomma cajennense</i>, em equinos das microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro</b> .....	43
<b>RESUMO</b> .....	44
<b>ABSTRACT</b> .....	45

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	46
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	47
2.1 Ecologia e Epidemiologia.....	47
2.2 Biologia de <i>Amblyomma cajennense</i> .....	47
2.3 Importância em Saúde Pública.....	48
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	49
3.1 Descrição da Área de Estudo.....	49
3.2 Questionário Epidemiológico.....	49
3.3 Análise estatística.....	50
<b>4 RESULTADOS</b> .....	51
4.1 Aspectos Epidemiológicos de <i>Amblyomma cajennense</i> na Área de Estudo.....	51
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	58
5.1 Aspectos Epidemiológicos de <i>Amblyomma cajennense</i> na Área de Estudo.....	58
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	61
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	62
<b>CAPITULO III – Aspectos epidemiológicos de <i>Babesia caballi</i> (Nuttall; Strickland, 1912) em equinos criados nas microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro</b> .....	66
<b>RESUMO</b> .....	67
<b>ABSTRACT</b> .....	68
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	69
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	70
2.1 Breve Histórico e Etiologia.....	70
2.2 Epidemiologia.....	70
2.3 Vetores.....	70
2.4 Biologia de <i>Babesia caballi</i> .....	71
2.5 Métodos de Diagnóstico.....	71
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	73
3.1 Descrição da Área de Estudo.....	73
3.2 Questionário Epidemiológico.....	73
3.3 Coleta de Sangue.....	74
3.4 Extração de DNA das Amostras.....	74
3.5 Sensibilidade Analítica da PCR para Detecção de <i>B. caballi</i> .....	74
3.6 Ensaio da PCR.....	74
3.7 Análises Hematológicas.....	75
3.8 Análise Estatística.....	75
<b>4 RESULTADOS</b> .....	76
4.1 Sensibilidade Analítica da Técnica de <i>n</i> PCR.....	76
4.2 Aspectos Epidemiológicos da Área de Estudo.....	76
4.3 Parâmetros Hematológicos de Equinos das duas microrregiões Diagnosticados com	81

<i>B. caballi</i> .....	
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	92
5.1 Aspectos Epidemiológicos da Área de Estudo.....	92
5.2 Parâmetros Hematológicos de Equinos Diagnosticados com <i>B. caballi</i> .....	94
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	97
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	98
<b>8 CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	105
<b>ANEXO</b> .....	106
<b>Anexo I</b> – Questionário epidemiológico.....	107

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

As rickettsias são bactérias gram-negativas, que se desenvolvem somente no interior de células vivas e, portanto, caracterizadas como parasitas intracelulares obrigatórios. As espécies do gênero *Rickettsia* estão agrupadas em quatro subdivisões; Grupo Tifo, Grupo Ancestral, Grupo Transicional e Grupo da Febre Maculosa (GFM), tendo este um elevado número de espécies patogênicas ao homem. Dentre estas, a espécie *Rickettsia rickettsii*, de grande importância em saúde pública, devido à sua elevada letalidade.

No Brasil, esta espécie de bactéria é caracterizada como agente etiológico da febre maculosa brasileira (FMB), e sua transmissão está relacionada ao parasitismo por carrapatos infectados, principalmente do gênero *Amblyomma* spp. Sabe-se ainda que dentre os animais domésticos, os equinos, são os mais parasitados por carrapatos da espécie *Amblyomma cajennense* (GUEDES et al., 2005), atuando também como hospedeiros amplificadores deste ectoparasito na natureza.

Apesar desta rickettsiose causar grave sintomatologia em humanos, nos equinos não há descrição de sinais clínicos, mesmo em animais que apresentaram titulação bem elevada de anticorpos anti-*Rickettsia* (LEMOS et al., 1996). Contudo, a pesquisa por estes microorganismos neste grupo de animais está atrelada à importância epidemiológica que esta espécie de animal possui, pois podem atuar como “sentinelas” da circulação do agente em regiões endêmicas para a doença (LEMOS et al., 1996; HORTA et al., 2004; SANGIONI et al., 2005; VIANNA et al., 2008). A doença está mais concentrada na região Sudeste, estando os estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, sob constante vigilância epidemiológica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

A babesiose equina, também conhecida como piroplasmose equina é uma doença causada por hemoparasitos das espécies *Babesia caballi* (Nuttall; Strickland, 1912) e *Theileria equi* (Laveran, 1901) Mehlhorn e Schein, 1998. Os equinos acometidos por estes agentes apresentam febre, anemia, icterícia, hemoglobinúria e fraqueza, podendo, em casos agudos, evoluírem para o óbito (DE WAAL, 1990; 1992). Esta enfermidade é considerada no mundo inteiro como o principal entrave para o trânsito internacional de cavalos para países considerados livres da doença (KNOWLES, 1996). A transmissão destes hemoparasitos, assim como no caso da maioria das espécies de rickettsias, está associada ao parasitismo por carrapatos.

No Brasil, *B. caballi* foi reportada pela primeira vez no estado do Rio de Janeiro (COSTA; MELLO, 1963), e sua transmissão no país, possui estreita associação com a infestação dos equinos por carrapatos da espécie *Dermacentor nitens*, (PFEIFER-BARBOSA et al., 1992; PFEIFER-BARBOSA, 1993; LINHARES, 1994; MUJICA, 2002). Diferentes estudos no estado do Rio de Janeiro apontam elevada soropositividade dos equinos por *B. caballi* (PFEIFER-BARBOSA et al., 1992; BITTENCOURT et al., 1997). Sobre os aspectos relacionados à soropositividade, a infestação por carrapatos (KERBER et al., 2009) e a características do ambiente aonde os equinos são criados (GARCIA-BOCANEGRA et al., 2013) são fatores que podem influenciar a presença deste agente nos animais.

Neste contexto, a pesquisa de *Rickettsias* sp. em equinos e carrapatos em regiões com histórico de casos em humanos assim como a avaliação sobre os aspectos epidemiológicos que estão associados à positividade dos equinos por *B. caballi* ampliarão o nosso conhecimento por estas enfermidades. Desta forma será possível, conseqüentemente, buscar formas eficazes de prevenção e controle do agente etiológico na região e auxiliar a vigilância epidemiológica destes agentes nestas áreas. Em adição, em relação à febre maculosa, a identificação de possíveis fatores associados à infestação dos animais, e, em particular, os

equinos, por estes carrapatos, poderiam auxiliar na busca por melhores formas de controle destes artrópodes, minimizando possíveis ocorrências desta doença na região estudada.

O presente estudo teve por objetivos principais:

Avaliar a presença de *Rickettsia* sp. em equinos e carrapatos da espécie *Amblyomma cajennense*, em duas microrregiões do estado do Rio de Janeiro, com histórico de casos confirmados de febre maculosa em humanos.

Avaliar os fatores associados à infestação dos equinos pelo principal vetor da febre maculosa brasileira (FMB), o “carrapato-estrela”, nas microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.

Avaliar aspectos epidemiológicos relacionados à detecção de *B. caballi* em equinos, nas microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.

## **CAPÍTULO I**

**Pesquisa de *Rickettsia* sp. em equinos e carrapatos da espécie *Amblyomma cajennense* nas microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro**

## RESUMO

PIRES, Marcus Sandes. **Pesquisa de *Rickettsia* sp. em equinos e carrapatos da espécie *Amblyomma cajennense* nas microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro** 2013. 39p. Tese. (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Este trabalho foi desenvolvido nas microrregiões de Itaguaí e Serrana no estado do Rio de Janeiro, e teve por objetivo detectar *Rickettsia* sp. através do diagnóstico molecular em equinos e carrapatos presentes nestas regiões, assim como identificar animais soro-reagentes à *Rickettsia* sp. através de ensaio sorológico. Amostras de sangue foram obtidas dos equinos através de venopunção, sendo também coletados carrapatos presentes nos animais infestados. Amostras de soro foram obtidas por centrifugação das amostras de sangue e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização da análise sorológica. As condições de criação e o manejo foram avaliados em cada propriedade, através de um questionário epidemiológico. Após a identificação dos ixodídeos coletados, exemplares da espécie *Amblyomma cajennense* foram separados para a realização da extração do DNA, assim como das amostras de sangue total. As amostras de soro dos equinos foram submetidas à reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para a detecção de anticorpos da classe IgG anti-*Rickettsia rickettsii*. Amostras de soro com título  $\geq 1:64$  foram consideradas positivas. O DNA extraído foi submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR) para pesquisa de agentes rickettsiais. Do total de amostras de soro analisadas, 8,8% (n=21/240) foram consideradas sororreativas, sendo 5,7% da microrregião Serrana (n=6/105) e 11,1% na microrregião de Itaguaí (n=15/135). Em relação às propriedades avaliadas, 38,1% (n=8/21) localizadas na microrregião de Itaguaí e 23,8% (n=5/21) localizadas na microrregião Serrana apresentaram pelo menos um equino sororreativo para rickettsias do grupo da febre maculosa (RGFM). A partir da análise bivariada dos dados epidemiológicos, observou-se que equinos da microrregião de Itaguaí, nascido na propriedade, oriundos de criações com o manejo sanitário e zootécnico insatisfatório, com sistema de criação extensivo, tendo a presença de bovinos na mesma pastagem ou nos arredores da criação e infestados por carrapatos, foram fatores associados a soropositividade dos animais ( $p < 0,20$ ). Contudo, após análise através da regressão logística, apenas a infestação por carrapatos foi a variável mais influente para a soropositividade dos animais ( $p < 0,05$ ; OR=6,1; IC: 1,1 - 32,9). E em relação à espécie de carrapato presente nos animais, após a análise multivariada, somente *A. cajennense* apresentou associação com a soropositividade dos equinos (OR=11,1; IC: 2,3 - 51,7). Propriedades com o manejo zootécnico e sanitário insatisfatório, e criações de equinos próximo ou juntamente com bovinos foram fatores associados à presença de pelo menos um equino sororreativo para RGFM na propriedade. Todas as amostras de DNA de carrapatos da espécie *A. cajennense* e do sangue total analisadas não apresentaram amplificação para os genes *gltA* e *ompA*. A evidência sorológica presente nas amostras dos equinos, embora com uma baixa frequência, sugere a circulação de RGFM nestas regiões estudadas, demonstrando a necessidade de vigilância epidemiológica e o monitoramento em áreas com histórico de casos da febre maculosa.

**Palavras-chave:** *Rickettsia* sp., Cavalos, Carrapatos.

## ABSTRACT

PIRES, Marcus Sandes. **Survey of *Rickettsia* sp. in equines and ticks of specie *Amblyomma cajennense* in Serrana and Itaguaí microregions, Rio de Janeiro State.** 2013. 39p. Tesis (Doctor Science in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

This work was developed in the Itaguaí and Serrana microregions in the state of Rio de Janeiro, and aimed to detect *Rickettsia* sp. through molecular diagnosis in horses and ticks present in these regions, as well as to identify seroreactive to *Rickettsia* sp. by the serological assay. Blood samples were obtained by venipuncture of horses, and were also collected ticks in the infested animals. Serum samples were obtained by centrifugation in the blood samples and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until the realization serological analysis by indirect fluorescent antibody test (IFAT). The conditions for the creation and management were assessed on each property using an epidemiological questionnaire. After identification of ticks collected, specimens of the species *Amblyomma cajennense* were separated for the extraction of DNA, as well as samples of whole blood. Serum samples from horses were submitted to indirect fluorescent antibody test (IFAT) for the detection of IgG class antibodies anti-*Rickettsia rickettsii*. Serum samples with titers  $\geq 1:64$  were considered positive. The extracted DNA was subjected to polymerase chain reaction (PCR) to search for rickettsiae agents. Of all serum samples analyzed, 8.8% (n=21/240) were considered seroreactive, being 5.7% in the Serrana microregion (n = 6/105) and 11.1% in the Itaguaí microregion (n = 15/135). Regarding to the properties evaluated, 38.1% (n = 8/21) located in the Itaguaí microregion, and 23.8% (n = 5/21) located in the Serrana microregion had at least one horse seroreactive to the rickettsiae of spotted fever group (SFG). From the bivariate analysis of epidemiological data, it was observed that the horses of Itaguaí microregion, born in property, coming from creations with the unsatisfactory zootechnical and sanitary management, with extensive breeding system, the presence of cattle in the same pasture or in surrounding the creation, and infested by ticks were associated factors to seropositivity of animals ( $p < 0.20$ ). However, after analysis using logistic regression, only tick infestation was the most influential variable for seropositivity of animals ( $p < 0.05$ , OR=6.1; CI: 1.1 - 32.9). And in relation to species of tick in animals, after multivariate analysis, only *A. cajennense* seropositivity showed association with seropositivity of equines (OR=11.1; CI: 2.3 - 51.7). Properties with unsatisfactory zootechnical and sanitary management, and breeding of equines near or together to cattle were associated factors with the presence of at least one horse seroreactive to rickettsiae of SFG at the property. All DNA samples from ticks of the species *A. cajennense* and of whole blood analyzed showed no amplification for the *gltA* and *ompA* genes. The serological evidence present in the samples of horses, although with a low frequency, suggests the movement of rickettsiae of SFG in these studied regions, demonstrating the need for surveillance and monitoring in areas with a history of cases of spotted fever.

**Keywords:** *Rickettsia* sp., Horses, Ticks.

## 1 INTRODUÇÃO

A febre maculosa brasileira (FMB) caracteriza-se como uma enfermidade causada por bactérias do gênero *Rickettsia*. No território nacional, sua transmissão ocorre principalmente relacionada ao parasitismo por carrapatos infectados do gênero *Amblyomma* spp. (GUEDES et al., 2005; LABRUNA, 2009). A doença possui caráter zoonótico e os equinos representam o grupo de animais domésticos mais parasitados por este grupo de carrapatos (GUEDES et al., 2005).

No Brasil, a ocorrência de casos desta enfermidade está mais concentrada na região Sudeste, sendo São Paulo e Minas Gerais os estados sob constante vigilância epidemiológica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Em relação ao estado do Rio de Janeiro, um dos primeiros casos reportados ocorreu por volta do ano de 1941 (TOSTES; BRETZ, 1941 apud MOLITERNO, 2009), e posteriormente em 1977 (GONÇALVES et al., 1981). Neste mesmo estado, somente entre os anos de 2004 e 2008 foram confirmados 28 casos, em diferentes municípios da região da baixada fluminense, na região litorânea da costa verde e na região Serrana (MOLITERNO, 2009).

Em relação à distribuição da doença nas diferentes regiões do estado, na última década, tem-se observado uma dispersão crescente. Em 2001, um caso fatal, associado com contato com animais domésticos e roedores, foi confirmado na região da baixada fluminense, no município de Nova Iguaçu (LE MOS et al., 2002). Embora com o índice de suspeição diagnóstica sempre muito baixa, posteriormente, foi registrado, na região serrana do estado, município de Petrópolis, no ano de 2005, o primeiro surto de FMB no território fluminense com grande repercussão na mídia, em decorrência de dois óbitos e da sua associação com atividades de turismo na região (MOLITERNO, 2009).

Em 2006, novo surto foi identificado no Município de Resende, com cinco membros de uma mesma família acometidos pela doença, sendo que dois deles evoluíram para o óbito. Dois anos depois (2008), a FMB fatal foi confirmada em paciente residente no bairro de Campo Grande, zona oeste do município do Rio de Janeiro, em cuja história epidemiológica foi possível identificar o relato de contato com carrapato e equinos (LAMAS et al., 2008).

Apesar da enfermidade se apresentar em casos esporádicos nas diferentes regiões do estado, existe a possibilidade de que o agente etiológico esteja circulante nos diversos vetores artrópodes das regiões observadas. A ausência de ocorrência da doença pode estar associada com a falta de confirmação diagnóstica, ou subnotificações de casos, devido à similaridade sintomatológica com outras doenças infecciosas, presentes em diversas regiões do estado (LE MOS et al., 2002; WALKER, 2002).

A sazonalidade da doença está intimamente relacionada ao ciclo biológico do vetor, pois à presença das formas imaturas dos carrapatos (larvas e ninfas) no ambiente são muitas vezes imperceptíveis às pessoas que sofrem o parasitismo. Desta forma, devido estas formas imaturas possuem maior ocorrências no período entre os meses de abril a novembro, a casuística da doença é maior durante este período, embora a ocorrência da FMB possa ser observada durante todo o período do ano.

Em relação aos aspectos epidemiológicos da FMB, muitos estudos são conduzidos utilizando animais domésticos como os equinos, possíveis indicadores da circulação do agente etiológico em regiões consideradas endêmicas no país, através de ensaios sorológicos e da pesquisa da fauna de ectoparasitos (LE MOS et al., 1996; HORTA et al., 2004; SANGIONI et al., 2005; CARDOSO et al., 2006; HORTA et al., 2007; VIANNA et al., 2008).

Desta forma, o estudo da circulação destes agentes etiológicos, tanto nos equinos, quanto em possíveis carrapatos vetores presentes nestes animais, visa auxiliar a vigilância epidemiológica da doença na região estudada.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a presença de rickettsias do grupo da febre maculosa (RGFM), através do diagnóstico sorológico e molecular, em amostra de equinos e carrapatos da espécie *Amblyomma cajennense*, em duas microrregiões do estado do Rio de Janeiro.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Breve Histórico e Etiologia

As rickettsioses são definidas como doenças infecciosas causadas por bactérias Gram-negativas, intracelulares obrigatórias, pleomórficas e pequenas (em média de 0,3µm largura e 1,5 µm de comprimento) (RAOULT; ROUX, 1997). É um grupo de doenças que acometem acidentalmente o homem através do parasitismo por artrópodes hematófagos, dentre eles, carrapatos, pulgas, piolhos e ácaros (FRIEDHOFF, 1990; HOOGSTRAAL, 1967).

Estes microrganismos se desenvolvem em células nucleadas de vertebrados e invertebrados, preferencialmente células endoteliais de hospedeiros vertebrados (WEISS; MOULDER, 1984) e nos invertebrados, células intestinais, ovários e glândulas salivares (RAOULT et al., 2005).

Em relação às rickettsioses, o gênero *Rickettsia* é o mais importante, devido aos aspectos clínicos e epidemiológicos associados às infecções humanas. Estas espécies de proteobactérias pertencem à ordem *Rickettsiales*, família *Rickettsiaceae* e são classificadas, na atualidade, em quatro grandes grupos: (i) grupo ancestral, composto por *Rickettsia bellii* e *Rickettsia canadensis*; de patogenicidade desconhecida; (ii) grupo do tifo, composto por *Rickettsia typhi* e *Rickettsia prowazekii*; (iii) grupo da febre maculosa (RGFM), constituído por mais de 25 espécies, entre elas, *Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia parkeri* no continente americano, *Rickettsia conorii* e *Rickettsia africae* na Europa e na África, *Rickettsia japonica* e *Rickettsia israeli* na Ásia e no Oriente Médio e (iv) grupo transicional, constituído por *Rickettsia akari*, *Rickettsia australis* e *Rickettsia felis*.

A distribuição das rickettsias ao redor do mundo está associada diretamente aos seus vetores artrópodes, o que inclui uma variedade de espécies, sendo descrita em regiões de diferentes países, de todos os continentes (PAROLA et al., 2005).

Dentre as espécies de elevada patogenicidade para o homem está a espécie *Rickettsia rickettsii*, isolada por Howard T. Ricketts em 1907 a partir de carrapatos, agente etiológico da febre maculosa das Montanhas Rochosas (FMMR), doença que foi observada, primeiramente, nos Estados Unidos (RICKETTS, 1909 apud DANTAS-TORRES, 2007; CHILDS; PADDOCK, 2002). A espécie *R. rickettsii* está restrita a países do hemisfério ocidental, sendo observada, inicialmente, nos Estados Unidos e posteriormente no Canadá, México, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Brasil e Argentina (DUMLER; WALKER, 2005; PADDOCK et al., 2008).

A provável descrição dos primeiros casos da febre maculosa ocorreu em 1896 no Vale do Rio “Snake” no estado americano de Idaho, sendo denominada de “sarampo preto” (“*black measles*”), e a partir do início do século XX, foi descrita também em outros estados dos EUA, como Washington, Montana, Califórnia, Arizona e o Novo México (REBOUÇAS; BASSO, 2007).

Um dos grandes nomes na história da descoberta do agente infeccioso desta enfermidade foi Howard Taylor Ricketts, que em seus estudos, investigava duas formas da doença em humanos, sendo a FMMR (em inglês - *Rocky Mountain spotted fever*) nos Estados Unidos, e a outra conhecida como “*Tabardillo*”, ou “*Pinta*”, endêmica no México (SUASSUNA, 2006).

Ricketts estudou as possíveis formas de transmissão da febre maculosa, utilizando cobaios, descrevendo o papel de carrapatos como potenciais transmissores. Seus estudos pioneiros foram fundamentais para a determinação deste novo gênero de microorganismos (SUASSUNA, 2006).

Além de Ricketts, muitos outros pesquisadores estiveram envolvidos na elucidação deste agente infeccioso, dentre eles, Von Prowazek e Henrique da Rocha Lima, que atuavam como pesquisadores do Centro de Hamburgo, na Alemanha, investigando o possível agente do Tifo Exantemático, que assolava soldados durante as guerras dos Bálcãs (1912-1913). Rocha Lima e Prowazek examinaram os piolhos coletados nos soldados doentes ou mesmo mortos, na tentativa de descobrir o agente causador daquela enfermidade (MORAES, 1968).

Foi somente em 1916, que Rocha Lima anunciou a descoberta do causador do tifo epidêmico, agente infeccioso que denominou *Rickettsia prowazeki*, em homenagem a Ricketts e Prowazek, ambos pesquisadores que, no decorrer de suas pesquisas acabaram se infectando com preparos a fresco de material infeccioso e vieram a óbito (RAMOS, 2005).

Em 1919, os norte-americanos Wolbach e Todd, após a publicação de Rocha Lima, em 1916 descreveram o agente da FMRR, também estudado por Ricketts, denominando-o *Dermacentroxenus rickettsii* relacionando o nome do agente etiológico ao vetor transmissor, o carrapato da espécie *Dermacentor andersoni*, e ao pesquisador envolvido na descoberta, Ricketts (DANTAS-TORRES, 2007).

Contudo, este nome não prevaleceu e hoje é referido como *Rickettsia rickettsii*, proposto por Brumpt, em 1922 (DANTAS-TORRES, 2007). Esta nova espécie de rickettsia foi então observada por outros pesquisadores ao longo das Américas em surtos esporádicos, como agente causal da febre maculosa.

Embora já tenham sido descritas mais de 20 espécies de RGFM e dentre estas algumas associadas à doença em seres humanos, a espécie *R. rickettsii* é considerada a mais patogênica das rickettsias ao homem (PAROLA et al., 2005).

## 2.2 Ecologia e Epidemiologia das Rickettsias no Brasil

No Brasil, esta rickettsiose foi descrita pela primeira vez pelo médico e pesquisador paulista Piza, em 1929 (PIZA, 1932 apud HORTA, 2002). Além deste, em Minas Gerais, Amílcar Viana Martins e Octávio de Magalhães foram os pioneiros na pesquisa desta enfermidade. Os primeiros relatos ocorreram em São Paulo, e até hoje, este estado possui ocorrência endêmica da doença. Um dos primeiros registros desta doença no estado do Rio de Janeiro ocorreu no ano de 1941 (TOSTES; BRETZ, 1941 apud MOLITERNO, 2009).

Atualmente, existem registros de casos graves e fatais da doença em diversos outros estados, como Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Bahia, Ceará, Rondônia, Goiás, Distrito Federal, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Embora diagnosticada no país há décadas, a febre maculosa tornou-se de notificação compulsória somente no ano de 2001, pela Portaria do Ministério da Saúde nº 1.943, de 18/10/01. Desde então, apesar da subnotificação, mais de novecentos casos já foram confirmados em todo o território nacional, sendo, somente entre os anos de 2007 a 2010, registrados 425 casos confirmados, com letalidade em torno de 24% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Além da espécie *R. rickettsii*, causadora da FMB é provável que outras espécies estejam incriminadas na ocorrência da rickettsioses do GFM em humanos, como por exemplo, com *Rickettsia felis* (RAOULT et al., 2001). Recentemente, novas cepas de *Rickettsia* sp. (cepa Mata Atlântica e cepa Bahia) demonstraram potencial patogênico para humanos, em dois estados do Brasil (SABATINI et al., 2010; SPOLIDORIO et al., 2010; SILVA et al., 2011). Contudo, os casos letais de FMB, até o momento, estão relacionados a infecções por *R. rickettsii*.

Dentre outras espécies já relatadas no território nacional, observou-se a presença de *R. parkeri*, *R. rhipicephalini*, *R. belli*, *R. amblyommii* e *R. monteiroi*, todas associadas a espécies

de carrapatos, além de *R. felis* e *R. typhi*, ambas associada a pulgas (LABRUNA et al., 2009; PACHECO et al., 2011). Além disso, outras novas cepas de rickettsias (*Rickettsia* sp. cepa Pampulha) foram identificadas em carrapatos no estado de São Paulo (ALMEIDA et al., 2011).

Além dos ensaios moleculares, estudos sorológicos conduzidos em diferentes regiões do país propiciaram a investigação das possíveis espécies de rickettsias que estão presentes no país. Horta et al. (2007) observaram a presença de anticorpos para *R. rickettsii*, *R. africae*, *R. akari* e *R. belli*, em amostras de soro de cães e equinos oriundos de áreas endêmicas para FMB. Labruna et al. (2007), também em inquérito sorológico realizado em cães do estado de Rondônia, avaliou a positividade para *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyommi*, *R. rhipicephali*, *R. felis* e *R. belli*. Contudo, é importante destacar que através do exame sorológico podem ocorrer falsas interpretações da espécie envolvida na infecção, uma vez que todas as espécies de RGFM apresentem algum grau de reação sorológica cruzada (PHILIP et al., 1978).

Sob o aspecto epidemiológico da doença, os ensaios sorológicos, apesar da necessidade de uma adequada interpretação dos resultados obtidos, são excelentes ferramentas para a avaliação da circulação de rickettsias em determinada região. Vale destacar que os equinos e os cães podem ser utilizados como animais sentinelas, através de pesquisa sorológica de anticorpos contra o agente da febre maculosa (LE MOS et al., 1996). Neste mesmo estudo, os autores observaram, respectivamente 77,8% e 36,4% de soroprevalência para *R. rickettsii* em amostras de equinos e cães, em área endêmica para a doença, no estado de São Paulo. Horta et al. (2004), também em estudo de área endêmica para a FM em São Paulo, observaram soroprevalência de 77,3% e 31,3%, em equinos e cães, respectivamente. Estudos similares foram realizados por Sangioni et al. (2005), em São Paulo e Vianna et al. (2008), em Minas Gerais, ambas áreas consideradas endêmicas. Já o estudo de Toledo et al. (2011) observaram soroprevalência de 2,7% e 38,5%, em cães e equinos, respectivamente, avaliando, de forma indireta, a circulação do agente no estado do Paraná.

### **2.3 Carrapatos Associados à RGFM**

Embora os carrapatos possam adquirir patógenos, sua capacidade de transmiti-los para um hospedeiro vertebrado é variável, pois esta capacidade depende de aspectos fisiológicos relacionados ao próprio carrapato e também a questões referentes aos hospedeiros vertebrados, como susceptibilidade à infestações, abundância, sazonalidade (SONESHINE; MATHER, 1994). Contudo, sabe-se que carrapatos atuam tanto como vetores, como também como reservatórios das rickettsias na natureza (PAROLA et al., 2005). Este fato está relacionado à capacidade de transmissão transovariana e transtadial destas proteobactérias observada em espécies de carrapatos, fazendo com que uma nova geração destes artrópodes, ou novos estágios do mesmo, possam adquirir a infecção pela bactéria, sem a necessidade de um hospedeiro vertebrado.

Contudo, a taxa de infecção no carrapato é considerada muito baixa, quando este se encontra infectado na natureza. Este fato pode estar relacionado ao efeito deletério que algumas espécies de rickettsias possuem também sobre o vetor, diminuindo a postura de fêmeas, sendo também letal para os artrópodes infectados (NIEBYLSKI et al., 1999). Ainda neste contexto, a baixa prevalência de infecção natural pode estar relacionada à infecção mista por mais de uma espécie de *Rickettsia* no vetor, de forma competitiva, impedindo a transmissão da espécie patogênica para a próxima geração (BURGDORFER et al., 1981). Logo, apenas este mecanismo de transmissão não assegura sua manutenção na natureza (McDADE; NEWHOUSE, 1986).

Com isso, é possível que hospedeiros vertebrados participem da amplificação da doença no meio ambiente. Estes hospedeiros são caracterizados como aqueles que

desenvolvem rickettsemia duradoura (alguns dias) após contato prévio com o artrópode infectado. Com isso, quando novos carrapatos promovem o repasto sanguíneo nestes indivíduos, durante o período no qual ainda existem bactérias circulantes no sangue, podem tornar-se vetores potenciais da doença (BURGDORFER, 1988)

E entre os artrópodes vetores de RGFM nas Américas, são incriminados como transmissores da doença carrapatos da espécie *Dermacentor variabilis*, *Dermacentor andersoni*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma aureolatum*. Embora outros carrapatos deste último gênero tenham sido detectados com a presença de *R. rickettsii*, como *Amblyomma ovale*, *A. dubitatum* e *A. triste*, seus papéis na cadeia epidemiológica da doença ainda são desconhecidos.

No Brasil, o principal vetor da doença são carrapatos do gênero *Amblyomma* sp., principalmente da espécie *A. cajennense* (DIAS; MARTINS, 1939). Devido sua baixa especificidade parasitária, acomete tanto animais domésticos, silvestres, como também o próprio homem, principalmente nos estágios imaturos (ARAGÃO; FONSECA, 1961).

A espécie *A. cajennense* possui distribuição ampla em todos os estados do sudeste e centro-oeste, e limitada nas demais regiões (VIEIRA et al., 2004). Da mesma forma, duas outras espécies de carrapato do gênero *Amblyomma* spp. são apontadas como possíveis transmissoras da doença no país. São elas, *Amblyomma dubitatum*, que possui como hospedeiro primário a capivara, e raramente é encontrada parasitando humanos, porém já foram encontrados espécimes infectados em áreas endêmicas (LABRUNA et al., 2004b), o que torna sua participação na transmissão ainda questionável; e *Amblyomma aureolatum*, conhecido como carrapato amarelo do cão foi incriminado como vetor desta bactéria em áreas endêmicas e de Mata Atlântica no estado de São Paulo (RODRIGUES et al., 2002; PINTER, 2003).

Vale destacar também que já foram identificados *R. rickettsii* em exemplares de *R. sanguineus* em áreas com ocorrência de casos de FM (CUNHA et al., 2009; ROZENTAL et al 2009, MORAES-FILHO, 2009; GAZETA et al., 2009). Estudo experimental realizado por Piranda et al. (2008) observaram a capacidade da transmissão desta espécie de carrapato, para cobaias e cães.

Outras espécies de rickettsias já foram identificadas no país, em diversas espécies de carrapatos, como *A. longirostre*, (LABRUNA et al., 2004b), *Haemaphysalis justakochi*, (LABRUNA et al., 2007), *Ixodes loricatus* (HORTA et al., 2006), *Dermacentor nitens* (OLIVEIRA et al., 2008), *A. scalpturatum*, *A. rotudatum*, *A. humerale*, *A. oblongogottatum*, *A. coelebs* (LABRUNA et al., 2004b).

## 2.4 Hospedeiros Vertebrados

No Brasil, *Didelphis aurita* (gambá) a partir de estudos experimentais, observou-se que este animal pode atuar como amplificador de *R. rickettsii* em *Amblyomma cajennense*, apresentando porém, baixa taxa de infecção desta espécie de carrapato, após infestação nestes animais infectados (HORTA et al., 2009). Outros estudos experimentais feitos com capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) demonstraram que este animal também apresenta características favoráveis para a infecção e disseminação de artrópodes infectados com *R. rickettsii* (SOUZA et al., 2009). E a espécie *A. cajennense* assume papel fundamental na transmissão da doença no Brasil, sendo a capivara e os equinos, seus principais hospedeiros nos diferentes estágios do ciclo biológico (VIEIRA et al., 2004).

Além de mamíferos relacionados à participação no ciclo da dispersão destes agentes, em estudo realizado por Pacheco et al. (2012), os autores observaram a presença de carrapatos presentes em aves, que foram positivos para a espécie *Rickettsia parkeri*.

Logo, existe uma série de outras espécies de animais silvestres, que podem estar relacionados à amplificação da doença na natureza. Contudo, em relação aos animais domésticos, o que se observa é que tanto os equinos, como os cães podem atuar como amplificadores da população de carrapatos, e devido à proximidade destes com a população humana, aumentam as chances de contato com vetores possivelmente infectados com a bactéria.

Apesar do grave quadro clínico que pode causar em humanos, não há descrição de sinais clínicos nos equinos (LEMOS et al., 1996). Em relação aos cães, casos clínicos foram descritos nos Estados Unidos (McDADE; NEWHOUSE, 1986) e, mais recentemente no Brasil (LABRUNA et al., 2009). Quando cães são infectados experimentalmente, apresentam sintomatologia de febre, letargia, depressão e lesões oculares, de acordo com a carga parasitária infectante (BREITSCHWERDT et al., 1988; 1991; PIRANDA, 2008). Já foi descrito também casos de incoordenação motora, progredindo ao óbito (MIKSZEWSKI; VITE, 2005).

## 2.5 Métodos de Diagnóstico

O diagnóstico do agente da febre maculosa é realizado, mais frequente e rotineiramente, através de testes sorológicos, sendo a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) considerada teste padrão (CDC, 2011). Neste caso, a amostra é considerada positiva quando apresenta titulação maior ou igual a 1:64 (NEWHOUSE et al., 1979), destacando-se que podem ocorrer reações cruzadas entre as espécies de rickettsias de um mesmo grupo (LA SCOLA, B.; RAOULT, 1997). Entretanto, outros métodos de diagnóstico sorológico são reportados, dentre eles a fixação de complemento, teste de aglutinação, teste de ELISA, Weil-Felix e imunoblotting (LA SCOLA, B.; RAOULT, 1997).

É imprescindível considerar que o diagnóstico definitivo de doença/infecção ativa através do teste sorológico, em especial pelo teste de imunofluorescência indireta, somente poderá ser realizado a partir na análise laboratorial de duas amostras pareadas de soro coletadas no espaço de 14 dias, em média, entre elas, nas quais seja possível identificar um aumento de 4 vezes no título de anticorpos.

Outras técnicas utilizadas são os testes de imunohistoquímica de amostras teciduais, assim como o cultivo celular; sendo este último de difícil utilização na rotina laboratorial devido à necessidade de execução dos procedimentos em um laboratório de nível de biossegurança 3 (NB3) (CHAMPMAN et al., 2006). Para o isolamento e cultivo do parasito, amostras utilizadas podem ser obtidas a partir de triturado de coágulo, plasma, biópsia de pele, tecidos de necropsia e amostras de artrópode, e o material colhido inoculado em linhagens celulares (MELLES et al., 1992; 1999).

As técnicas de biologia molecular têm assumido grande importância na detecção de várias espécies de rickettsias em vetores e hospedeiros, principalmente, espécies de RGFM.

A partir da década de 80, a reação em cadeia da polimerase (PCR) vem sendo testada e utilizada para a detecção molecular das rickettsias (TZIANABOS et al., 1989). Na PCR, o DNA extraído da amostra é amplificado utilizando iniciadores (*primers*) que podem obter a sequência do gene de algumas proteínas como citrato sintase (*gltA*), presente nos organismos do gênero *Rickettsia*, e o gene que expressa a proteína externa de membrana (*ompA*) e (*ompB*), presente nas espécies de RGFM (REGNERY et al., 1991; EREMEEVA et al., 1994).

Outra importante ferramenta molecular, a PCR em tempo real (qPCR), também chamada de “*PCR quantitativa*”, vem sendo utilizada para a detecção deste tipo de agente em diferentes estudos (EREMEEVA et al., 2003; LABRUNA et al., 2004a; KIDD et al., 2008; STENOS et al., 2005). Muitos ensaios têm sido desenvolvidos com diferentes genes como alvo para o diagnóstico, tanto para amostras de sangue (KIDD et al., 2008), quando para a

detecção e quantificação da carga parasitária destes agentes nos possíveis vetores (ZANETTI et al., 2008).

Desta forma, a PCR, associada ao sequenciamento genético são métodos de diagnóstico que vem sendo utilizados também para a análise filogenética das espécies de rickettsias encontradas, favorecendo assim a descoberta de novas cepas circulantes em vetores e hospedeiros (LA SCOLA; RAOULT, 1997).

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Descrição das Áreas de Estudo

O estudo foi realizado em propriedades com a presença de equinos situadas em duas microrregiões do estado do Rio de Janeiro, microrregião de Itaguaí e microrregião Serrana. As coletas foram realizadas durante o período de janeiro a maio de 2009. Foram selecionados três municípios da microrregião de Itaguaí (Seropédica, Itaguaí e Mangaratiba) e dois municípios da microrregião Serrana (Petrópolis e Teresópolis), sendo que em ambas as microrregiões apresentam histórico de casos confirmados de FMB em humanos (MOLITERNO, 2009).

#### 3.1.1. Microrregião de Itaguaí

Município de Itaguaí (22° 51'08'' latitude Sul; 43° 46'31'' longitude Oeste; altitude: 13 metros); Município de Seropédica (22° 44' 38'' latitude Sul; 43° 42' 27'' longitude Oeste; Altitude 26metros); Município de Mangaratiba (22°57' 36" latitude Sul; 44°02'27'' longitude Oeste; altitude 18 metros). O clima da Microrregião de Itaguaí é caracterizado como tropical com estação seca e chuvas no verão (Aw) segundo classificação de Köppen-Geiger (PIEEL et al., 2007). Este clima apresenta temperatura média do mês mais frio do ano >18°C e temperatura média máxima acima de 25°C.

#### 3.1.2. Microrregião Serrana

Município de Petrópolis (22°30'18'' latitude Sul; 43°10'44'' longitude Oeste; altitude: 809 metros) e Teresópolis (22°24'43''latitude Sul; 42°57'57'' longitude Oeste; altitude: 910 metros). O clima da microrregião Serrana é considerado temperado úmido com inverno seco e verão temperado (Cwb) segundo classificação de Köppen-Geiger. Também se encontra a denominação de clima tropical de altitude (PEREIRA, 2009). Este clima apresenta temperatura média nos três meses mais frios do ano de 10°C e nos meses mais quentes acima de 22°C. A temperatura média anual é de 18°C. As estações de verão e inverno são bem definidas.

Esse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética na Pesquisa da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, com número de processo 23083.005971/2011-30 (protocolo N°127/2011).

### 3.2 Tamanho Amostral no Estudo de RGFM nos Carrapatos e Equinos

#### 3.2.1 Carrapatos

Para determinar a ocorrência de RGFM nos carrapatos da espécie *A. cajennense* presentes nos equinos foi calculado um tamanho amostral a partir de uma prevalência média esperada de 5% de carrapatos infectados (LEMOS et al., 1996; HORTA, 2002) em uma população infinita. Com isso, o número mínimo necessário de carrapatos desta espécie a testar foi de 203 exemplares, considerando uma precisão absoluta de 3% e intervalo de confiança de 95%. Entretanto foram analisadas 330 amostras de carrapatos, organizadas em “pools”, de acordo com o estágio de desenvolvimento e dimorfismo sexual, em tubos de polipropileno contendo álcool isopropílico.

Foram coletados, em média, 10 exemplares de carrapatos presentes nos equinos infestados, preservados em tubos de polipropileno contendo álcool isopropílico absoluto e

encaminhados ao Laboratório de Hemoparasitos e Vetores da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, para identificação taxonômica, por meio de chave dicotômica apropriada (BARROS-BATESTTI et al., 2006). Os exemplares identificados como *A. cajennense* foram separados para a análise molecular.

### 3.2.2. Equinos

O cálculo da amostra de equinos foi estipulado com base em estudos sorológicos, obtendo-se uma prevalência média esperada de 40% (LEMOS et al., 1996; HORTA et al., 2004; CARDOSO et al., 2006; MORAES-FILHO et al., 2009; FREITAS et al., 2010; BATISTA et al., 2010), com grau de confiança de 95%, e margem de erro admitida de 7 % para a amostragem dos equinos. A partir da fórmula, foi estabelecido o número mínimo de 100 amostras de equinos por microrregião avaliada, segundo a equação descrita por Sampaio (2002) a seguir:

$$n = \frac{1,96^2 \times P_{\text{esp}}(1 - P_{\text{esp}})}{d^2}$$

Onde: n = tamanho da amostra;  $P_{\text{esp}}$  = prevalência esperada; d = precisão absoluta desejada.

Para a avaliação sorológica foram utilizados 240 equinos, sendo 135 da microrregião de Itaguaí (Seropédica n=50; Itaguaí n=55, Mangaratiba n=30) e 105 da microrregião Serrana (Petrópolis n=60; Teresópolis n=45).

Para o estudo molecular de RGFM nos equinos, o cálculo da amostragem foi estipulado com base em uma prevalência esperada de 50% (SAMPAIO, 2002), uma vez que não há estudos epidemiológicos utilizando o diagnóstico molecular de RGFM em equinos, com grau de confiança de 95%, e margem de erro admitida de 9 % para a amostragem dos equinos. A partir da fórmula, foi estabelecido o número mínimo de 119 amostras de equinos. Neste ensaio molecular, utilizou-se somente um município de cada microrregião, sendo selecionados 138 animais do Município de Seropédica e 134 do Município de Petrópolis.

### 3.3 Questionário Epidemiológico

Foi aplicado um questionário semi-estruturado aos proprietários/ou responsáveis dos equinos para analisar as características das propriedades visitadas, as formas de criação dos equinos presentes na localidade e relacionar os possíveis fatores associados à detecção sorológica e molecular de RGFM nestes animais (ANEXO 1).

De cada equino, formulou-se uma ficha individual do animal, destacando aspectos como a idade, o sexo, a raça, o manejo zootécnico empregado e local da criação. Estes fatores foram analisados considerando as seguintes variáveis:

(i) Microrregião:

- Itaguaí
- Serrana

(ii) Manejo Sanitário e Zootécnico:

- Satisfatório (instalações zootécnicas apropriadas à criação na propriedade, animais recebem alimentação adequada, presença de controle sanitário e assistência veterinária constante)

- Insatisfatório (Instalações zootécnicas inadequadas à criação, os animais não recebem alimentação balanceada rotineiramente, o controle sanitário não é sistemático e a assistência veterinária, quando existe, é esporádica ou utilizada em casos de emergência).

(iii) Sistema de Criação

- Confinado/Semi-confinado (Animal sem acesso ou com acesso parcial a pastagem)
- Extensiva (acesso somente à pastagem)

(iv) Contato ou não com bovinos

- Contato (presença de bovinos na mesma pastagem ou próximos à equinos)
- Sem contato com bovinos

(v) Origem do animal

- Externo à propriedade
- Interno à propriedade (animal nasceu na propriedade)

(vii) Sexo (macho e fêmea)

(viii) Idade (menor de 2 anos e maior ou igual a 2 anos)

(ix) Raça (com raça definida e sem raça definida)

(x) Presença de carrapatos (sim e não).

### 3.4 Coleta de Sangue e Soro

De cada equino foram coletados amostras de sangue, através da punção da veia jugular, em tubos a vácuo. Foram coletadas amostras em tubos de 5mL contendo anticoagulante ácido etileno diamino tetracético (EDTA) e tubos de 10mL sem anticoagulante, ambos mantidos em caixas de isopor com gelo, até o retorno ao laboratório de Hemoparasitas e Vetores da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). De cada tubo contendo anticoagulante (EDTA) foram retiradas alíquotas de 1,0mL de sangue total e, posteriormente, acondicionadas em tubos de polipropileno de 1,5mL, estéreis, mantidos à temperatura de -80°C para extração de ácido desoxirribonucleico (DNA). Os tubos sem anticoagulante foram centrifugados a 6000 x g por 10 minutos para separação do coágulo e obtenção do soro, sendo 1,0mL de cada amostra acondicionada em microtubos de polipropileno de 1,5mL, estéreis, mantidos à temperatura de -20°C até a realização do diagnóstico sorológico.

### 3.5 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Para a detecção de anticorpos anti-*RGFM*, foi realizado teste de imunofluorescência indireta (RIFI), nas amostras dos soros, utilizando antígeno comercial da PANBIO. Foram utilizados 30 µL de cada amostra de soro testado, diluídos em tampão salina fosfatado (PBS) dispostas em cada um dos 12 orifícios presentes nas lâminas. Para a validação do teste foram utilizados também amostras de soros-controles no ensaio (soro equino positivos e negativos para a detecção de anticorpos anti-*RGFM*). Após esta etapa de pipetagem das amostras, as lâminas foram armazenadas em câmara úmida em estufa bacteriológica a 37°C durante 30 minutos. Passado esta etapa, as lâminas foram lavadas com PBS, imersas por dez minutos neste tampão e secas em temperatura ambiente. Depois, em cada orifício foi adicionado 30 µL de conjugado equino diluído em PBS, na proporção de 1:16, e novamente as lâminas foram postas em câmara úmida por 30 minutos a 37°C. Após este procedimento, as lâminas foram lavadas mais uma vez com PBS, e armazenadas há dez minutos neste tampão. Quando secas, as lâminas foram montadas utilizando pequenas gotas de glicerina, para a cobertura com uma lamínula. A reação entre o antígeno fixado e o anticorpo presente nas amostras foi visualizada em microscópio binocular equipado para fluorescência, em aumento de 40 vezes. Amostras com titulação maior ou igual a 1:64 foram consideradas positivas. Este procedimento foi realizado no Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

### 3.6 Extração de DNA das Amostras de Carrapatos e Sangue

Para a extração de DNA destes artrópodes, os espécimes foram macerados com bastão de vidro estéril, após congelamento por nitrogênio líquido. Espécimes de adultos foram

macerados individualmente e espécimes de ninfas foram macerados a partir de “pools” contendo cinco exemplares. Os “pools” foram organizados de acordo com o estágio de desenvolvimento do carrapato, o sexo e conforme o animal de origem. Após esta etapa, o DNA genômico foi extraído baseado em protocolo de extração de DNA genômico total de plantas, segundo Ferreira e Grattapaglia (1998). A cada 11 amostras extraídas, um tubo contendo água ultrapura (Nuclease-Free Water, Ambion®) foi incluído, no intuito de verificar possível contaminação durante o processo de extração das amostras de carrapatos.

A extração de DNA das amostras de sangue foi realizada a partir de 300 µL de sangue total, utilizando-se um Kit de extração de DNA (Wizard® Genomic DNA Purification, Promega, Madison, USA) de acordo com recomendações do fabricante.

As amostras de DNA extraído dos carrapatos e do sangue foram quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop® ND-2000 (Nanodrop Technologies, DE, USA), padronizadas na concentração de 60 ng/µL e armazenadas a -80°C até o momento da realização da técnica de PCR.

### 3.7 Sensibilidade Analítica da PCR na Detecção de RGFM do Estudo

Para avaliar a sensibilidade analítica das técnicas moleculares na detecção de RGFM, foram realizadas diluições seriadas de uma amostra de DNA positiva para RGFM, com concentração de 10ng/µL. Foram feitas oito diluições a partir desta amostra (10ng/µL até 10<sup>-7</sup> ng/µL), realizando-se um ensaio com cada uma destas concentrações, em triplicata, através da PCR.

Com o propósito de avaliar o limite de detecção das técnicas moleculares, e a possível interferência que o DNA dos hospedeiros naturais pudesse exercer na sensibilidade analítica da reação, foram feitas diluições da amostra positiva para RGFM, utilizando DNA do hospedeiro vertebrado e invertebrado. Amostras de DNA dos hospedeiros naturais foram obtidas de carrapatos da espécie *Amblyomma cajennense* oriundos de colônia livre destes patógenos e de um equino sabidamente negativo ao teste.

### 3.8 Ensaio da PCR

A partir da extração, o DNA foi submetido à PCR através de utilização de dois pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), um para amplificar o fragmento do gene citrato sintase (*gltA*), presente em todos os gêneros de *Rickettsia*; e o outro para amplificar um fragmento do gene que codifica uma proteína de 190KDa do gene *ompA*, presente exclusivamente em RGFM. Os seguintes *primers* foram utilizados: Rr190.70p (5'-ATGGCGAATATTTCTCCAAAA-3') e Rr190.602n (5'-AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT-3') para o gene *ompA* (REGNERY et al., 1991); e os *primers* RpCS.877p (5'-GGGGACCTGCTCACGGCGG-3') e RpCS.1258n (5'-ATTGCAAAAAGTACA GTGAACA- 3') para o gene *gltA* (REGNERY et al., 1991). Todas as reações foram realizadas em volume final de 25µL, contendo: 1X AmplitaqGold PCR Master Mix (Life-Technologies®), 0,6µM de cada *primer* (Rr190.70p/ Rr190.602n), utilizado na amplificação do fragmento de 532 pb do gene *ompA* e 5µL (aproximadamente 60ng) de DNA total. Na reação de amplificação do fragmento de 381 pb do gene *gltA*, utilizou-se o *primer* específico (RpCS.877p/ RpCS.1258n) na concentração de 0,6µM de cada oligonucleotídeo iniciador. As reações foram realizadas em placas de 96 poços e a cada 5 poços foi acrescentada água ultrapura (Nuclease-Free Water, Ambion®) como controle negativo, com o objetivo de verificar possível contaminação durante o processo de pipetagem do DNA. Para o controle positivo utilizou-se DNA de uma amostra sabidamente positiva *R. rickettsii*.

As reações para amplificação dos fragmentos de ambos os genes foram realizadas por Touchdown PCR em termociclador (Mastercycler Pro-S, Eppendorf®) e o programa de amplificação foi constituído por um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; seguido de 10 ciclos de 95°C por 40 segundos; anelamento com variação da temperatura de 60-55°C (redução de 0,5°C/ciclo) por 45 segundos; extensão a 72°C por 45 segundos, e outros 35 ciclos seguintes: 95°C por 40 segundos; 55°C por 45 segundos; 72°C por 45 segundos; 72°C por 7 minutos. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão de corrida TAE (40mM Tris-acetato, 2 mM EDTA pH 8,0), durante 60 minutos, à 90V, seguido por coloração em brometo de etídio e visualização dos produtos amplificados sob luz ultravioleta, através de transiluminador (Electronic UV Transilluminator, L-PIX TOUCH).

Para a confirmação dos resultados, amostras que apresentaram amplificação, uma nova PCR foi realizada com os mesmos pares de *primers*, seguindo a programação do ciclo constituído por uma temperatura de desnaturação inicial das fitas de DNA a 95°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos consecutivos de 40 segundos a 95°C para desnaturação, para anelamento temperatura de 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e um ciclo de 7 min a 72°C. Para esta reação foi usado 8 µL de DNA adicionado a tampão para PCR (10X Invitrogen™), dois pares de marcadores (20mM), MgCl<sub>2</sub> (3mM), dNTPs (20mM), Platinum Taq DNA Polimerase (5 U/µL Invitrogen™) e água livre de nucleases em um volume final de 25µL. Da mesma forma, o produto da PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1% e corado em brometo de etídio, para visualização dos produtos amplificados sob luz ultravioleta, através de transluminador.

### 3.9 Análise estatística

Foi realizada uma análise descritiva dos dados relacionados às propriedades e aos valores de frequência de soropositividade para detecção de anticorpos da classe IgG anti-*Rickettsia rickettsii* nos equinos em função das duas microrregiões, através do teste Exato de Fisher a um nível de 5% de significância.

Para a avaliação dos possíveis fatores associados à soropositividade, as variáveis independentes selecionadas a partir do questionário epidemiológico foram analisadas em função da frequência da detecção de anticorpos anti-*R. rickettsii*, utilizando o teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de 20% de significância, sendo as variáveis com diferença estatística incluídas no modelo de regressão logística, em nível de 5% de significância, através do programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2010).

Dentre as variáveis independentes que apresentaram diferença estatística significativa ( $p < 0,20$ ) na análise bivariada, foi elaborada uma matriz de coeficiente de correção através do teste de correlação de Spearman, com o objetivo de verificar a colinearidade e eliminar as variáveis altamente correlacionadas do modelo de regressão logística. Variáveis cujo coeficiente de correlação ( $\rho$ ) está abaixo de 0,8 não estão altamente correlacionadas e, portanto, são adequadas para utilização na análise multivariada (KATZ, 1999). No teste de Spearman, somente as variáveis independentes com  $p > 0,05$ ,  $p < 0,05$  associado ao  $\rho < 0,6$  foram mantidas no modelo de regressão logística. Entre duas variáveis altamente correlacionadas ( $p < 0,05$  e  $\rho \geq 0,6$ ), a biologicamente mais importante foi mantida no modelo.

As variáveis “infestação por carrapatos” e “altitude da propriedade” foram analisadas frente à frequência de equinos sororreativos para RGFM, através do teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de 20% de significância, sendo as aquelas que apresentaram diferença estatística incluídas no modelo de regressão logística, em nível de 5% de significância, através do programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2010).

As características das propriedades analisadas foram comparadas em função da presença de pelo menos um equino sororreativo para RGFm na propriedade através do teste Exato de Fisher a 5% de significância, sendo relacionada à razão das frequências (RF) de cada variável independente, frente à soropositividade dos animais.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Aspectos Soro-epidemiológicos de RGFM nos Equinos do Estudo

Na Tabela 1 estão demonstrados os valores referentes à análise descritiva das propriedades com equinos considerados sororreativos para a classe IgG anti-*Rickettsia rickettsii* através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), nas duas microrregiões estudadas.

Em relação aos aspectos epidemiológicos relacionados à soropositividade, observou-se que de 240 equinos analisados, 21 animais (8,8%) foram sororreativos para a classe IgG anti-*R. rickettsii*. Do total de 42 propriedades analisadas, 31% (n=13/42) apresentaram pelo menos um equino sororreativo através do teste da RIFI. A frequência de propriedades da microrregião de Itaguaí com pelo menos um equino sororreativo foi de 38,1% (n=8/21), não apresentando diferença da microrregião Serrana (23,8%, n=5/21, p>0,05)(Tabela 1).

O número médio±desvio-padrão de animais analisados por propriedade foi de 5,7±1,9 (amplitude: 1-10) e, destes, observou-se média±desvio-padrão de 0,5±0,9 (amplitude: 0-3) de animais sororreativos ao teste, por propriedade avaliada. O valor médio±desvio-padrão de equinos sororreativos foi de 0,8±1,1 para a microrregião de Itaguaí e 0,3±0,7 para a microrregião Serrana (Tabela 1). Dentre os municípios estudados, a maior frequência de equinos sororreativos foi observada no município de Seropédica, com 18,8% (n=9/50) e a menor frequência observada foi de 3,3% (n=2/60), nos equinos avaliados no município de Petrópolis.

**Tabela 1.** Análise descritiva das propriedades a partir da detecção de anticorpos da classe IgG anti-*Rickettsia rickettsii* em equinos através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) nas microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.

Microrregião	Propriedades com equinos sororreativos		Equinos por propriedade				Equinos sororreativos por propriedade			
	N	(%)	M	DP	EP	Amp.	M	DP	EP	Amp.
Serrana	21	23,8 <sup>a</sup>	5,3	1,4	0,3	1 – 10	0,3	0,7	0,1	0 – 2
Itaguaí	21	38,1 <sup>a</sup>	6,4	2,3	0,5	5 – 10	0,8	1,1	0,2	0 – 3
Total	42	31,0	5,7	2,0	0,3	1 – 10	0,5	0,9	0,1	0 – 3

<sup>a</sup>Valores seguidos da mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente pelo teste Exato de Fisher, a 5% de significância. N: Total de Propriedades; M.: Média; DP: Desvio-padrão; EP: Erro-padrão. Amp.: Amplitude.

Na Tabela 2, observa-se a análise bivariada e multivariada dos fatores associados à soropositividade dos equinos frente à detecção de anticorpos anti-*R. rickettsii* através da RIFI. Dentre todas as variáveis independentes, o sexo, a idade e a raça não apresentaram associação estatística (p>0,20) a partir da análise bivariada (Tabela 2). Vale destacar que na análise bivariada, a maioria dos equinos sororreativos foram animais da microrregião de Itaguaí, nascido na propriedade, oriundos de criações com o manejo sanitário e zootécnico insatisfatório, com sistema de criação extensivo, tendo a presença de bovinos na mesma pastagem ou nos arredores da criação e infestados por carrapatos (p<0,20). Estas variáveis, quando submetidas à regressão logística, apenas a infestação por carrapatos foi à variável mais influente para a soropositividade dos animais (p<0,05; OR: 6,1; IC: 1,1- 32,9).

**Tabela 2.** Análise bivariada e multivariada da frequência de equinos soropositivos através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para anticorpos da classe IgG anti-*Rickettsia rickettsii*, em função dos fatores associados, como gênero, idade, definição racial, manejo dos animais, origem, sistema de criação, contato com bovinos e presença de carrapatos nas propriedades das microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.

Características dos animais e manejo	N	(%)	Bivariada		Multivariada		
			$\chi^2$	P	P	OR	IC 95%
<b>Gênero</b>							
Fêmea	101	7,9	0,15	0,87	-	-	-
Macho	139	9,4					
<b>Idade</b>							
< 2 anos	24	4,2	**	0,70	-	-	-
≥ 2 anos	216	9,3					
<b>Definição racial</b>							
Com raça	155	7,1	1,49	0,32	-	-	-
Sem raça definida	85	11,8					
<b>Microrregião</b>							
Serrana (>400m)	105	5,7	**	0,17	0,30	-	-
Itaguaí (<400m)	135	11,1					
<b>Manejo Zootécnico e Sanitário</b>							
Satisfatório	129	3,1	11,14	0,00	0,11	*	-
Insatisfatório	111	15,3					
<b>Origem do animal</b>							
Interno	68	14,7	4,22	0,04	0,19	*	-
Externo	172	6,4					
<b>Sistema de criação</b>							
Semi-confinado/Confinado	194	7,2	2,98	0,15	0,21	*	-
Extensivo	46	15,2					
<b>Contato com bovinos</b>							
Não	173	5,8	6,84	0,01	0,18	*	-
Sim	67	16,4					
<b>Infestação por carrapatos</b>							
Não	126	1,6	**	0,02	0,03	*	-
Sim	114	16,7					

N: Número de amostras de animais;  $\chi^2$ : Valor do Qui-quadrado; \*\*Teste Exato de Fisher; P: p-valor; OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de confiança. \*Categoria de referência.

Em relação aos carrapatos coletados nos equinos do estudo foram observados ocorrência de duas espécies, *A. cajennense* e *D. nitens* em diferentes estágios de desenvolvimento e em diferentes níveis de infestação sobre os animais, em ambas as microrregiões. E a partir de uma análise bivariada da detecção de anticorpos da classe IgG anti-*R. rickettsii* nos equinos e infestação por carrapatos nos animais foi observado associação estatística ( $p < 0,05$ ). Contudo, após a análise multivariada da variável “infestação por carrapato” frente às duas espécies de carrapatos observadas sobre os equinos, foi possível observar que somente a espécie *A. cajennense* apresentou associação com a soropositividade dos equinos (OR= 11,1; IC: 2,3 – 51,7) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Análise bivariada e multivariada da frequência de equinos soropositivos através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para anticorpos da classe IgG anti-*Rickettsia rickettsii*, em função da presença de carrapatos nos animais das microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.

Presença de carrapato	N	(%)	Bivariada		Multivariada		
			P**	P	OR	IC 95%	
<i>Amblyomma cajennense</i>							
Sim	114	16,7	0,00	0,00	11,1	(2,3 – 51,7)	
Não	126	1,6					*
<i>Dermacentor nitens</i>							
Sim	81	14,8	0,02	0,60	-	-	
Não	159	5,7					-

N: Número de amostras de animais;  $\chi^2$ : P: p-valor; \*\*Teste Exato de Fisher; OR: *Odds Ratio*; IC: intervalo de confiança; \*: Valor de referência para análise multivariada.

Na Tabela 4 estão demonstrados os valores de soropositividade dos equinos frente à detecção de anticorpos da classe IgG anti-*R. rickettsii*, em função do efeito isolado da altitude das propriedades, nas regiões estudadas. Através da análise bivariada e multivariada, foi possível observar que, dentre as faixas de altitude selecionadas, não houve diferença entre a soropositividade dos equinos e localização da propriedade em relação à altitude ( $p>0,05$ ) (Tabela 4).

**Tabela 4.** Análise bivariada e multivariada frequência de equinos soropositivos através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para anticorpos da classe IgG anti-*Rickettsia rickettsii*, em função da altitude da propriedade das microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.

Altitude	N	(%)	Bivariada		Multivariada		
			$\chi^2$	P	P	OR	CI 95%
Abaixo de 100m	135	11,1	2,99	0,20	0,13	-	-
Entre 100m e 800m	65	7,7			0,29	-	-
Acima de 800m	40	2,5			*	-	-

N: Número de propriedades analisadas;  $\chi^2$ : Valor do teste Qui-quadrado; P: p-valor; OR: *Odds Ratio*; CI: Intervalo de Confiança. \*Categoria de referência.

Na Tabela 5 estão demonstradas as análises dos fatores associados à propriedade e a presença de pelo menos um equino sororreativo na criação, em função do local de criação, dos aspectos relacionados ao manejo dos animais e da presença de *A. cajennense* nos equinos da propriedade.

A partir desta análise foi possível demonstrar que houve associação estatística entre a presença de pelo menos um equino na propriedade sororreativo com criações com o manejo sanitário e zootécnico insatisfatório ( $p<0,05$ ; RF: 2,72) e o contato com bovinos ( $p<0,05$ ; RF: 2,74). Embora não tenha apresentado associação estatística entre a presença de pelo menos um equino sororreativo na propriedade e a frequência de animais infestados por *A. cajennense* ( $p>0,05$ ), vale destacar que a frequência de equinos sororreativo em propriedades com a presença de *A. cajennense* no plantel (38,7%) foi 4,26 vezes maior do que a frequência de equinos sororreativos de propriedades sem a presença deste artrópode (9,1%) (Tabela 5).

**Tabela 5.** Análise bivariada da presença de pelo menos um equino soropositivo através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para anticorpos da classe IgG anti-*Rickettsia rickettsii*, em função da microrregião, do manejo utilizado, do sistema de criação, do contato com bovinos e da infestação por carrapatos da espécie *Amblyomma cajennense* nos animais da propriedade, estado do Rio de Janeiro.

Características das propriedades	N	(%)	Bivariada		
			P**	RF	CI 95%
<b>Microrregião</b>					
Serrana	21	23,8	0,30	1	(0,6 – 4,1)
Itaguaí	21	38,1		1,60	
<b>Manejo Zootécnico e sanitário</b>					
Satisfatória	23	17,4	0,04	1	(1,0 – 7,1)
Insatisfatória	19	47,4		2,72	
<b>Sistema de Criação</b>					
Semi-confinado/Confinado	34	29,4	0,68	1	(0,5 – 3,6)
Extensivo	8	37,5		1,28	
<b>Contato com bovinos</b>					
Não	32	21,9	0,04	1	(1,2 – 6,2)
Sim	10	60,0		2,74	
<b>Infestação por <i>A. cajennense</i> nos equinos da propriedade</b>					
Não	11	9,1	0,12	1	(1,4 – 27,7)
Sim	31	38,7		4,26	

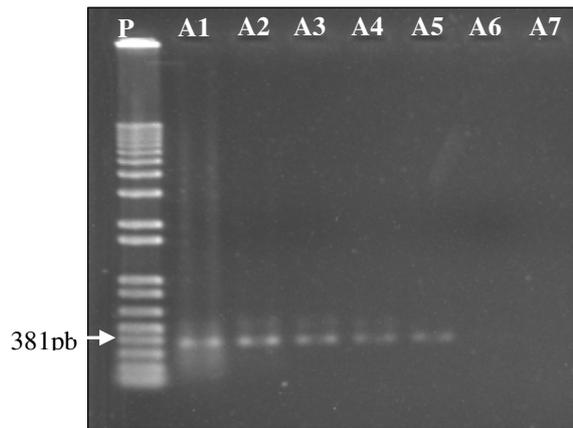
N: Número de propriedades analisadas; P: p-valor; \*\*Teste Exato de Fisher; RF: Razão de frequência; CI: Intervalo de Confiança.

#### 4.2 Detecção Molecular de RGFM em Amostras de DNA de Equinos e Carrapatos

Em relação à sensibilidade analítica da técnica, pode-se observar que o limite de detecção do fragmento de DNA amplificado de RGFM, utilizando diluições seriadas de um DNA extraído de uma amostra sabidamente positiva (10ng/μL) para este patógeno foi possível detectar até (10<sup>-4</sup>ng/μL) de DNA, através da PCR utilizando oligonucleotídeos para amplificação de um fragmento de 381pb do gene *gltA* (Figura 1).

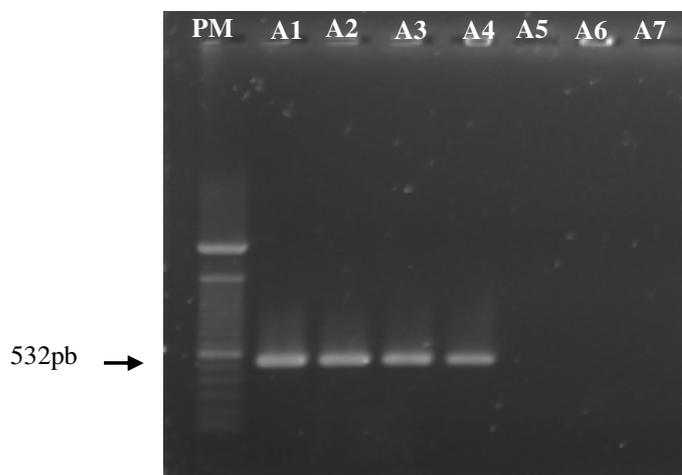
A partir de diluições seriadas deste DNA positivo para o agente, complexado com o DNA de carrapatos da espécie *Amblyomma* oriundos de colônia livre de patógenos foi possível observar, através da PCR, o mesmo limite de detecção de diluição (10<sup>-4</sup>ng/μL) do DNA. Este achado também foi observado, quando o DNA positivo foi complexado em DNA de sangue de equino livre do agente pesquisado.

Em relação à sensibilidade analítica da técnica, foi possível observar que o limite de detecção do fragmento de DNA amplificado de RGFM, utilizando diluições seriadas de um DNA extraído de uma amostra sabidamente positiva (10ng/μL) para este patógeno, foi possível detectar até 10<sup>-3</sup>ng/μL de DNA, através da PCR convencional, utilizando oligonucleotídeos para amplificação de um fragmento de 532pb do gene *ompA* (Figura 2).



**Figura 1.** Gel de agarose (1%) com produtos da amplificação do fragmento de 381pb do gene *gltA*, específico para o gênero *Rickettsia*. PM: Peso molecular de 100pb; A1-A7: Amostras de DNA positivas para RGFM, através da PCR convencional, em diluições seriadas (10ng/μL até 10<sup>-4</sup>ng/μL).

A partir de diluições seriadas deste DNA positivo para o agente, complexado com o DNA de carrapatos da espécie *Amblyomma* oriundos de colônia livre de patógenos, foi possível observar, através da PCR convencional, o limite de detecção de diluição de 10<sup>-3</sup>ng/μL do DNA. Este achado também foi observado, quando o DNA positivo foi complexado em DNA de sangue de equino livre do agente pesquisado.



**Figura 2.** Gel de agarose (1%) com produtos da amplificação do fragmento de 532pb do gene *ompA* específico para RGFM. PM: Peso molecular de 100pb; A1-A7: Amostras de DNA positivas para RGFM, através da PCR convencional, em diluições seriadas (10 ng/μL até 10<sup>-3</sup>ng/μL).

Foram coletados e analisados 606 espécimes identificados como sendo carrapatos da espécie *A. cajennense*, nos estágios de ninfa e adulto. Os espécimes em estágio larval de desenvolvimento foram identificados somente ao nível de Sub-ordem, sendo caracterizados como Ixodides. Destes 606 espécimes coletados foram analisados 330 “pools” de DNA destes carrapatos, identificados pelo sexo e pelo estágio de desenvolvimento do artrópode e animal de origem. Em relação ao DNA das 330 amostras de carrapatos testadas na PCR para os genes *gltA* e *ompA*, conforme metodologia descrita, não foi evidenciado a amplificação para o

fragmento relacionado ao gene *gltA*, assim como também para o gene *ompA*, após visualização a partir da eletroforese em gel de agarose a 1%.

Do total de 272 amostras de DNA extraídos do sangue dos equinos analisados, através da PCR, não foi detectada nenhuma amplificação do fragmento de 381pb do gene *gltA*, específico para o gênero *Rickettsia*, e de 532pb do gene *ompA*, a partir da metodologia realizada no presente estudo.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Aspectos Soro-epidemiológicos de RGFM nos Equinos da Área de Estudo

No Brasil, a pesquisa de RGFM vem sendo conduzida em diferentes estados da federação, tanto em áreas consideradas endêmicas para a doença, quanto em áreas não endêmicas. Em muitos destes estudos, ensaios sorológicos através reação da imunofluorescência indireta (RIFI) foram preconizados visando determinar de forma indireta a circulação deste agente infeccioso em hospedeiros susceptíveis nestas regiões avaliadas (LEMOS et al., 1996; HORTA et al., 2004; SANGIONI et al., 2005; CARDOSO et al., 2006). Dentre estes hospedeiros vertebrados, destacam-se os cães e os equinos, grupo de animais domésticos utilizados nestes ensaios como indicadores da circulação deste agente etiológico, atuando como sentinelas para a doença (PINTER et al., 2008; CUNHA, 2009; TOLEDO et al., 2011).

A frequência de soropositividade para RGFM pode variar bastante de uma região para outra, assim como de um estado para o outro ou mesmo de um período para outro em uma mesma área. Geralmente, em áreas consideradas endêmicas para febre maculosa é possível observar elevadas frequência de soropositividade destes animais frente RGFM. E particularmente, com relação à soropositividade dos equinos, Lemos et al. (1996) observaram que 77,8% (n=7/9) de animais positivos através da RIFI, em área endêmica do estado de São Paulo. Horta et al. (2004; 2007) obtiveram resultados semelhantes, também no estado de São Paulo, com 77,3% (n=17/22) e 72,9% (n=62/85), respectivamente. Vianna et al. (2008), também em área endêmica, observaram 100% (n=11/11) de soropositividade dos equinos avaliados no estado de Minas Gerais. Ainda no estado de Minas Gerais, Cardoso et al. (2006) observaram 17% (n=3/18) de equinos soropositivos através da RIFI, em uma região de foco silencioso da febre maculosa, sem o registro de novos casos humanos a mais de dez anos. Freitas et al. (2010), em estudo realizado com cavalos carroceiros no estado do Paraná observaram 9,33% (n=7/75) de animais soropositivos. Ainda no mesmo estado, Batista et al. (2010) observaram semelhante soropositividade frente a detecção de anticorpos anti-*R. rickettsii* em equinos (8,45%; n=6/71). Cunha (2009) observou frequência de 9,4% dos equinos sororreativos, no município de Resende, estado do Rio de Janeiro.

Embora a soropositividade seja alta nos animais em áreas endêmicas, alguns estudos apontam para frequências abaixo da média observado para outras regiões, como o estudo de Moraes-Filho et al. (2009), quando observaram 17,6% (n=64/365) em equinos de diferentes bairros no município de São Paulo.

No presente estudo foi possível observar um frequência de 8,8% (n=21/240) de equinos sororreativos através da RIFI para antígenos de *R. rickettsii*. Este resultado foi semelhante ao observada em outros estudos em áreas não endêmicas (FREITAS et al., 2010; BATISTA et al., 2010). Embora tenha sido observada uma frequência relativamente baixa de soropositividade do total de equinos analisados, frente a outras regiões, vale destacar que 31% das propriedades avaliadas apresentaram pelo menos um equino sororreativo, e que em ambas as microrregiões apresentaram animais soropositivos através da RIFI.

Outro aspecto importante é que tanto os equinos, quanto os caninos podem ser utilizados como animais sentinelas para o agente da FM, e em alguns estudos, a espécie canina apresentou maiores frequências de soropositividade, frente à espécie equina (CUNHA, 2009). Este fato pode estar relacionado à possível espécie de carrapato envolvido na transmissão em cada região analisada, que dependendo da espécie do artrópode, pode estar mais atrelado a infestações nos cães, do que nos equinos, como ocorre em estudo que apontam

*A. aurelatum* (PINTER; LABRUNA, 2006) e *Rhipicephalus sanguineus* (CUNHA et al., 2009) como possíveis vetores da doença em regiões com a ocorrência de casos da doença.

No estado do Rio de Janeiro, desde os primeiros relatos da doença em 1941, a ocorrência de novos casos vem sendo reportada ao longo dos anos, sendo descrito em diferentes municípios do estado, com a ocorrência de casos fatais (LEMOS et al., 2002b; ROZENTAL et al., 2006; LAMAS et al., 2008). Vale destacar que os municípios presentes nas microrregiões selecionados para o estudo não são considerados endêmicos para a doença, porém a maioria destes selecionados ao estudo apresentou pelo menos um registro de caso confirmado de febre maculosa em humanos, e particularmente, na microrregião Serrana, onde um surto da doença, com casos fatais, foi registrado no ano de 2005 (MOLITERNO, 2009). Logo, a partir destes resultados é possível observar de forma indireta a circulação deste agente em ambas às microrregiões estudadas, e a possibilidade de utilizar os equinos como forma de avaliação indireta da presença deste microorganismo nestas regiões.

Além de animais sentinelas, os equinos possuem o papel de amplificadores dos vetores da febre maculosa, carrapatos da espécie *A. cajennense*. Este carrapato é incriminado como um dos principais vetores da doença no país (DIAS; MARTINS, 1939; LEMOS et al., 1997; GUEDES et al., 2005). Equinos, capivaras e antas são seus principais hospedeiros (LABRUNA et al., 2001). Contudo, devido a baixa especificidade parasitária, *A. cajennense* pode infestar outros hospedeiros vertebrados, e de forma acidental o próprio homem (ARAGÃO; FONSECA, 1961; PAROLA; RAOULT, 2001).

No presente estudo foi possível observar a presença de duas espécies de carrapatos infestando os equinos, *A. cajennense* e *D. nitens*, em diferentes níveis e estágios de desenvolvimento. E dentre os fatores associados à detecção de anticorpos anti-*R. rickettsii* nos equinos, a infestação por carrapatos foi o fator mais significativo (Tabela 2). Ainda sobre este aspecto foi possível observar, após análise multivariada dos dados, a presença de carrapatos da espécie *A. cajennense* nos equinos foi determinante para a soropositividade dos equinos estudados como é possível observar na Tabela 3. Sob o aspecto da transmissão deste agente, esta espécie de carrapato é incriminada como o principal vetor no Brasil, e estudos apontam associação entre a presença do gênero *Amblyomma* e a ocorrência de casos em áreas consideradas endêmicas para a doença (LEMOS et al., 1997a; HORTA et al., 2004; SANGIONI et al., 2005).

Outras espécies deste gênero de carrapato também já foram observadas com a presença de RGFM em outros estudos, com destaque para a espécie *A. aureolatum*, conhecida como carrapato “amarelo” do cão, que também possui estreita relação na transmissão da doença em algumas áreas endêmicas do estado de São Paulo (LABRUNA et al., 2004). Além disso, outras espécies de carrapatos também foram identificadas com a presença de RGFM, como *Dermacentor (Anocentor) nitens*, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Haemaphysalis juxtakochi* e *Ixodes loricatus*, mas o papel destas na cadeia de transmissão da doença no Brasil ainda é desconhecido (LEMOS et al., 1997b; ROZENTAL et al., 2002, 2009; OLIVEIRA et al., 2008; MORAES-FILHO et al., 2009, CUNHA et al., 2009).

No presente estudo, embora inicialmente a presença de *D. nitens* sobre os equinos tenha tido associação com a soropositividade dos animais, este resultado não se manteve após análise multivariada (Tabela 3). O papel deste carrapato na cadeia de transmissão da doença é desconhecido, uma vez que esta espécie não é observada provendo parasitismo em humanos. No entanto, a sua capacidade de auxiliar na manutenção do ciclo de *R. rickettsii* entre os equinos não deve ser desconsiderada. Além disso, devido a sua característica de ser um carrapato monóxeno, os diferentes estágios de desenvolvimento ocorrem em um único hospedeiro, principalmente em equinos, o que limita o contato desta espécie com outros hospedeiros vertebrados susceptíveis a doença. Assim, esta espécie pode estar atuando, mais

como um reservatório de RGFM na natureza, do que como vetor da doença (LEMOS et al., 1997).

Além da infestação por carrapatos, outros fatores foram analisados frente à soropositividade dos equinos, no presente estudo. Porém, estes não apresentaram associação estatística após análise multivariada dos dados, o que demonstra a elevada significância desta variável (infestação por carrapatos), frente às demais analisadas em relação à soropositividade dos animais (Tabela 2). Contudo, é importante mencionar que animais da microrregião de Itaguaí, com manejo zootécnico insatisfatório, nascidos na propriedade, em sistema de criação extensivo e com a presença de bovinos na pastagem da criação apresentaram associação estatística ( $p < 0,20$ ) com a soropositividade dos equinos, em um primeiro momento da análise. Estes fatores podem estar relacionados de forma indireta com a infestação dos equinos nas propriedades avaliadas e assim favorecer a possível infecção dos animais por este agente etiológico transmitido por carrapatos vetores.

Logo, aspectos climáticos da microrregião com maior frequência de animais soropositivos podem estar relacionados às melhores condições para o desenvolvimento e proliferação dos vetores desta bactéria nesta região. Em relação às faixas de altitudes selecionadas nas propriedades foi possível observar que não houve associação com a soropositividade dos animais. Este aspecto reforça que as características presentes nas microrregiões podem ter sido mais influentes do que a própria altitude de cada propriedade analisada, demonstrando que em ambas as microrregiões existem a presença de possíveis carrapatos vetores. Entretanto, embora tenha ocorrido associação entre a soropositividade dos animais e a localização destes de acordo com a microrregião, em uma primeira análise ( $p < 0,20$ ), estes aspectos não se mantiveram com a significância estatística quando analisado juntamente com os outros possíveis fatores observados.

Da mesma forma, os aspectos zootécnicos e sanitários caracterizados como insatisfatórios da criação podem estar diretamente relacionados com o controle inadequado de ectoparasitos, o que amplia as chances dos equinos de albergarem carrapatos vetores, nestas propriedades, justificado desta forma a associação entre a soropositividade dos equinos e as características do manejo, na primeira análise. O controle destas espécies de carrapato foram discutidos por Cunha et al. (2007a,b) e Bello et al. (2008), sendo demonstrados aspectos inerentes a dificuldade e a necessidade de adoção de medidas estratégicas que visem o combate destes carrapatos.

Além disso, sobre os aspectos da criação em si, o sistema de criação a pasto ou extensivo dos animais ampliam as chances dos equinos de se infestarem em pastagem com a presença destes artrópodes. Labruna et al. (2001) observaram que equinos criados em pastagem “sujas”, com a presença de arbustos junto a gramínea favorece a infestação por carrapatos da espécie *A. cajennense*.

A presença de outros animais, como os bovinos podem proporcionar um número maior de hospedeiros para os carrapatos presentes na propriedade, e favorecer a manutenção da população destes carrapatos na propriedade. Considerando que a espécie de carrapato *A. cajennense*, possui baixa especificidade parasitária, este pode parasitar outros animais, como os bovinos, o que acaba ampliando a sua capacidade de dispersão na propriedade (SERRA-FREIRE; CUNHA, 1987).

Todos estes aspectos abordados frente a soropositividade dos equinos são reforçados quando, ao se avalia as características das propriedades de forma isolada, observou-se que o manejo zootécnico insatisfatório e a presença de bovinos na criação apresentaram associação com a detecção de pelo menos um equino na propriedade sororreativo para anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii*. É importante mencionar que em ambas as variáveis, a frequência de propriedades com pelo menos um equino positivo na RIFI foi 2,7 vezes acima do que a frequência de propriedades com manejo zootécnico satisfatório e sem a presença de bovinos.

Ainda sobre os aspectos da propriedade, a infestação por *A. cajennense* nos equinos, não apresentou associação estatística ( $p>0,05$ ) com a frequência de propriedade com a presença de equinos sororreativos. Porém, a frequência de propriedades com equinos soropositivos para RGFM e que apresentavam esta espécie de carrapato nos animais da propriedade foi 4,2 vezes maior do que a frequência de soropositivos sem a presença deste carrapato, o que reforça mais uma vez a participação deste artrópode na transmissão deste agente também para os equinos. Em um estudo conduzido por Melo et al (2011) foi possível observar que cães que estavam infestados por carrapatos da espécie *A. cajennense* apresentaram 5,9 vezes mais chances de estarem sororreativos para *Rickettsia* sp.

No presente estudo, aspectos relacionados aos equinos, o sexo e idade não apresentaram associação com a positividade dos animais. Este resultado corrobora outros estudos (CUNHA, 2009).

Em relação a outros fatores associados à soropositividade de animais para *Rickettsia* sp., Saito et al. (2008) observaram que cães que tinham contato com pastos ou florestas apresentaram duas vezes mais chances de serem sororreativos para este grupo de bactérias. Da mesma forma, Cunha (2009) observou associação da soropositividade dos cães frente ao contato do animal com áreas de mata. Melo et al. (2011) observaram que cães de áreas rurais apresentaram 5,5 vezes mais chances de serem sororreativos do que cães de área urbana. No presente estudo, embora utilizando equinos como animais sentinelas, não foi possível observar a associação estatística entre os animais e a criação a pasto. Contudo, foi possível observar que propriedades que mantinham equinos criados a pasto, juntamente ou próximos a bovinos foram associados à frequência de pelo menos um equino sororreativo a RGFM. Este fato demonstra que o acesso a pastagem, atrelada a outros animais possivelmente infestados por carrapatos vetores, como carrapatos da espécie *A. cajennense* ampliam as chances destes animais de se infestarem e, conseqüentemente, se infectarem com este agente.

## 5.2 Detecção Molecular de RGFM em Amostras de DNA de Equinos e Carrapatos

No presente estudo, não foi observado a ocorrência de amplificação do gene-alvo para *Rickettsia* sp. nas amostras de carrapatos da espécie *A. cajennense*. Embora este resultado tenha sido observado nos carrapatos selecionados para estudo, este fato não minimiza o potencial que este artrópode possui em transmitir este o agente etiológico da febre maculosa, principalmente em áreas com o histórico da doença em humanos. E devido à detecção sorológica de RGFM nos equinos, presentes neste estudo demonstram a potencia circulação deste grupo de bactérias, que provavelmente também estão presentes na população de carrapatos na área de estudo. Assim, o resultado negativo da PCR neste grupo de carrapatos selecionados ao estudo não descarta a necessidade de novas pesquisas nesta mesma região, reforçando a necessidade da vigilância acarológica na região estudada, como uma ferramenta auxiliar para a vigilância epidemiológica da doença.

Além disso, vale destacar que estudos demonstram que a positividade de espécimes de carrapatos analisados de áreas endêmicas para a doença apresenta uma frequência baixa de positividade na população destes artrópodes (LEMOS et al, 1997; GUEDES et al., 2005; VIANNA et al., 2008).

Sob condições naturais, a população de carrapatos possui uma taxa variada de infecção para RGFM, fato este relacionado ao local de coleta, à espécie de carrapato analisada e à técnica de diagnóstico utilizada, entre outros fatores. Em estudo realizado por Lemos et al. (1997a), utilizando a coloração de *Giemsa* no teste de hemolinfa, observaram uma taxa de 8,1% (n=514) de carrapatos com microorganismos no interior dos hemócitos, sugestivos de rickettsias, no estado de Minas Gerais. Destes, apenas 1% (n=269) dos carrapatos coletados da espécie *A. cajennense* foram reativos ao teste de imunofluorescência direta. Guedes et al.

(2005) detectaram a presença de *R. rickettsii*, em 1,28% (n=78) dos carrapatos da espécie *A. cajennense*, em uma área endêmica do estado de Minas Gerais, através da PCR. Guedes et al. (2011) ao analisarem esta mesma região endêmica, após três anos, observaram que a taxa de infecção da população de carrapatos desta espécie foi de 0,5% (n=400). Sangioni et al. (2005) observaram uma prevalência total de 4,9% de carrapatos da espécie *A. cajennense* positivos para o gênero *Rickettsia*, oriundos de áreas endêmicas e não endêmicas, do estado de São Paulo. Outros estudos reportam que a taxa de infecção na população de outros carrapatos vetores de *R. rickettsii* pode variar de 0,05 a 1,3% (BURGDORFER, 1988 apud GUEDES et al., 2005; PINTER; LABRUNA, 2006).

Outros estudos realizados em áreas endêmicas não observaram a positividade de espécimes de *A. cajennense* para rickettsias. Dentre estes, Vianna et al. (2008), após analisarem 356 espécimes de *A. cajennense*, não observaram nenhum exemplar PCR positivo. Sangioni et al. (2005), após avaliar 810 exemplares de *A. cajennense* de áreas endêmicas também não observaram nenhum espécime com a presença de DNA para *R. rickettsia*. Da mesma forma, Pacheco et al. (2009), também não observou a presença de DNA de *Rickettsia* sp. em *A. cajennense*, em 16 localidades do estado de São Paulo.

Os resultados obtidos neste presente estudo corroboram com os estudos anteriores, que destacam esta baixa ou ausente taxa de carrapatos naturalmente infectados (LEMOS et al., 1997a; BURGDORFER, 1988; PINTER; LABRUNA, 2006).

A associação da baixa frequência de infecção de *A. cajennense*, por RGFM na natureza pode estar relacionada à possível competição entre diferentes espécies de *Rickettsias* sp. no organismo do artrópode, inibindo assim, a taxa de transmissão transestadial e transovariana (CARMICHAEL; FUERST, 2006). Contudo, este fato não o exime de ser um dos principais vetores da doença (LABRUNA, 2009). Com baixa frequência de positividade, a detecção de *Rickettsia* sp., principalmente de RGFM, em carrapatos do gênero *Amblyomma*, vem sendo reportada em diversos estudos, principalmente em regiões endêmicas para febre maculosa, no Brasil (DIAS; MARTINS, 1939; LEMOS et al., 1996, LEMOS et al., 1997a; HORTA, 2002; LABRUNA et al., 2004a; GUEDES et al., 2005). As infestações por estes grupos de carrapatos destacam-se como um dos principais fatores associados à ocorrência da doença (LEMOS et al., 1994).

Em estudos realizados em áreas endêmicas, observou-se uma forte associação entre a ocorrência de casos da doença e a presença de carrapatos do gênero *Amblyomma* (LEMOS et al., 1997a; HORTA et al., 2004; SANGIONI et al., 2005). Apesar de *A. cajennense* ser incriminado como principal vetor da FMB, a espécie *A. aureolatum* também tem sido associada à transmissão para humanos (DIAS; MARTINS, 1939). Vale destacar também, que outras espécies deste gênero de carrapato também foram relacionadas à presença de agentes rickettsias do GFM, com destaque para *A. ovale*, *A. aureolatum*, *A. dubitatum*, e *A. coelebs* (LABRUNA et al., 2004b).

Embora este gênero de carrapato tenha seu papel epidemiológico diretamente associado com a ocorrência de febre maculosa no país, outros gêneros e espécies de carrapatos também já foram descritas com a presença destes agentes, dentre elas: *Dermacentor (Anocentor) nitens*, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Haemaphysalis juxtakochi* e *Ixodes loricatus* (LEMOS et al., 1997b; ROZENTAL et al., 2002, 2009; OLIVEIRA et al., 2008; MORAES-FILHO et al., 2009, CUNHA et al., 2009). Contudo, o papel destas espécies de carrapato na epidemiologia da doença não é totalmente conhecido.

Da mesma forma que as amostras de carrapato, todas as amostras de DNA, provenientes do sangue total dos equinos não apresentaram amplificação dos fragmentos dos genes *gltA* e *ompA*, através da PCR convencional. Este resultado ratifica o conceito de que caracteristicamente durante a infecção, a rickettsemia é efêmera, insustentada e com baixa

concentração, por serem as rickettsias proteobactérias intracelulares obrigatórias, com tropismo para as células endoteliais. Este achado corrobora os resultados obtidos por Horta et al. (2007) e Bayliss et al. (2009), através da utilização da PCR, os quais também não encontraram a presença de DNA de *Rickettsia* sp. em amostras de sangue de animais. Entretanto, Inokuma et al. (2008), utilizando a *Nested* PCR, uma técnica molecular mais sensível que a PCR convencional, observaram positividade para *R. helvetica* (7,8%) em amostras de sangue de cervídeos, no Japão. A utilização da PCR no diagnóstico de RGFM possui limitações devido à baixa sensibilidade de detecção destes agentes em amostras de sangue (THORNER et al., 1998). A baixa detecção de *Rickettsia* sp em amostras de sangue, em diferentes estudos, pode estar relacionada à característica da própria infecção nos hospedeiros vertebrados, cuja rickettsemia apresenta uma duração de poucos dias ou semanas (BURGDORFER et al., 1988), geralmente estão em baixas concentrações, já que infectam células endoteliais do hospedeiro vertebrado (LA SCOLA; RAOULT, 1997). Além disso, é importante considerar também que a baixa positividade em amostra de sangue pode estar relacionada à presença de substâncias inibidoras para a PCR, que muitas vezes, estão presentes nestes tipos de amostras, assim como também em outros tipos de amostras de DNA (FENOLLAR; RAOULT, 2004).

Embora não tenha sido observada positividade dos carrapatos analisados, a frequência de equinos soropositivos para RGFM, presente em ambas as microrregiões reforça a importância deste tipo de pesquisa, principalmente devido ao histórico de casos de febre maculosa nestas regiões. Cardoso et al. (2006) avaliaram um foco silencioso da febre maculosa no município de Caratinga do estado de Minas Gerais, e observaram a presença de *A. cajennense*, positivos para *Rickettsia* sp., em equinos locais. Estes autores destacam que, mesmo após 12 anos dos últimos casos em humanos nesta região, a presença destes carrapatos positivos associada à soropositividade dos equinos para RGFM reforça a necessidade da vigilância epidemiológica no local.

No presente estudo, embora não tenham sido observados carrapatos positivos para RGFM nos municípios estudados, este resultado não diminui o cuidado necessário com a ocorrência de infestações por carrapatos em humanos e a necessidade de estudos periódicos nestas áreas, devido seu histórico progresso de casos de FMB, conforme foi observado em um surto ocorrido em Petrópolis em 2005 (MOLITERNO, 2009). Vale destacar ainda que, baixas prevalências ou mesmo nenhuma positividade para RGFM são resultados observados em espécimes de *A. cajennense* em áreas endêmicas da doença (LABRUNA et al., 2006; VIANNA et al., 2008; SANGIANI et al. 2005). Logo, a baixa/ausência frequência de *Rickettsia* sp em *A. cajennense*, não exclui da possibilidade de ocorrer novos casos da doença na região, sendo importante a vigilância epidemiológica da doença nos municípios estudados.

Na microrregião de Itaguaí, em particular, apresenta condições climáticas que favorece o desenvolvimento desta espécie de carrapato. A referida região apresenta temperatura média anual de 27°C, além de apresentar um grande número de pequenos e médios criadores de equinos, o que amplia o número de hospedeiros para esta espécie de carrapato. Desta forma, a vigilância acarológica da população de carrapatos, e particularmente, da espécie *A. cajennense* frente à positividade para RGFM pode auxiliar a vigilância epidemiológica da doença na região.

## 6 CONCLUSÃO

A partir da metodologia realizada no presente estudo:

1) A detecção de anticorpos da classe IgG anti-*R. rickettsii* nas amostras de soro dos equinos demonstra de forma indireta a circulação de RGFM tanto na microrregião Serrana, quanto na microrregião de Itaguaí.

2) Dentre os fatores epidemiológicos analisados frente a soropositividade dos equinos, a infestação por carrapatos apresentou maior associação com a detecção de anticorpos da classe IgG anti-*R. rickettsii* nos equinos do estudo.

3) Em relação à infestação dos animais, a presença de *A. cajennense* foi a espécie mais associada à detecção de anticorpos da classe IgG anti-*R. rickettsii* nos equinos do estudo.

4) Propriedades analisadas no estudo com manejo zootécnico e sanitário insatisfatório e com presença de bovinos na criação juntamente com equinos foram fatores associados a presença de pelo menos um equino soropositivo para RGFM presente na propriedade.

5) Não foi identificada nenhuma amplificação de fragmentos dos genes *gltA* e *ompA*, presente em RGFM, nas amostras de sangue dos equinos e carrapatos da espécie *A. cajennense* analisados através da PCR convencional.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A.P.; CUNHA, L.M.; BELLO, A.C.P.P.; CUNHA, A.P.; DOMINGUES, L.N.; LEITE, R, C.; LABRUNA, M. B. A novel Rickettsia infecting *Amblyomma dubitatum* ticks in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.2, n.4, p.209-212, 2011.

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

BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G.H. **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical**: Um guia ilustrado para identificação de espécies. 1<sup>th</sup> ed. São Paulo: VOX/ICTTD-3/BUTANTAN, 2006. 223p.

BATISTA, F. G.; SILVA, D. M.; GREEN, K. T.; TEZZA, L. B. L.; VASCONCELOS, S.P.; CARVALHO, S. G. S.; SILVEIRA, I.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M. B.; FORTES, F. S.; MOLENTO, M. B. Serological survey of *Rickettsia* sp. in horses and dogs in a non-endemic area in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.19, n.4, p.205-209, 2010.

BAYLISS, D.B.; MORRIS, A.K; HORTA, M.C. LABRUNA, M.B. RADECKI, S.V. ; HAWLEY, J. R; BREWER, M.M; LAPPIN, M. R. Prevalence of *Rickettsia* species antibodies and Rickettsia species DNA in the blood of cats with and without fever. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.11, n.4, p.266-270, 2009.

BELLO, A. C. P. P.; CUNHA, A. P.; LEITE, R. C.; OLIVEIRA, P. R.; RIBEIRO, A. C. C. L.; DOMINGUES, L.N.; FREITAS, C. M. V.; BASTIANETTO, E.; ROSA, R. C. D. Controle de *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae) em equinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, Supl.1, p.59-63, 2008.

BREITSCHWERDT, E. B.; DAVIDSON, M. G.; AUCOIN, D. P.; LEVY, M.G.; SZABADOS, N. S.; HEGARTY, B. C.; KUEHNE, A. L.; JAMES, R. L. Efficacy of Chloramphenicol, Enrofloxacin, and Tetracycline for Treatment of Experimental Rocky Mountain Spotted Fever in Dogs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.35, n.11, p.2375-2381, 1991.

BREITSCHWERDT, E. B.; WALKER, D. H.; LEVY, M. G.; BURGDORFER, W.; CORBETT, W. T.; HURLBERT, S. A.; STEBBINS, M. E.; CURTIS, B. C.; ALIEN, D.A. Clinical, hematologic, and humoral immune response in female dogs inoculated with *Rickettsia rickettsia* and *Rickettsia montana*. **American Journal of Veterinary Research**. v.49, n.1, p.70-76, 1988.

BURGDORFER, W. **Ecological and epidemiological considerations of Rocky Mountain spotted fever and scrub typhus**. In: WALKER, D.H. (ed.) *Biology of Rickettsial Diseases*. CRC Inc. Boca Raton, FL. p. 33-50, 1988 apud GUEDES, E.; LEITE, R.C.; PRATA, M.C.A.; PACHECO, R.C.; WALKER, D.H.; LABRUNA M.B. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the

tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, n.8, 841-845, 2005.

BURGDORFER, W.; CORBETT, W. T.; HURLBERT, S. A.; STEBBINS, M. E.; CURTIS, B. C.; ALLEN, D. A. Clinical, hematologic, and humoral immune response in female dogs inoculated with *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia montana*. **American Journal of Veterinary Research**, v.49, n.1, p.70-76, 1988.

BURGDORFER, W.; HAYES, S.F.; MAVROS, J. **Nonpathogenic rickettsiae in *Dermacentor andersoni*: a limiting factor for the distribution of *Rickettsia rickettsii***. In: BURGDORFER, W.; ANACKER, R.L. (ed.), *Rickettsiae and rickettsial diseases*. Academic Press, Inc., New York, N.Y. p. 585-594, 1981.

CARDOSO, L. D.; FREITAS, R. N.; MAFRA, C. L.; BOAS NEVES, C. V.; FIGUEIRA, F. C. B.; LABRUNA, M. B.; GENNARI, S. M.; WALKER, D. H.; GALVÃO, M. A. M. Caracterização de *Rickettsia* spp. circulante em foco silencioso de febre maculosa brasileira no Município de Caratinga, Minas Gerais, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v.22, n.3, p.495-501, 2006.

CARMICHAEL, J. R.; FUERST, P. A. A Rickettsial Mixed Infection in a *Dermacentor Variabilis* Tick from Ohio. **Annals of the New York Academy of Sciences** Volume, v.1078, n.1, p.334-337, 2006.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/rmsf/index.htm>>. Acesso em 08.02.2011.

CHAMPMAN, A. S.; BAKKEN, J. S.; FOLK, S. M. Diagnosis and management of tickborne rickettsial diseases: Rocky Mountain spotted fever, ehrlichiosis, and anaplasmosis – United States: a practical guide for physicians and other health-care and public health professionals. **MMWR Recomm REP**, v. 55, n.4, p. 1-27, 2006.

CHILDS, J. E.; PADDOCK, C. D. Passive surveillance as an instrument to identify risk factors for fatal Rocky Mountain spotted fever: is there more to learn? **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.66, n.5, p.450-457, 2002.

CUNHA, A. P.; BELLO, A. C. P. P.; LEITE, R. C.; RIBEIRO, A. C. C. L.; FREITAS, C. M. V.; BASTIANETTO, E.; OLIVEIRA, P. R. Controle estratégico de *Amblyomma cajennense* (fabricius, 1787) (acari: ixodidae) em equinos, Minas Gerais, Brasil - Parte I. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.16, n.4, p.221-228, 2007.

CUNHA, A. P.; BELLO, A. C. P. P.; LEITE, R. C.; RIBEIRO, A. C. C. L.; FREITAS, C. M. V.; BASTIANETTO, E.; OLIVEIRA, P. R. Efeito do controle estratégico de *Amblyomma cajennense* (fabricius, 1787) (acari: ixodidae) sobre a população de *Anocentor nitens* (neumann, 1897) (acari: ixodidae) em equinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.16, n.4, 215-219, 2007.

CUNHA, N.C. **Estudo epidemiológico de rickettsias do grupo da febre maculosa em caninos, equinos e seus carrapatos no Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, Brasil**. 2009. 100 p. Tese (Doutorado em Parasitologia Animal). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2009.

CUNHA, N.C.; FONSECA, A.H.; REZENDE, J.; ROZENTAL, T.; FAVACHO, A.R.M.; BARREIRA, J. D.; MASSARD, C.L.; LEMOS, ERS. First identification of natural infection of *Rickettsia rickettsii* in the *Rhipicephalus sanguineus* tick, in the State of Rio de Janeiro **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.2, p.105-108, 2009.

DANTAS-TORRES, F. Rocky Mountain spotted fever. **Lancet Infectious Diseases**, v.7, n.11, p.724–732, 2007.

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

DUMLER, J. S.; WALKER, D. H. Rocky Mountain spotted fever – changing ecology and persisting virulence. **New England Journal Medicine**, v.353, n.6, p.551-553, 2005.

EREMEEVA, M. E.; DASCH, G. A.; SILVERMAN, D. J. Evaluation of a PCR assay for quantitation of *Rickettsia rickettsii* and closely related spotted fever group Rickettsiae. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n.12, p.5466 – 5472, 2003.

EREMEEVA, M., YU, X.; RAOULT, D. Differentiation among Spotted Fever Group Rickettsiae Species by Analysis of Restriction Fragment Length Polymorphism of PCR-Amplified DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.3, p.803-810, 1994.

FENOLLAR, F.; RAOULT, D. Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms. **APMIS**, v.112, n.11-12, p.785-807, 2004.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª Edição. EMBRAPA-CENARGEN, 1998.103p.

FREITAS, M. C. D. O.; GRYCAJUK, M.; MOLENTO, M. B.; BONACIN, J.; LABRUNA, M. B.; PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; DECONTO, I.; BIONDO, A.W. Brazilian spotted fever in cart horses in a non-endemic area in Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n.2, p.130-131, 2010.

FRIEDHOFF, K. T. Interaction between parasite and tick vector. **International Journal of Parasitology**, v.20, n.4, p.525-535, 1990.

GAZETA, G. S.; SOUZA, E. R.; ABBOUD-DUTRA, A. E.; AMORIM, M.; BARBOSA, P. R.; ALMEIDA, A. B.; GOMES, V.; GEHRKE, F. S.; MARRELLI, M. T.; SCHUMAKER, T. T. S. Potential vectors and hosts of *Rickettsia* spp.: epidemiological studies in the Vale do Paraíba, state of Rio de Janeiro, Brazil. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.15 (Suppl. 2), p.269–270, 2009.

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

GUEDES, E.; LEITE, R.C.; PACHECO, R.C.; SILVEIRA, I.; LABRUNA M. B. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma* ticks from an area endemic for Brazilian spotted fever in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.20, n.4, p.308-311, 2011.

GUEDES, E.; LEITE, R.C.; PRATA, M.C.A.; PACHECO, R.C.; WALKER, D.H.; LABRUNA M.B. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a

new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, n.8, 841-845, 2005.

HOOGSTRAAL, H. Ticks in relation to human diseases caused by *Rickettsia* species. **Annual Reviews Entomology**, v.12, p.377-420, 1967.

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

HORTA, M.C. **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**. 2002. 73p. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental aplicada a zoonose). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2002.

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

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

HORTA, M.C.; PINTER, A.; SCHUMAKER, T.T.; LABRUNA, M.B. Natural infection, transovarial transmission, and transtadial survival of *Rickettsia bellii* in the tick *Ixodes loricatus* (Acari: Ixodidae) from Brazil. **Annals of the New York Academy Science**, v.1078, p.285-290, 2006.

INOKUMA, H.; SEINO, N.; SUZUKI, M.; KAJI, K.; TAKAHASHI, H.; IGOTA, H.; INOUE, S. Detection of *Rickettsia helvetica* DNA from Peripheral Blood of Sika Deer (*Cervus nippon yezoensis*) in Japan. **Journal of Wildlife Diseases**, v.44, n.1, p.164-167, 2008.

KIDD, L.; MAGGI, R., DINIZ, P.P.V.P.; HEGARTY, B.; TUCKER, M.; BREITSCHWERDT, E. Evaluation of conventional and real-time PCR assays for detection and differentiation of Spotted Fever Group Rickettsia in dog blood. **Veterinary Microbiology**, v.129, n.3-4, p.294–303, 2008.

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

LABRUNA, M. B. Ecology of Rickettsia in South America. **Annals of New York Academic Science**, v.1166, 156–166, 2009.

LABRUNA, M. B., PACHECO, R. C., ATALIBA, A. C., SZABÓ, M. J. P. Human parasitism by the capibara tick *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodida). **Entomology News**, v.118, n.1, p.77-80, 2007.

LABRUNA, M. B.; MORAES-FILHO, O. K. J.; HORTA, M. C.; PACHECO, R. C. Rocky Mountain Spotted Fever in dogs, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.15, n.3, p.459-460, 2009.

LABRUNA, M.B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M.C.; BOUYER, D.H.; MCBRIDE, J.W.; PINTER, A.; POPOV, V.; GENNARI, S.M.; WALKER, D.H. *Rickettsia* Species Infecting *Amblyomma cooperi* Ticks from an Area in the State of Sao Paulo, Brazil, Where Brazilian Spotted Fever Is Endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.1, p.90–98, 2004a.

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

LAMAS, C.; FAVACHO, A.; ROZENTAL, T.; BÓIA, M. N.; KIRSTEN, A. H.; GUTERRES, A.; BARREIRA, J.; LEMOS, E. R. S. Characterization of *Rickettsia rickettsii* in a Case of Fatal Brazilian Spotted Fever in the City of Rio de Janeiro, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.12, n.2, p.149-151, 2008.

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

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

LEMOS, E. R. S.; ROZENTAL, T.; VILLELA, C. L. Brazilian spotted fever: description of a fatal clinical case in the State of Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, n.5, p.523-525, 2002.

LEMOS, E.R.S.; MACHADO, R.D.; COURA, J.R. Rocky Mountain Spotted Fever in an endemic area in Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.89, n.4, p.497-501, 1994.

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

McDADE, J. E; NEWHOUSE, V. F. Nature history of *Rickettsia rickettsii*. **Annuals Reviews Microbiology**, v.40, p.287-309, 1986.

MELLES, B.H.H.; COLOMBO, S.; LEMOS, E.R.S. Isolamento de *Rickettsia* em cultura de células. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.32, n.5, p.469-473, 1999.

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

MELO, A.L.T.; MARTINS, T. F.; HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; PACHECO, R.C.; LABRUNA, M.B.; AGUIAR, D. M. Seroprevalence and risk factors to Ehrlichia spp. and *Rickettsia* spp. in dogs from the Pantanal Region of Mato Grosso State, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 2, n.4, p.213– 218, 2011.

MIKSZEWSKI, J. S; VITE, C. H. Central nervous system dysfunction associated with Rocky Mountain spotted fever infection in five dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**. v.41, n.4, p.259-66, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em:<portal.saude.gov.br\_portal\_arquivos\_pdf\_febre\_maculosa\_de\_a\_z\_16\_03\_11>. Acesso em 29 de janeiro de 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Nota Técnica - Investigação de óbito por doença febril hemorrágica em paciente procedente da África do Sul**. 2008, 3p. Disponível em:<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/suspeita%20arenavirus\_RJ\_07\_12 .pdf>. Acessado em 12/04/09.

MOLITERNO, F. N. **Febre maculosa brasileira: aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais dos casos ocorridos no estado do Rio de Janeiro no período de janeiro de 2004 a dezembro de 2008**. 110p. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical). Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 2009.

MORAES, S. **Dois cientistas brasileiros (Rocha Lima e Gaspar Viana)**. Rio de Janeiro, Edições Tempo Brasileiro Ltda, Secretaria de Educação e Cultura, 1968, 126p.

MORAES-FILHO, J.; PINTER, A.; PACHECO, R. C.; GUTMANN, T. B.; BARBOSA, S. O.; GONZÁLES, M. A. R. M.; MURARO, M. A.; CECÍLIO, S. R. M.; LABRUNA, M. B. New epidemiological data on Brazilian Spotted Fever in an endemic area of the state of São Paulo, Brazil. **Vector-borne and zoonotic diseases**, v. 9, n.1, p.73-78, 2009.

NASCIMENTO, E. M.; SCHUMAKER, T.T.S. Isolamento e identificação de riquetsias no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, (supl.1), p.193-196, 2004.

NEWHOUSE, V. F.; SHEPARD, C. C.; REDUS, M. D.; TZIANABOS, T.; McDADE, J. E. A Comparison of the complement fixation, Indirect Fluorescent Antibody and Microagglutination tests for the serological diagnosis of rickettsial diseases. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.28, n.2, p.387- 395, 1979.

NIEBYLSKI, M. L.; PEACOCK, M. G.; SCHWAN, T. G. Lethal effect of *Rickettsia rickettsii* on its tick vector (*Dermacentor andersoni*). **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.2, p.773-778, 1999.

OLIVEIRA K. A.; OLIVEIRA, L. S.; DIAS, C. C. A.; SILVA Jr., A.; ALMEIDA, M. R.; ALMADA, G.; BOUYER, D. H.; GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C. L. Molecular identification of *Rickettsia felis* in ticks and fleas from an endemic area for Brazilian Spotted Fever. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 2, p. 191-194, 2008.

- PACHECO, R. C.; ARZUA, M.; NIERI-BASTOS, F. A.; MORAES-FILHO, J.; MARCILI, A.; RICHTZENHAIN, L. J.; BARROS-BATESTI, D. M.; LABRUNA, M. B. Rickettsial Infection in Ticks (Acari: Ixodidae) Collected on Birds in Southern Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v.49, n.3, p.710-716, 2012.
- PACHECO, R. C.; HORTA, M. C.; PINTER, A.; MORAES-FILHO, J.; MARTINS, T. F.; NARDI, M. S.; SOUZA, S. S.; SOUZA, C. E.; SZABÓ, M. P.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. Pesquisa de *Rickettsia* spp. em carrapatos *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* no Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.3, p.351-353, 2009.
- PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; MARCILI, A., RICHTZENHAIN, L. J.; SZABÓ, M. P. J.; CATROXO, M. H. B.; BOUYER, D. H.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia monteiroi* sp. nov. infecting the tick *Amblyomma incisum* in Brazil. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 77, n.15, p.5207–5211, 2011.
- PADDOCK, C. D.; FERNANDEZ, S.; ECHENIQUE, G. A.; SUMNER, J. W.; REEVES, W. K.; ZAKI, S. R.; REMONDEGUI, C. E. Rocky Mountain spotted fever in Argentina. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.78, n.4, p.687–692, 2008.
- PAROLA, P.; DAVOUST, B.; RAOULT, D. Tick and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. **Veterinary Research**, v.36, n.3, p.469-492, 2005.
- PEREIRA, A. B. Mata Atlântica: Uma Abordagem Geográfica. **Nucleus**, v.6, n.1, p.27-53, 2009.
- PHILIP, R. N.; CASPER, E. A.; BURGEDORFER, W.; GERLOFF, R. K.; HUGHES, L. E.; BELL, E. J. Serologic typing of rickettsiae of the spotted fever group by microimmunofluorescence. **Journal of Immunology**, v. 121, n.5, p.1961-1968, 1978.
- PIEEL, M. C.; FINLAYSON, B. L.; MCMAHON, T. A. "Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification". **Hydrology and Earth System Sciences**, v.11, n.5, p.1633–1644, 2007.
- PINTER, A. **Aspectos epidemiológicos da febre maculosa em áreas endêmicas do município de Mogi das Cruzes (SP) e estudo de laboratório do ciclo de vida do vetor *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae)**. 2003. 100p. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada a Zoonoses), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2003.
- PINTER, A.; HORTA, M.C.; PACHECO, R.C.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M.B. Serosurvey of *Rickettsia* spp. in dogs and humans from an endemic area for Brazilian spotted fever in the State of São Paulo, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v.24, n.2, p.247-252, 2008.
- PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Annals of New York Academy of Sciences**, v.1078, n.1, p.523-529, 2006.
- PIRANDA, E. M. **Estudos biológicos de *Rhipicephalus sanguineus* e interação *Rickettsia rickettsii* *R. sanguineus* e cães em condições laboratoriais**. 2008. 74p. Tese (Doutorado em Parasitologia Animal). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2008.

PIRANDA, E. M.; FACCINI, J. L. H.; PINTER, A.; SAITO, T. B.; PACHECO, R. C.; HAGIWARA, M. K.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical and laboratory findings. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, n.7, p.696-701, 2008.

PIZA, J. T. Considerações epidemiológicas e clínicas sobre o Tifo Exantemático de São Paulo. In: PIZA JT, MEYER JR, SALLES GL (ed.) **Tifo Exantemático de São Paulo**. Sociedade Imprensa Paulista, São Paulo, p.11-119, 1932 apud 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**. 2002. 73p. Dissertação (mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 2002.

RAMOS, M. **Rocha Lima, o pai das rickettsias**. 2005. Disponível em: <<http://www.invivo.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=752&sid=7>>. Acessado em: 09 out 2012.

RAOULT, D.; LA SCOLA, B.; ENEA, M.; FOURNIER, P. E.; ROUX, V.; FENOLLAR, F.; GALVAO, M. A. M.; LAMBALLERIE, X. A Flea-Associated Rickettsia. pathogenic for humans. **Emerging Infectious Diseases**, v.7, n.1, p.73-81, 2001.

RAOULT, D.; PAROLA, P.; PADDOCK, C.D. Tick-Bourne Rickettsioses around the World: Emerging Diseases challenging Old Concepts. **American Society for Microbiology**, v.18, n.4, p. 719-756, 2005.

RAOULT, D.; ROUX, V. Rickettsioses as Paradigms of New or Emerging Infectious Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v.10, n.4, p. 694–719, 1997.

REBOUÇAS, M. M.; BASSO, L. S. ANÁLISE - A SAGA DE HENRIQUE DA ROCHA LIMA. *Rickettsia prowazeki* Rocha Lima 1916, 20 anos de percalços. **Páginas do Instituto Biológico**, v.3, n.2, 2007. Disponível em <: [http://www.biologico.sp.gov.br/docs/pag/v3\\_2/reboucas.htm](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/pag/v3_2/reboucas.htm)>. Acesso em 20/11/2012.

REGNERY, R. L.; SPRUILL, C. L.; PLIKAYTIS, B. D. Genotypic identification of Rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two Rickettsial genes. **Journal of Bacteriology**, v.173, n.5, p.1576-1589, 1991.

RICKETTS, H.T. Some aspects of Rocky Mountain spotted fever as shown by recent investigations. **Medical Record**, v.76, p.843–855, 1909 apud DANTAS-TORRES, F. Rocky Mountain spotted fever. **Lancet Infectious Diseases**, v.7, n.11, p.724–732, 2007.

RODRIGUES, D. S.; CARVALHO, H. A.; FERNANDES, A. A.; FREITAS, C. M. V.; LEITE, R. C.; OLIVEIRA, P. R. Biology of *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1972) (Acari: Ixodidae) on Some Laboratory Hosts in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.97, n.6, p.853-856, 2002.

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

ROZENTAL, T.; EREMEEVA, M.E.; PADDOCK, C.D.; ZAKI, S.R.; DASCH, G.A.; LEMOS, E.R.S. Fatal Case of Brazilian Spotted Fever Confirmed by Immunohistochemical

Staining and Sequencing Methods on Fixed Tissues. **Annals of the New York Academy of Sciences** Volume, v.1078, n.1, p. 257–259, 2006.

ROZENTAL, T.; FAVACHO, A.R.; BARREIRA, J.D.; OLIVEIRA, R.C.; GOMES, R.; ALMEIDA, D.N.; LEMOS, E.R. *Rickettsia* spp. infection in *Rhipicephalus sanguineus* ticks in a Brazilian spotted fever endemic rural area in Rio de Janeiro state, Brazil. **Clinical Microbiology & Infection**, v.15, n.2, p.245-246, 2009.

SABATINI, G. S.; PINTER, A.; NIERI-BASTOS, F. A.; MARCILI, A.; LABRUNA, M. B. Survey of ticks (Acari: Ixodidae) and their *Rickettsia* in an Atlantic Rain Forest in the State of São Paulo, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v.47, n.5, p.913-916, 2010.

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

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2<sup>Th</sup> ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2002. 265p.

SANGIONI, L. A.; HORTA, M. C.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. M.; GALVÃO, M. A. M.; SCHUMAKER, T. T. S.; FERREIRA, F.; VIDOTTO, O.; LABRUNA, M. B. Rickettsial Infection in Animals and Brazilian Spotted Fever. **Endemicity Emerging Infectious Diseases**, v.11, n.2, p. 265-269, 2005.

SERRA-FREIRE, N.M.; CUNHA, D.W. *Amblyomma cajennense*: comportamento de ninfas e adultos como parasitos de bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.9, n.5, p.100-103, 1987.

SILVA, N.; EREMEEVA, M. E.; ROZENTAL, T.; RIBEIRO, G. S.; PADDOCK, C. D.; RAMOS, E. A.; FAVACHO, A. R.; REIS, M. G.; DASCH, G. A.; LEMOS, E. R.; KO, A. I. Eschar-associated spotted fever rickettsiosis, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Disease**, v.17, n.2, p.275-278, 2011.

SONENSHINE, D. E.; MATHER, T. N. **Ecological Dynamics of Tick-Borne Zoonoses**. Oxford University Press, 1994. 447p.

SOUZA, C. E.; MORAES-FILHO, J.; OGRZEWALSKA, M.; UCHOA, F. C.; HORTA, M. C.; SOUZA, S. S. L.; BORBA, R. C. M.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. **Veterinary Parasitology**, v.161, p.116–121, 2009.

SPOLIDORIO, M. G.; LABRUNA, M. B.; MANTOVANI, E.; BRANDAO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J.; YOSHINARI, N. H. Novel spotted fever group rickettsiosis, Brazil. **Emerging Infectious Disease**, v.16, n.3, p.521-523, 2010.

STENOS, J.; GRAVES, S.R.; UNSWORTH, N.B. A highly sensitive and specific real-time PCR assay for the detection of spotted fever and typhus group Rickettsiae. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v.73, n.6, p.1083-1085, 2005.

SUASSUNA, I. Brasileiros pioneiros na história da microbiologia médica. 1. Rocha Lima (1879 – 1956). **Revista Paraense de Medicina**, v.20, n.1, p.61-63, 2006.

THORNER, A. R.; WALKER, D. H.; PETRI, W. A. J. R. Rocky Mountain spotted fever. **Clinical Infectious Disease**, v.27, n.6, p.1353-1359, 1998.

TOLEDO, R. S.; TAMEKUNI, K.; SILVA FILHO, M. F.; HAYDU, V. B.; BARBIERI, A. R. M. A.; HILTEL, C.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B.; DUMLER, J. S.; VIDOTTO, O. Infection by Spotted Fever Rickettsiae in People, Dogs, Horses and Ticks in Londrina, Parana State, Brazil. **Zoonoses and Public Health**, v.58, n.6, p.416-423, 2011.

TOSTES, J.; BRETZ, G. Sobre uma Rickettiose observada em zona rural do estado do Rio de Janeiro. **Brasil Médico**, 29 de novembro de 1941 apud MOLITERNO, F.M. **Febre maculosa brasileira: aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais dos casos ocorridos no estado do Rio de Janeiro no período de janeiro de 2004 a dezembro de 2008**. 110p. Dissertação. (Mestrado em Medicina Tropical). Rio de Janeiro. Fundação Oswaldo Cruz, 2009.

TZIANABOS, T.; ANDERSON, B.E.; McDADE, J.E. Detection of *Rickettsia rickettsii* DNA in clinical specimens by using polymerase chain reaction technology. **Journal Clinical Microbiology**, v.27, n.12, p.2866–2868, 1989.

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

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

WALKER, D.H. *Rickettsia rickettsii*: as virulent as ever. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.66, n.5, p.448–449, 2002.

WEISS, E.; MOULDER, J.W. **The Rickettsias and Chlamydias**. In: KREIG, N.R.; HOLT, J.G. (eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, v.1, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, p. 687-739, 1984.

ZANETTI, A. S.; PORNWIROON, W.; KEARNEY, M. T.; MACALUSO, K. R. Characterization of Rickettsial Infection in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) by Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. **Journal of Medicine Entomological**, v.45, n.2, p.267-275, 2008.

## CAPÍTULO II

**Fatores associados à infestação por carrapatos da espécie  
*Amblyomma cajennense*, em equinos das microrregiões Serrana e  
de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro**

## RESUMO

PIRES, Marcus Sandes. **Fatores associados à infestação por carrapatos da espécie *Amblyomma cajennense* em equinos das microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro** 2013. 22p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

O objetivo deste estudo foi avaliar os fatores associados à infestação por *Amblyomma cajennense* em equinos em duas microrregiões do estado do Rio de Janeiro. Foram avaliados equinos de 62 propriedades existentes nos municípios das microrregiões de Itaguaí e Serrana. Os animais foram inspecionados quanto à presença e ao nível de infestação por essa espécie de carrapato. As condições de criação e o manejo foram avaliados em cada propriedade, através de um questionário epidemiológico. Dos 635 equinos avaliados, 41,6% apresentavam-se infestados por *A. cajennense*. Observou-se que as criações dos animais em regiões de baixas altitudes (OR=3,69, IC=2,3-5,8), em propriedades com manejo zootécnico e sanitário insatisfatório (OR=5,92, IC=3,8-9,2) e em sistema de criação extensivo (OR=4,25, IC=2,1-8,5) foram fatores associados ( $p<0,05$ ), sendo também relacionados à intensidade da infestação nos equinos. O uso de carrapaticida nos equinos também apresentou associação ( $p<0,05$ ) à infestação, sendo descritas pelos proprietários, diferentes condutas terapêuticas, em intervalos alternados de tratamento. De acordo com o presente estudo, baixas altitudes, condição de manejo sanitário e zootécnico insatisfatório, criação extensiva e o uso inadequado dos produtos carrapaticidas são fatores associados à ocorrência de *A. cajennense* em diferentes níveis de infestação nos equinos dos municípios estudados.

**Palavras-chave:** Carrapatos, fatores associados, equinos.

## ABSTRACT

PIRES, Marcus Sandes. **Factors associated to infestation by ticks *Amblyomma cajennense* in equines of Serrana and Itaguaí microregions, Rio de Janeiro State.** 2013. 22p. Tesis (Doctor Science in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

The objective of this study was to evaluate factors associated to infestation by *Amblyomma cajennense* on equines in two microregions of Rio de Janeiro State. Horses from 62 properties existing in the municipalities of the microregions Itaguaí and Serrana were evaluated. The animals were examined to determine the presence and the infestation level of this ticks specie. The conditions of the ownership and the animals' management were assessed for each property using an epidemiological questionnaire. Among 635 horses evaluated, 41.6% were infested by *A. cajennense*. It was observed that farms from low altitude regions (OR=3.69, CI=2.3-5.8), with unsatisfactory zootechnical and sanitary management (OR=5.92, CI=3.8-9.2) in additions to an extensive breeding system (OR=4.25, CI=2.1-8.5) were factors associated ( $p<0.05$ ), which was also related to cases of highly infestation on horses. The use of chemical acaricides in horses was also associated ( $p<0.05$ ) to infestation, being described by the owners different therapeutic approaches with distinct intervals of treatment. According to the present research, low altitudes, unsatisfactory zootechnical and sanitary management, extensive breeding system and an inappropriate use of acaricide products were factors associated to *A. cajennense* occurrence with different infestation levels in horses from studied municipalities.

**Keywords:** Ticks, factors associated, equines.

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Amblyomma* tem, aproximadamente, 130 espécies descritas, sendo 29 destas estabelecidas no Brasil (DANTAS-TORRES et al., 2009). Dentre estas, a de maior destaque é *A. cajennense*, uma espécie registrada em quase todos os estados da federação. Além disso, possui elevada importância devido à sua capacidade de transmissão do agente etiológico da febre maculosa brasileira (FMB), *Rickettsia rickettsii*, agente de elevada patogenicidade para o homem (DIAS; MARTINS, 1939; LEMOS et al., 1997; GUEDES et al., 2005; LABRUNA, 2009). Estudos realizados em áreas de FMB têm identificado a presença destes carrapatos, com positividade para agentes rickettsias (LEMOS et al., 1997; GUEDES et al., 2005).

Com a intensificação do turismo rural e do ecoturismo tem sido observada uma maior aproximação do homem urbano com o meio ambiente rural, expondo-o a locais como trilhas, parques e pastagens, além de um contato direto com outras espécies de animais domésticos, como os equinos, favorecendo assim, a ocorrência de infestações acidentais por carrapatos em humanos (NASCIMENTO et al., 2004).

Embora os equinos sejam os hospedeiros preferenciais destes carrapatos, devido à sua baixa especificidade parasitária, *A. cajennense* pode infestar outros hospedeiros vertebrados, e de forma acidental o próprio homem (ARAGÃO; FONSECA, 1961; PAROLA; RAOULT, 2001). No Brasil, o parasitismo em humanos por diferentes estágios desta espécie tem sido observado em diferentes estados e regiões do país (GUGLIELMONE et al., 2006).

Em relação aos aspectos associados à infestação nos equinos, Labruna et al. (2001) observaram que a presença de pastos “sujos” nas áreas das criações favoreciam não só a ocorrência destes carrapatos nos animais, como também ampliavam as chances de altas cargas de infestação.

Sua ocorrência, em muitas criações também está associada à utilização de forma e métodos de controle ineficazes para o tratamento dos equinos acometidos (LABRUNA, 2000). E sob esta ótica, muitos estudos vêm sendo conduzidos em diferentes regiões do Brasil, no intuito de propor medidas estratégicas eficazes de combate a este artrópode (LEITE et al., 1997).

Dessa forma, o estudo direcionado ao conhecimento dos aspectos epidemiológicos que possam favorecer a presença de *A. cajennense* em equinos é ponto fundamental à necessidade do desenvolvimento de estratégias de controle regulares mais eficazes, contra este ectoparasita na região estudada, visando, conseqüentemente, a redução dos prejuízos causados por este ectoparasita à criação, com diminuição também das chances de pessoas se infestarem com este artrópode vetor.

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os fatores associados às infestações por carrapatos da espécie *A. cajennense* em equinos criados em duas microrregiões do estado do Rio de Janeiro.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Ecologia e Epidemiologia

Pertencentes à classe Arachnida, os carrapatos são classificados como ectoparasitos hematófagos que possuem ampla distribuição geográfica e acometem uma variedade de hospedeiros vertebrados, desde mamíferos até répteis e aves (VIEIRA et al., 2004).

A espécie *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787), conhecida vulgarmente como “carrapato-estrela”, está amplamente dispersa nas Américas, desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina (COOLEY; KOHLS, 1944). No Brasil, está distribuída em quase todo o território nacional, embora seja mais encontrado na região sudeste (VIEIRA et al., 2004; LABRUNA, 2009).

Este ectoparasito promove perdas econômicas consideráveis no setor pecuário devido à queda na produtividade animal (SERRA-FREIRE, 1982) e aos elevados gastos em decorrência do uso de carrapaticidas no plantel (PRATA et al., 1996). Nos animais, causam parasitismo intenso e elevada hematofagia, em altos níveis de infestação.

Além da espoliação promovida na área do parasitismo, esta espécie é relacionada à possível participação na transmissão de agentes da babesiose equina (NASCIMENTO, 2004). Embora algumas pesquisas experimentais não o incriminem como vetor biológico de *Theileria equi* (RIBEIRO et al., 2011), estudos epidemiológicos apontam sua possível participação na transmissão aos equinos, no Brasil (KERBER et al., 2009).

Por sua baixa especificidade parasitária, este artrópode infesta diversas espécies de animais silvestres, domésticos e acidentalmente o próprio homem (ARAGÃO; FONSECA, 1961; PAROLA; RAOULT, 2001). Os equídeos são os hospedeiros de eleição (LABRUNA et al., 2002; LOPES et al., 1998). E, sob condições naturais, os equinos podem albergar uma quantidade elevada de espécimes deste carrapato, sem lhe promoverem risco direto à vida (LABRUNA, 2000).

Labruna et al. (2001) ao avaliar os fatores associados à infestação por *A. cajennense* em criações de equinos, observaram que o pastejo dos animais em áreas de pastos “sujos”, com a presença de arbustos é mais favorável para a manutenção da população desse carrapato. Além disso, o fato de muitos criadores utilizarem tratamentos carrapaticidas com volumes bem inferiores ao recomendado para equinos (LABRUNA, 2000), favorece a manutenção da população deste carrapato no meio ambiente. É muito importante estabelecer concentrações e volumes adequados de produtos carrapaticidas aplicados sobre esta espécie na fase parasitária visando um controle efetivo deste ectoparasito (BITTENCOURT et al., 1989).

Sobre a distribuição sazonal, principalmente na região sudeste do país, muitos estudos demonstram que, levando em consideração a fase de vida livre e parasitária de *A. cajennense*, ocorre o desenvolvimento de apenas uma geração por ano, com predomínio dos estágios imaturos nos meses mais frios e secos, e adultos nos meses mais quentes e chuvosos (SOUZA; SERRA-FREIRE, 1994; OLIVEIRA et al., 2000; LABRUNA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2003).

### 2.2 Biologia de *Amblyomma cajennense*

Este artrópode é caracterizado como trioxeno, pois utiliza três hospedeiros para completar seu ciclo biológico (ROHR, 1909 apud CUNHA et al., 2007). O ciclo biológico consiste em ovo e três estágios evolutivos hematófagos, caracterizados como larval, ninfal e adulto (GUIMARÃES et al., 2001).

Em relação ao período de alimentação de larvas e ninfas, observa-se um período de quatro e sete dias, e as fêmeas, média de doze dias (PRATA et al., 1996). As fêmeas, após serem fecundadas e estarem completamente ingurgitadas, desprendem-se de seu hospedeiro, e no solo, realizam a postura. Estudos em laboratório demonstram que o período de pré-postura, deste carrapato é de 4 a 12 dias e o de postura, de 4 a 28 dias. Após este período, uma única fêmea é capaz de ovipor em torno de cinco mil ovos. O período de eclosão dos ovos e ecdise larval ocorre influenciado, principalmente, pelos aspectos climáticos. Sob condições laboratoriais de 27°C e 75% de umidade relativa, o período de ecdise larval ocorreu em média de 5 dias, sendo mais de 90% de ecdise larval nestas condições climáticas (DAEMON; ISHIZUKA, 1992). E também, sob condições de laboratório, observou-se que as larvas em jejum foram capazes de sobreviver por até cinco meses.

### **2.3 Importância em Saúde Pública**

Além da espoliação, a importância desta espécie de carrapato está associada basicamente à sua capacidade vetorial de transmitir para o ser humano, a bactéria *R. rickettsii*, agente etiológico da febre maculosa brasileira (FMB) (DIAS; MARTINS, 1939; LEMOS et al., 1997; GUEDES et al., 2005).

Além de *R. rickettsii*, foi observada também a presença de *R. felis* e de rickettsias geneticamente semelhantes à *R. akari* em exemplares de carrapato da espécie *A. cajennense*, em área com histórico de casos de FMB no Brasil e no sul do México, respectivamente (CARDOSO et al., 2006; ZAVALA-VELFIZQUEZ et al., 1999).

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Descrição da Área de Estudo

Durante o período de janeiro a maio de 2009, foram avaliadas 62 propriedades com a presença de equinos dos municípios de Seropédica, Itaguaí e Mangaratiba, pertencentes à microrregião de Itaguaí, e os municípios de Petrópolis e Teresópolis, da microrregião Serrana, estado do Rio de Janeiro. As características de cada microrregião se encontram descritas no item 3.1, do item "*Material e Métodos*", no capítulo I, página 10.

A partir de uma amostragem por conveniência, o cálculo da amostra foi estipulado considerando uma prevalência esperada de 50%, grau de confiança de 95% e margem de erro admitida de 6%, para a amostragem de cada microrregião a ser analisada. Desta forma, foi possível estabelecer o número mínimo de 246 equinos por cada microrregião, segundo a equação descrita por Sampaio (2002). Entretanto, foram analisados 297 equinos da Microrregião Serrana e 338 equinos da Microrregião de Itaguaí.

Os animais foram inspecionados quanto à presença de carrapatos do gênero *Amblyomma* sp. e a determinação do nível da infestação. De cada equino infestado foram coletados espécimes de carrapatos, preservados em álcool isopropílico absoluto e encaminhados ao Laboratório de Hemoparasitos e Vetores da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, para identificação taxonômica, em nível de espécie, por meio de chave dicotômica apropriada (BARROS-BATESTTI et al., 2006). O nível de infestação por *A. cajennense* foi categorizado a partir de espécimes adultos observados nos animais, segundo Teglas et al. (2005), em três níveis de frequência: (i) leve, (ii) moderada e (iii) alta.

Esse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética na Pesquisa da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sob o número de processo 23083.005971/2011-30 (protocolo N°127/2011).

### 3.2 Questionário Epidemiológico

Com o objetivo de identificar possíveis fatores associados à infestação por *A. cajennense* nos equinos um questionário semi-estruturado foi aplicado aos proprietários, no qual foram coletadas as seguintes informações: (i) as características de cada propriedade, (ii) condição de manejo, (iii) questões referentes a cada equino e (iv) o nível de infestação por *A. cajennense*.

Estas características acima discriminadas foram analisadas considerando os seguintes pontos:

(i) Microrregião:

- de Itaguaí
- Serrana

(ii) Manejo Sanitário e Zootécnico:

- Satisfatório (instalações zootécnicas apropriadas à criação na propriedade, animais recebem alimentação adequada, presença de controle sanitário e assistência veterinária constante)

- Insatisfatório (Instalações zootécnicas inadequadas à criação, os animais não recebem alimentação balanceada rotineiramente, o controle sanitário não é sistemático e a assistência veterinária, quando existe, é esporádica ou utilizada em casos de emergência).

(iii) Sistema de Criação

- Confinado/Semi-confinado (Animal sem acesso ou com acesso parcial a pastagem)
- Extensiva (acesso somente à pastagem)

- (iv) Contato ou não com bovinos
  - Contato (presença de bovinos na mesma pastagem ou próximos à equinos)
  - Sem contato com bovinos
- (v) Sexo (macho e fêmea)
- (vi) Idade (menor que 2 anos e maior ou igual a 2 anos)
- (vii) Raça (com raça definida e sem raça definida).

Adicionalmente foram avaliados também o tipo de tratamento carrapaticida, a periodicidade no tratamento e a base química utilizada em cada propriedade. De cada propriedade foi mensurada a altitude local através de receptores do Sistema de Posicionamento Global (GPS).

### 3.3 Análise estatística

Inicialmente, procedeu-se uma análise descritiva dos dados relacionados às propriedades e aos equinos localizados nos municípios fluminenses de Petrópolis, Teresópolis, Mangaratiba, Itaguaí e Seropédica.

Uma análise descritiva dos dados relacionados às propriedades e aos equinos em função das duas microrregiões analisadas foi realizada e os valores de frequência de propriedades e equinos infestados por *A. cajennense* foram analisados, em função de cada microrregião de origem, através do teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher a um nível de 5% de significância. Os valores médios de propriedades e equinos infestados foram analisados em função dos municípios através do teste Mann-Whitney, a um nível de 5% de significância.

Para a avaliação dos fatores associados à infestação por *A. cajennense* nos equinos, utilizou-se um modelo multivariado através da regressão logística múltipla, relacionando a variável dependente em nível dicotômico qualitativo (ausência de carrapato=0; presença de carrapato=1) em função das variáveis independentes já assinaladas, também em nível dicotômico para cada categoria avaliada. Primeiramente, a variável dependente foi analisada quanto à presença de associação estatística ao nível de  $p < 0,20$  (teste Qui-quadrado) em função das variáveis independentes, sendo então testadas no modelo multivariado (LABRUNA et al., 2001).

Dentre as variáveis independentes que apresentaram diferença estatística significativa ( $p < 0,20$ ) na análise bivariada, foi elaborada uma matriz de coeficiente de correção através do teste de correlação de Spearman, com o objetivo de verificar a colinearidade e eliminar as variáveis altamente correlacionadas do modelo de regressão logística. Variáveis cujo coeficiente de correlação ( $\rho$ ) está abaixo de 0,8 não estão altamente correlacionadas e, portanto, são adequadas para utilização na análise multivariada (KATZ, 1999). No teste de Spearman, somente as variáveis independentes com  $p > 0,05$ ,  $p < 0,05$  associado ao  $\rho < 0,6$  foram mantidas no modelo de regressão logística. Entre duas variáveis altamente correlacionadas ( $p < 0,05$  e  $\rho \geq 0,6$ ), a biologicamente mais importante foi mantida no modelo.

Em relação ao nível de infestação, procedeu-se à recategorização desta variável, de quatro níveis de infestação (ausente, leve, moderada e alta) em nível dicotômico quantitativo (ausente e leve=0; moderada e alta =1), selecionando aquelas com associação estatística ao nível de  $p < 0,20$  (teste Qui-quadrado) para análise multivariada dos dados, através do modelo de regressão logística múltipla.

Para avaliar a associação entre o uso de carrapaticida e a presença de equinos infestados por *A. cajennense* foi realizado o teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher a um nível de 5% de significância.

Todas as análises estatísticas foram realizadas através do programa R versão 2.11.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2010).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Aspectos Epidemiológicos de *Amblyomma cajennense* da Área de Estudo

Na Tabela 1 se encontra a análise descritiva das propriedades e equinos infestados por *A. cajennense* nos municípios de Petrópolis, Teresópolis, Mangaratiba, Itaguaí e Seropédica, estado do Rio de Janeiro, na qual é possível observar que o número médio±desvio-padrão de animais inspecionados foi de 10,2±8,1 (amplitude: 1-40), com uma média±desvio-padrão de 4,3±8,1 (amplitude: 1-37) animais infestados por propriedade.

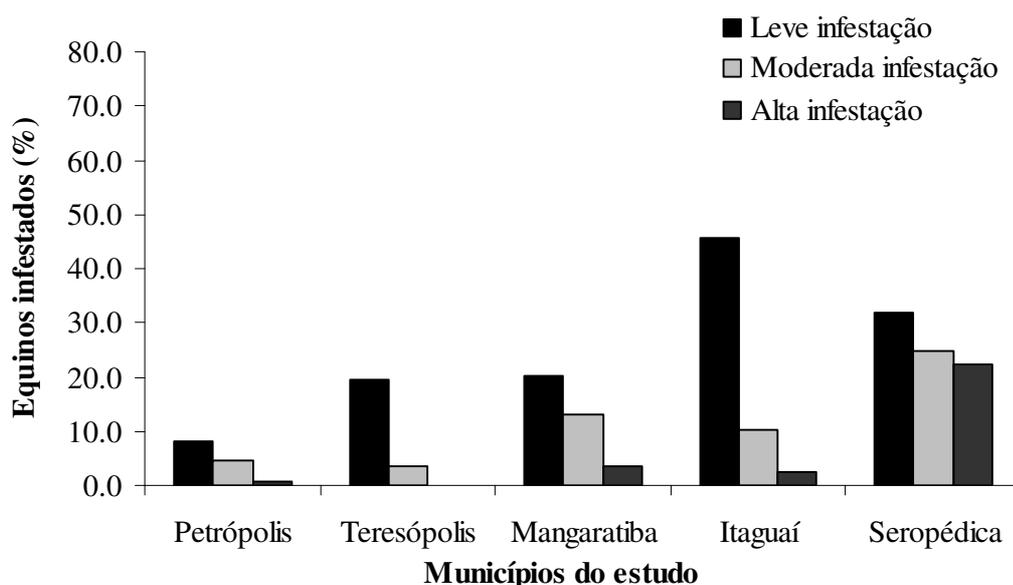
**Tabela 1.** Análise descritiva das propriedades e equinos infestados por *Amblyomma cajennense* nos municípios de Petrópolis, Teresópolis, Mangaratiba, Itaguaí e Seropédica, estado do Rio de Janeiro.

Municípios	Equinos infestados		Equinos por propriedade				Infestados por propriedade			
	N	(%)	M	DP	EP	Amplitude	M	DP	EP	Amplitude
Petrópolis	134	13,4	8,9	6,4	1,7	1 – 20	1,2	2,3	0,6	0 – 7
Teresópolis	163	20,9	9,6	6,1	1,5	1 – 22	2,0	3,4	0,8	0 – 14
Mangaratiba	84	40,5	16,8	13,6	6,1	7 – 40	6,8	5,9	2,6	0 - 14
Itaguaí	116	58,6	11,6	8,5	2,7	3 – 28	6,8	4,8	1,5	1 - 14
Seropédica	138	79,7	9,2	9,1	2,4	1 – 37	7,3	9,4	2,4	1 - 37
Total	635	41,6	10,2	8,1	1,0	1 – 40	4,3	6,0	0,8	1 – 37

N: Número total de amostras; M.: Média; DP: Desvio padrão; EP: Erro padrão.

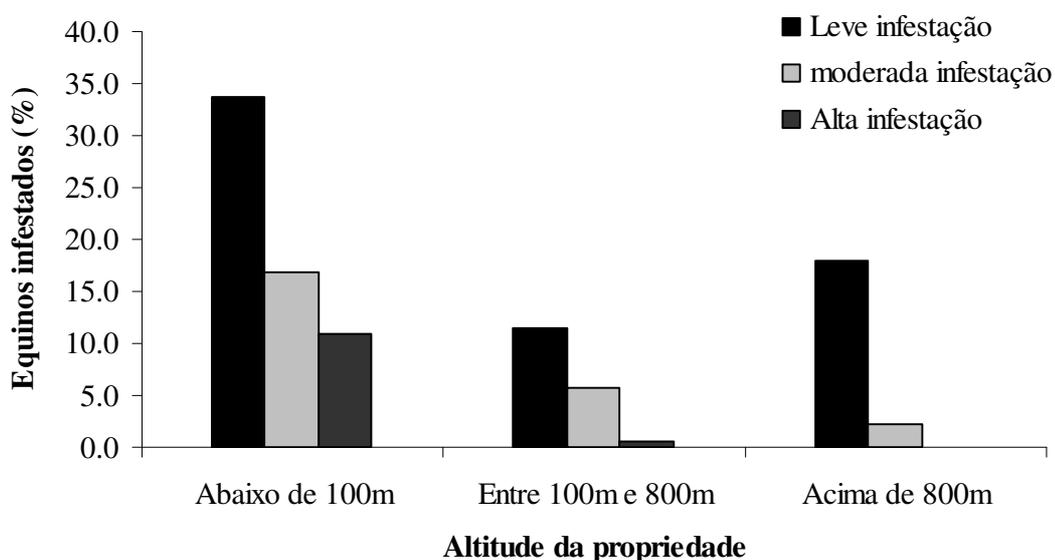
Do total de equinos examinados, 264 (41,6%, n=635) estavam infestados por *A. cajennense*, no momento da inspeção visual. A frequência mais elevada de equinos infestados foi observada no município de Seropédica (79,7%, n=138), seguidos por Itaguaí (58,6%, n=116). Ambos os municípios da região Serrana apresentaram menor frequência de infestação dos animais, sendo Petrópolis o de menor frequência observada (13,4%; n=134).

Em relação à intensidade parasitária, observou-se que todos os municípios apresentaram equinos com diferentes níveis de infestação por *A. cajennense* (Figura 1). O município de Seropédica foi o que apresentou maior percentual de equinos com alta infestação, perfazendo 22,7% (n=138) (Figura 1). O município de Itaguaí apresentou a maior frequência de equinos com nível de infestação leve. Este nível de infestação foi mais frequente (24,7%; n=635) entre a totalidade de animais analisados. O município de Petrópolis foi o que apresentou menor frequência de equinos infestados, seguidos pelos municípios de Teresópolis, Mangaratiba, Itaguaí e Seropédica.



**Figura 1.** Nível de infestação por *A. cajennense* em equinos dos municípios de Petrópolis, Teresópolis, Mangaratiba, Itaguaí e Seropédica, estado do Rio de Janeiro.

O valor médio $\pm$ desvio-padrão da altitude (m) das propriedades na Microrregião de Itaguaí e Serrana foram, respectivamente de  $22,8\pm 17,1$  (amplitude: 1-81) e  $805,2\pm 91,2$  (amplitude: 470-1004). Avaliando a altitude da propriedade em relação ao nível de infestação por carrapato nos equinos, observou-se que nenhum dos animais criados em propriedades acima de 800 metros apresentou níveis altos de infestação por *A. cajennense* (Figura 2). Da mesma forma, foram observados níveis muito baixos de infestação moderada nos animais criados nesta faixa de altitude. Pode-se observar que equinos criados em propriedades localizadas entre 100 e 800 metros de altitude, também apresentaram níveis baixos de alta infestação por este tipo de carrapato. Contudo, animais localizados em criação com altitudes menores que 100 metros apresentaram os maiores percentuais dos diferentes níveis de infestação (Figura 2).



**Figura 2.** Níveis de infestação de *A. cajennense* em equinos em função da altitude de localização da propriedade analisada, estado do Rio de Janeiro.

Em relação às microrregiões estudadas e o total de propriedades avaliadas, observou-se uma frequência de 72,6% (n=45/62) de propriedades contendo pelo menos um equino da criação infestado por *A. cajennense*. A partir da análise destas propriedades, na perspectiva de cada microrregião, foi possível observar que a frequência de equinos infestados foi maior ( $p<0,05$ ) nas propriedades da microrregião de Itaguaí, em relação aos equinos da microrregião Serrana (Tabela 2). Este resultado é reforçado ao se observar que, em média, dos 11,3 equinos analisados por propriedade na microrregião de Itaguaí, 7,2 estavam infestados por *A. cajennense*, diferindo da média de ( $p<0,05$ ) dos equinos infestados da microrregião Serrana, na qual de uma média de 9,3 equinos avaliados por propriedade, 1,6 estavam infestados por *Amblyomma cajennense*.

**Tabela 2.** Análise descritiva das propriedades e equinos infestados por *A. cajennense* nas microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.

Microrregião	Propriedades com infestação		Equinos por propriedade				Equinos infestados por propriedade			
	N	(%)	M	DP	EP	Amp.	M	DP	EP	Amp.
Serrana	32	50,0 <sup>a</sup>	9,3 <sup>a</sup>	6,1	1,1	1 – 20	1,6 <sup>a</sup>	2,9	1,1	0 – 14
Itaguaí	30	96,7 <sup>b</sup>	11,3 <sup>a</sup>	9,8	1,8	1 – 40	7,1 <sup>b</sup>	7,4	1,3	0 – 37
Total	62	72,6	10,2	8,1	1,0	1 - 40	4,3	6,1	0,8	1 – 37

N: Total de Propriedades; M.: Média; DP: Desvio-padrão; EP: Erro-padrão. Amp.: Amplitude.

Na Tabela 3, observa-se a análise bivariada e multivariada dos fatores associados à infestação por *A. cajennense*. Dentre todas as variáveis independentes, apenas a idade e a raça não apresentaram associação estatística ( $p>0,20$ ;  $\chi^2$ : 0,79 e  $p>0,20$ ;  $\chi^2$ : 0,81) a partir da análise bivariada (Tabela 3). Vale destacar que na análise bivariada, a maioria dos equinos infestados por *A. cajennense* foram machos, provenientes da região de baixada, oriundos de criações com o manejo sanitário e zootécnico insatisfatório, pertencentes a sistema de criação extensiva e com a presença de bovinos, na mesma pastagem ou nos arredores da criação ( $p<0,20$ ). Estas variáveis, quando submetidas à regressão logística, apenas a região, o manejo e o sistema de criação apresentaram associação ( $p<0,05$ ) com a ocorrência de *A. cajennense* nos equinos (Tabela 3). Dentre estes fatores associados, o manejo sanitário e zootécnico insatisfatório foi o que apresentou maior associação (OR=5,92; IC: 3,8–9,2), seguindo por equinos criados em sistema extensivo (OR= 4,25; IC: 2,1–8,5) e da região de Baixada (OR=3,69; IC: 2,3-5,8).

Observa-se na Tabela 4 a análise das variáveis independentes em função da intensa infestação dos equinos por *A. cajennense*. Ao avaliar o nível de infestação em nível dicotômico, tanto na análise bivariada, quanto na multivariada, a intensa infestação dos equinos apresentou elevada associação com condições insatisfatórias de manejo ( $p<0,05$ ; OR= 7,27; IC: 3,6-14,6), com o sistema de criação extensivo dos animais ( $p<0,05$ ; OR= 2,50; IC: 1,3 – 4,5) e a região de baixada ( $p<0,05$ ; OR= 3,62; IC: 1,8- 7,2).

**Tabela 3.** Análise bivariada e multivariada dos fatores associados à infestação por *Amblyomma cajennense* em equinos, de acordo com o gênero, idade, definição racial, e manejo dos animais nas propriedades das microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.

Características dos animais e manejo	N	(%)	Bivariada		Multivariada		
			$\chi^2$	P	P	OR	IC 95%
<b>Gênero</b>							
Fêmea	285	37.5	3.45	0.07	0.28	-	-
Macho	350	44.9				-	-
<b>Idade</b>							
< 2 anos	71	39.4	0.15	0.79	-	-	-
≥ 2 anos	564	41.8				-	-
<b>Tabela 3. Continuação</b>							
<b>Definição racial</b>							
Com raça	303	40.9	0.10	0.81	-	-	-
Sem raça definida	332	42.2				-	-
<b>Microrregião</b>							
Serrana (>400m)	297	17.5	133.04	0.00	0.00	*	-
Itaguaí (<400m)	338	62.7				3.69	(2.3 - 5.8)
<b>Manejo Zootécnico e Sanitário</b>							
Satisfatório	365	17.0	213.66	0.00	0.00	*	-
Insatisfatório	270	74.8				5.92	(3.8 - 9.2)
<b>Sistema de criação</b>							
Semi-confinado/Confinado	520	31.5	119.06	0.00	0.00	*	-
Extensivo	115	87.0				4.25	(2.1 - 8.5)
<b>Contato com bovinos</b>							
Não	494	32.4	77.28	0.00	0.32	-	-
Sim	141	73.8				-	-

N: Número de amostras de animais;  $\chi^2$ : Valor do Qui-quadrado; P: p-valor; OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de confiança. \*Categoria de referência.

**Tabela 4.** Análise bivariada e multivariada dos fatores associados à alta infestação por *Amblyomma cajennense* em equinos, de acordo com gênero, idade, definição racial e manejo dos animais nas propriedades localizadas nas microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.

Características dos animais e manejo	N	(%)	Bivariada		Multivariada		
			$\chi^2$	P	P	OR	IC 95%
<b>Gênero</b>							
Fêmea	285	16.8	0.08	0.98	-	-	-
Macho	350	16.6				-	-
<b>Idade</b>							
< 2 anos	71	18.3	0.15	0.82	-	-	-
≥ 2 anos	564	16.5				-	-
<b>Definição racial</b>							
Com raça	303	17.8	0.53	0.53	-	-	-
Sem raça definida	332	15.7				-	-
<b>Microrregião</b>							
Serrana	297	4.4	60.86	0.00	0.00	*	-

**Tabela 4. Continuação**

Itaguaí	338	27.5				3.62	(1.8 – 7.2)
<b>Manejo Zootécnico e Sanitário</b>							
Satisfatório	365	3.3	110.92	0.00	0.00	*	-
Insatisfatório	270	34.8				7.27	(3.6 – 14.6)
<b>Sistema de criação</b>							
Semi-confinado/Confinado	520	10.8	72.45	0.00	0.00	*	-
Extensivo	115	43.5				2.50	(1.3 – 4.5)
<b>Contato com bovinos</b>							
Não	494	12.6	27.45	0.00	0.26	-	-
Sim	141	31.2				-	-

N: Número de amostras de animais;  $\chi^2$ : Valor do Qui-quadrado; P: p-valor; OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de confiança. \*Categoria de referência.

Analisando o efeito isolado da altitude, na presença e na ocorrência de elevado grau de infestação por *A. cajennense*, através da análise bivariada e multivariada, foi possível observar que, dentre as faixas de altitude selecionadas, animais criados em altitude abaixo de 100 metros apresentaram 7,3 mais chances de serem infestados por esta espécie de carrapato, na região estudada (Tabela 5). Além disso, observou-se que sob estas condições, estes animais ampliam a chances em aproximadamente 17 vezes, de estarem com alta carga de carrapatos desta espécie.

**Tabela 5.** Análise bivariada e multivariada dos fatores associados à ocorrência e elevado nível de infestação por *A. cajennense* em equinos, em função da altitude da propriedade das microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.

Altitude	N	(%)	Bivariada		Multivariada		
			$\chi^2$	P	P	OR	CI 95%
<b>Presença de Infestação</b>							
Abaixo de 100m	338	62.7			0,00	7,3	(4,5 – 11,8)
Entre 100m e 800m	158	16.5	133.2	0,00	0,61	-	-
Acima de 800m	139	18.7			*	*	*
<b>Alta infestação</b>							
Abaixo de 100m	338	27.5			0,00	17,2	(5,3 – 55,3)
Entre 100m e 800m	158	6.3	61.8	0,00	0,09	-	-
Acima de 800m	139	2.2			*	*	*

N: Número de propriedades analisadas;  $\chi^2$ : Valor do teste Qui-quadrado; P: valor de “p”; OR: Odds Ratio; CI: Intervalo de Confiança.\*Categoria de referência.

Na Tabela 6 é possível observar, através da análise bivariada dos fatores associados à infestação por *A. cajennense*, em propriedades com mais de 30% dos equinos do plantel infestados, em função do local de criação e de aspectos relacionados ao manejo e criação dos animais. A partir desta análise é possível demonstrar que a microrregião de Itaguaí (RF=2,77) e a condição do manejo insatisfatório (RF=3,50) em que os animais são criados estão entre os fatores mais relacionados à infestação de aproximadamente um terço do plantel das propriedades analisadas (Tabela 6).

**Tabela 6:** Análise bivariada dos fatores associados à infestação por *A. cajennense* em propriedades com mais de 30% dos equinos infestados, em função da microrregião, do manejo utilizado, do sistema de criação e do contato com bovinos, estado do Rio de Janeiro.

Características das propriedades	N*	(% )	Bivariada		
			P**	RF	CI 95%
<b>Microrregião</b>					
Serrana	32	31,3	0,00	1	(1,6 – 4,7)
Itaguaí	30	86,7		2,77	
<b>Manejo Zootécnico e sanitário</b>					
Satisfatória	31	25,8	0,00	1	(1,9 – 6,4)
Insatisfatória	31	90,3		3,50	
<b>Sistema de Criação</b>					
Semi-confinado/Confinado	46	45,7	0,00	1	(1,4 – 2,8)
Extensivo	16	93,8		2,05	
<b>Contato com bovinos</b>					
Não	43	44,2	0,00	1	( 1,4 – 2,9)
Sim	19	89,5		2,02	

N: Número de propriedades analisadas; P: p-valor; \*\*Teste Exato de Fisher; RF: Razão de frequência; CI: Intervalo de Confiança. \*Numero de fazendas com mais de 30% dos equinos do plantel infestados por *A. cajennense*.

A frequência de propriedades e equinos infestados por *A. cajennense* em função das práticas de manejo envolvendo o uso de produtos carrapaticidas podem ser observadas na Tabela 7. O uso de carrapaticida foi estatisticamente associado à infestação dos equinos ( $p < 0,05$ ). Do total de 52 propriedades analisadas que utilizam carrapaticida, 84,6% ( $n=52$ ) apresentam pelo menos um equino infestado por *A. cajennense*. Da mesma forma, a frequência de equinos tratados com carrapaticidas, mas que estavam infestados foi de 49,0% ( $n=533$ ). Em relação ao intervalo de tratamento carrapaticida, observou-se que os animais tratados em períodos semanais ou mensais apresentaram maiores frequências de infestação, quando comparados aos equinos tratados de forma aleatória. Os organofosforados, piretróides e a associação de ambos foram às bases químicas citadas como tratamento carrapaticida em pelo menos 32 (51,6%) propriedades.

**Tabela 7.** Frequência de equinos e propriedades infestados por *Amblyomma cajennense* de acordo com o tratamento, intervalo de aplicação e base química utilizada nas microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.

Tratamento acaricida	Propriedades com equinos infestados		Equinos infestados	
	N	(%)	N	(%)
<b>Uso de acaricidas</b>				
Sim	52	84,6	533	49,0 <sup>a</sup>
Não	10	10,0	102	2,9 <sup>b</sup>

**Tabela 7.** Continuação

<b>Periodicidade do tratamento</b>				
Uma ou duas/mês	12	100,0	113	55,8
Três a quarto/mês	8	100,0	45	71,1
Duas a seis/ano	6	100,0	77	85,7
Aleatoriamente/quando a infestação é visualizada	17	64,7	233	27,0
Sem resposta*	9	77,8	65	56,9
<b>Bases químicas utilizadas</b>				
Organofosforados	5	80,0	28	21,4
Piretróides	15	80,0	134	47,0
Organofosforados / Piretróides	7	71,4	84	39,3
Organofosforados / Piretróides /outros	5	80,0	36	80,6
Outros	5	80,0	58	39,7
Sem resposta*	15	100,0	193	55,4

<sup>a</sup> Valores seguidos da mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente pelo teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher, a 5% de significância. N: Número total da amostra; \*Responsáveis que não responderam.

Outras bases químicas também foram citadas no tratamento dos animais, como Fenilpirazol, e a associação de Citronela com piretróides / organofosforados, sendo, porém, menos expressivas (n=3). Observou-se que 39,3% (n=84) dos equinos tratados com a associação de organofosforado / piretróide apresentaram-se infestados e aqueles tratados com organofosforados ou piretróides, apresentaram 21,4% (n=28) e 47,0% (n=134), respectivamente, infestados. Vale ressaltar que muitos dos proprietários não souberam responder com exatidão a periodicidade de aplicação (17%, n=52) e a base química utilizada (28,8%, n=52).

Apesar de alguns proprietários ou responsáveis não responderem qual a quantidade empregada de carrapaticida nos animais, observou-se que, pelo menos 14 das propriedades analisadas que realizavam tratamento nos animais (26,9%, n=52) utilizavam a calda carrapaticida para pulverizar os equinos em volumes abaixo do recomendado pelos fabricantes.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Aspectos Epidemiológicos de *Amblyomma cajennense* na Área de Estudo

A distribuição e a ocorrência de *A. cajennense* em equinos vêm sendo avaliada em algumas regiões do Brasil (SOUZA; SERRA-FREIRE, 1994; LEMOS et al., 1997; HEUCHERT et al., 1999; LABRUNA et al., 2001; LABRUNA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2003). No presente estudo, observou-se elevada frequência de equinos infestados, principalmente por formas adultas, variando a ocorrência e o nível de infestação entre as microrregiões avaliadas.

Como os equinos são considerados os hospedeiros primários de *A. cajennense*, não se faz necessário a presença de outros hospedeiros para o estabelecimento de sua população no ambiente (LABRUNA et al., 2001). A sazonalidade de *A. cajennense*, em estados da região sudeste, está associada a fatores de ordem climática, e sua dinâmica populacional, que varia de acordo com os estágios de desenvolvimento do carrapato, sendo as formas de larvas e ninfas predominantemente nos períodos correspondentes ao outono e inverno e as formas adultas, nos períodos de primavera e verão (SERRA-FREIRE, 1982; LABRUNA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2000).

Oliveira et al. (2003) observaram que as formas adultas de *A. cajennense* foram as mais encontradas nos equinos, nos meses de janeiro a março, em Minas Gerais. Souza e Serra-Freire (1992) observaram um intenso parasitismo por adultos de *A. cajennense* em equinos do município de Seropédica, entre os meses de Outubro a Maio.

Ao longo do estudo, observou-se que os equinos mais infestados por *A. cajennense* ocorreram em propriedades abaixo de 100 metros de altitude, ou seja, na microrregião de Itaguaí. Assim, diante dos resultados obtidos, em concordância com os dados da literatura, é possível afirmar que a infestação por esta espécie de carrapato tem estreita relação com fatores ambientais e climáticos, registrados como mais favoráveis para o desenvolvimento do artrópode, nesta região. Além destes fatores observaram-se também um elevado número de criadores que adotam manejo zootécnico e controle sanitário inadequados, fatores que certamente favorecem a comum ocorrência de *A. cajennense* entre os animais na região estudada.

Propriedades da microrregião Serrana estão localizadas em áreas de elevadas altitudes, com clima caracterizado por tropical de altitude, que consiste em verões úmidos e invernos secos, com uma temperatura média anual em torno de 19°C. Logo, a baixa frequência de equinos infestados nesta região pode estar associada aos efeitos deletérios desta condição climática na biologia deste carrapato. Este achado está de acordo com Chacón et al. (2003), quando observaram em condições de laboratório, uma taxa de eclosão larval de apenas 3,0% para posturas de *A. cajennense* e encarquilhamento de aproximadamente 77,2% dos ovos, quando mantidas em temperatura de 18°C, enquanto que a 27°C, 54,6% das larvas eclodiram. Em contrapartida, a microrregião de Itaguaí apresenta temperatura média de 27°C, possuindo desta forma, condições mais favoráveis ao desenvolvimento deste carrapato (DAEMON; ISHIZUKA, 1992).

Aspectos climáticos, fatores relacionados à criação como a qualidade das instalações, as práticas de higienização do local de permanência dos animais, assim como as condutas terapêuticas adotadas nos tratamentos carrapaticidas são parâmetros importantes para a avaliação dos possíveis fatores associados à ocorrência deste artrópode e de sua proliferação no local da criação. No presente estudo, além de aspectos ambientais, a condição de manejo também apresentou associação direta com a presença e o nível de infestação dos equinos por *A. cajennense*. Este resultado é reforçado pela presença de alguns equinos com altos níveis de

infestação criados em propriedades localizadas em condições climáticas menos favorável ao carrapato (elevada altitude e temperatura mais baixa) e por alguns equinos sem infestação criados em áreas de baixada (temperaturas mais elevadas), com melhores condições para o desenvolvimento do artrópode.

A associação do sistema de criação extensivo com a infestação dos equinos reforça a premissa de que os animais que permanecem mais tempo em contato com pastagens ampliam suas chances de se infestarem. A dinâmica sazonal de *A. cajennense* em diferentes áreas de pastagem, no Rio de Janeiro, foi bem discutida em outros estudos, destacado a presença dos diferentes estágios ao longo do ano (SERRA-FREIRA, 1982; SOUZA; SERRA-FREIRE, 1992). No presente estudo, observou-se uma maior frequência de equinos com intensa infestação por carrapatos nos animais criados em sistema extensivo, quando comparados àqueles criados em sistema intensivo ou semi-intensivo.

Labruna et al. (2001) observaram que equinos que tinham acesso a pastagens “sujas”, composta por inúmeros arbustos e ervas desenvolvendo-se junto às gramíneas, ampliaram em treze vezes as chances de se infestarem com *A. cajennense*. No presente estudo, as características das pastagens não foram abordadas, contudo, pôde-se observar de forma subjetiva que, animais criados somente a pasto eram oriundos também de propriedades com baixa tecnificação, e que muitas vezes não realizavam a limpeza periódica das pastagens, o que pode ter favorecido o estabelecimento da população de carrapatos nestas áreas.

Quando infestados, os equinos acabam participando diretamente da dispersão de *A. cajennense* ao longo de toda a área de pastejo, dispersando a população deste carrapato no ambiente e favorecendo a infestação de outros animais. No presente estudo, observou-se que os equinos criados em pastagens próximas a bovinos ou simultaneamente, apresentaram maior frequência de animais infestados por *A. cajennense*.

Apesar de alguns estudos salientarem que a presença de equinos pastando simultaneamente com bovinos favoreça a infestação daqueles por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (HEUCHERT et al., 1999; LABRUNA et al., 2001), *A. cajennense* também pode se desenvolver sobre os bovinos (SERRA-FREIRE; CUNHA, 1987) e assim ampliar a infestação das áreas de pastagens.

Em relação aos tratamentos carrapaticidas utilizados pelos proprietários foram citadas diferentes condutas terapêuticas nas diversas propriedades. Contudo, é importante destacar que, devido a questões de eficiência e segurança, tanto para os equinos, quanto para os proprietários, o grupo dos piretróides são os únicos indicados para banhos em equinos e que estão disponíveis no mercado brasileiro para o controle de *A. cajennense* (PINHEIRO, 1987; BITTENCOURT et al., 1989).

De acordo com estes autores, esta espécie de carrapato necessita de concentrações mais elevadas de formulações carrapaticidas do que aquelas utilizadas para o controle de *R. (B). microplus*. Alguns proprietários citaram a utilização de produtos a base de organofosforados. No Brasil, o controle de *A. cajennense* tem sido feito empiricamente, com o uso de produtos carrapaticidas a base de organofosforados, carbamatos, amidinas e piretróides sintéticos, em concentrações recomendadas para o controle do carrapato dos bovinos, *R. (B). microplus* (PINHEIRO, 1987).

A utilização de tratamentos a base de organofosforados pelos proprietários, produto este não recomendado para o controle de *A. cajennense*, pode estar associado à presença de infestações simultâneas com outras espécies de carrapatos, como *Dermacentor (Anocentor) nitens* (Neumann, 1897), observado com frequência durante este estudo. Neste cenário, animais que apresentam infestação mista e alta carga de carrapatos, provavelmente recebem maior atenção dos proprietários, pois o nível elevado de infestação permite uma melhor visualização destes parasitas, favorecendo o tratamento. Contudo, vale destacar que alguns

dos equinos que só recebiam tratamento a base de piretróides também se apresentavam infestados por *A. cajennense*, em diferentes níveis de intensidade.

A infestação dos equinos, no presente estudo, mesmo com a utilização de produtos carrapaticidas, pode estar relacionada à ausência de um programa de controle estratégico de *A. cajennense*, conforme preconizado por Labruna et al. (2004) e Cunha et al. (2007). Além disso, outros fatores podem interferir na eficácia do controle desse carrapato, como a concentração dos produtos e a forma de aplicação.

Segundo Labruna (2000), o banho carrapaticida efetivo deve ser realizado, no mínimo, com o volume de quatro a cinco litros de calda carrapaticida por equino adulto, seguindo-se as recomendações dos fabricantes. Entretanto, avaliações a campo têm demonstrado que muitos criadores banham os equinos com volumes carrapaticidas bem inferiores aos recomendados.

Considerando que *A. cajennense* está incriminado como um dos principais vetores de *R. rickettsii*, agente etiológico da FMB, em diferentes regiões do país, o estudo dos fatores associados à sua ocorrência e distribuição, em criações de equinos na região estudada, possibilita ampliar o nosso conhecimento sobre os aspectos epidemiológicos relacionados à infestação destes animais, e auxiliar na instituição de programas de controle estratégico desta ectoparasitose na região (DIAS; MARTINS, 1939; LEMOS et al., 1997; GUEDES et al., 2005). Neste contexto, o controle eficiente deste ectoparasita passa a ser fundamental para a prevenção da transmissão de patógenos importantes para saúde pública.

## 6 CONCLUSÃO

A partir da metodologia realizada no presente estudo:

- 1) A frequência de equinos infestados por *A. cajennense* na microrregião de Itaguaí foi maior do que a frequência de equinos infestados da microrregião Serrana.
- 2) As condições de manejo sanitário e zootécnico inadequado nas criações foi um fator associado à maior frequência e intensidade do parasitismo por esta espécie de carrapato nos equinos.
- 3) As propriedades estudadas localizadas em áreas de baixada apresentam condições mais favoráveis às infestações dos equinos por *A. cajennense*, principalmente quando os equinos são criados de forma extensiva.
- 4) Os municípios de Seropédica e Itaguaí apresentam condições adequadas ao parasitismo por *A. cajennense*, tornando-se de elevado risco de ocorrer infestações entre os animais e o homem.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAGÃO, H.; FONSECA, F. Notas de Ixodologia. VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.59, n.2, p.115-129, 1961.
- BARROS-BATTESTI, D.M.; ARZUA, M.; BECHARA, G.H. **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies**. 1ª ed. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan; 2006. 223p.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; GRISI, L. Atividade *in vitro* de alguns piretróides sintéticos no carrapato *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.24, n.10, p.1193-1199, 1989.
- CARDOSO, L.D.; FREITAS, R.N.; MAFRA, C.L.; BOAS NEVES, C.V.; FIGUEIRA, F.C.B.; LABRUNA, M.B.; GENNARI, S.M.; WALKER, D.H.; GALVÃO, M.A.M. Caracterização de *Rickettsia* spp. circulante em foco silencioso de febre maculosa brasileira no Município de Caratinga, Minas Gerais, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v.22, n.3, p.495-501, 2006.
- CHACÓN, S.C.; CORREIA, P.G.; BARBIERI, F.S.; DAEMON, E; FACCINI, J.L.H. Efeito de três temperaturas constantes sobre a fase não parasitária de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.12, n.1, p.13-20, 2003.
- COOLEY, R.A.; KOHLS, GM. The genus *Amblyomma* (Ixodidae) in the United States. **Journal of Parasitology**, v.30, n.2, p.77-111, 1944.
- CUNHA, A.P.; DA BELLO, A.C.P.P.; LEITE, R.C.; BASTIANETTO, E.; RIBEIRO, A.C.C.L.; FREITAS, C.M.V. Controle estratégico de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) em eqüinos, Minas Gerais, Brasil – parte I. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.16, n.4, p.221-228, 2007.
- DAEMON, E.; ISHIZUKA, A.C. Efeito de diferentes temperaturas sobre a ecdise larval de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.1, n.2, p.105-107, 1992.
- DANTAS-TORRES, F.; ONOFRIO, V.C.; BARROS-BATTESTI, D.M.. The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil. **Systematic and Applied Acarology**, v.14, p. 30-46, 2009.
- DIAS, E.; MARTINS, A.V. Spotted fever in Brazil: a summary. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v.19, p.103-108, 1939.
- GUEDES, E.; LEITE, R.C; PRATA, M.C.A; PACHECO, R.C; WALKER, D.H; LABRUNA, M.B. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, n.8, p.841-845, 2005.
- GUIMARÃES, J.H.; TUCCI, E.C.; BARROS-BATESTI, D.M. **Ectoparasitos de importância veterinária**. Editora Plêiade, São Paulo, 2001. 218p.

GUGLIELMONE, A.A; BEATI, L.D; BARROS-BATTESTI, M.; LABRUNA, M.B.; NAVA, S., VENZAL, J.M. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Experimental Applied Acarology**, v.40, n.2, p.83–100, 2006.

HEUCHERT, C.M.S.; GIULLI, J.R.V.; ATHAIDE, D.F.; BÖSE, R.; FRIEDHOFF, K.T. Seroepidemiologic studies on *Babesia equi* and *Babesia caballi* infections in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.85, n.1, p.1-11, 1999.

KATZ, M.H. **Multivariate Analysis: A practical Guide for Clinicians**. 1<sup>a</sup> ed. Cambridge, Cambridge University, 1999. 192p.

KERBER, C.E.; LABRUNA, M.B.; FERREIRA, F.; DE WAAL, D.T.; KNOWLES, D.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of equine Piroplasmosis and its association with tick infestation in the State of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, n.4, p.1-8, 2009.

LABRUNA, M.B. **Aspectos da biologia e epidemiologia dos carrapatos de eqüinos no Estado de São Paulo – Brasil** 76p. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada a Zoonoses). São Paulo: Universidade de São Paulo, 2000.

LABRUNA, M.B. Ecology of *Rickettsia* in South America. **Annals New York Academic Science**, v.1166, p.156–166, 2009.

LABRUNA, M.B.; KASAI, N.; FERREIRA, F.; FACCINI, J.L.H; GENNARI, S.M. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, p.105, n.1, 65-77, 2002.

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

LABRUNA, M.B.; LEITE, R.C.; GOBESSO, A.A.O.; GENNARI, S.M.; KASAI, N. Controle estratégico do carrapato *Amblyomma cajennense* em eqüinos. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p.195-200, 2004.

LEITE, R.C.; OLIVEIRA, P.R.; LOPES, C.M.L.; FREITAS, C.M.V. Alguns aspectos epidemiológicos das infestações por *Amblyomma cajennense*: uma proposta de controle estratégico. In: SIMPÓSIO SOBRE CONTROLE DE PARASITOS, 2., 1997, Colina. **Anais...** Campinas: CGE, 1997. p.9-14.

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

LOPES, C.M.L.; LEITE, R.C.; LABRUNA, M.B.; OLIVEIRA, P.R.; BORGES, L.M.F.; RODRIGUES, Z.B. Host specificity of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) with comments on the drop-off rhythm. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, n.3, p.347-351, 1998.

NASCIMENTO, E.M.; SCHUMAKER, T.T.S. Isolamento e identificação de riquetsias no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13 (Supl.), p.193-196, 2004.

OLIVEIRA, P.R. Biologia e controle de *Amblyomma cajennense*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, s.1, p.118-122, 2004.

OLIVEIRA, P.R.; BORGES, L.M.F.; LOPES, C.M.L.; LEITE, R.C. Population dynamics of the free-living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) on pastures of Pedro Leopoldo, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.92, n.4, p.295–301, 2000.

OLIVEIRA, P.R.; BORGES, L.M.F.; LEITE, R.C.; FREITAS, C.M.V. Seasonal dynamics of the Cayenne tick, *Amblyomma cajennense* on horses in Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v.17, p.412–416, 2003.

PAROLA, P.; RAOULT, D. Ticks and Tickborne Bacterial Diseases in Humans: An Emerging Infectious Threat. **Ticks and Tick-borne Disease**, v.32, n.6, p.897-928, 2001.

PEREZ, C.A.; ALMEIDA, A.F.; ALMEIDA, A.; CARVALHO, V.H.B.; BALESTRIN, D.C.; GUIMARÃES, M.S. Carrapatos do gênero *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) e suas relações com os hospedeiros em área endêmica para febre maculosa no estado de São Paulo. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v.17, n.4, p.210–217, 2008.

PINHEIRO, V.R.E. **Avaliação do efeito carrapaticida de alguns piretróides sintéticos sobre o carrapato *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acarina: Ixodidae)**. 148p. Dissertação (Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias). Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 1987.

PRATA, M.C.A; ALONSO, L.S; SANAVRIA, A. Parâmetros biológicos do estágio ninfal de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) em coelhos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.3, n.2, p.55-57, 1996.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2009. ISBN 3-900051-07-0, Disponível em: <http://www.R-project.org>. Acesso em 31 de janeiro de 2010.

RIBEIRO M.F.B.; SILVEIRA, J.A.G.; BASTOS, C.V. Failure of the *Amblyomma cajennense* nymph to become infected by *Theileria equi* after feeding on acute or chronically infected horses. **Experimental Parasitology**, v.128, n.4, p.324-327, 2011.

ROHR, C. J. *Estudos sobre Ixodidas do Brasil*. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 1909. 200p. apud CUNHA, A.P.; DA BELLO, A.C.P.P.; LEITE, R.C.; BASTIANETTO, E.; RIBEIRO, A.C.C.L.; FREITAS, C.M.V. Controle estratégico de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) em equinos, Minas Gerais, Brasil – parte I. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.16, n.4, p.221-228, 2007.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2<sup>a</sup> ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2002. 265p.

SERRA-FREIRE, N.M. Epidemiologia de *Amblyomma cajennense*: Ocorrência estacional e comportamento dos estágios não parasitários em pastagens do Estado do Rio de Janeiro. **Arquivo da Universidade Federal Rural Rio de Janeiro**, v.5, n.2, p.187-193, 1982.

SERRA-FREIRE, N.M.; CUNHA, D.W. *Amblyomma cajennense*: comportamento de ninfas e adultos como parasitos de bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.9, n.5, p.100-103, 1987.

SOUZA, A.P.; SERRA-FREIRE, N.M. Variação sazonal da fase não parasitária de *Amblyomma cajennense* e *Anocentor nitens* no município de Itaguaí, RJ: Avaliação epidemiológica e metodológica. **Revista Universidade Rural: Série Ciência vida**, v.16, n.1-2, p.67-74, 1994.

SOUZA, A.P; SERRA-FREIRE, N.M. Variação sazonal dos estádios adultos de *Amblyomma cajennense* e *Anocentor nitens*, como parasitas de cavalos, no município de Itaguaí, RJ, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.1, n.1, p.31-34, 1992.

TEGLAS, M.; MATERN, E.; LEIN, S.; FOLEY, P.; MAHAN, S.M.; FOLEY, J. Ticks an tick-borne disease in Guatemalan cattle and horses. **Veterinary Parasitology**, v.131, n.1-2, p.119-127, 2005.

UILEMBERG, G.; BARRE, N.; CAMUS, E.; BURRIDGE, M.J.; GARRIS, G.I. Heartwater in the Caribbean. **Preventive Veterinary Medicine**, v.2, n.1-4, p.255-267, 1984.

VIEIRA, A.M.L; SOUZA, C.E; LABRUNA, M.B; MAYO, R.C; SOUZA, S.S.L; CAMARGO-NEVES, V.L.F. **Manual de Vigilância Acarológica, Estado de São Paulo**, Secretaria de Estado da Saúde, São Paulo, Brasil, 2004.62 p.

ZAVALA-VELFIZQUEZ, J. E.; YU, X.J.; WALKER, D.H. Unrecognized spotted fever group rickettsiosis masquerading as dengue fever in Mexico. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.55, n.2, p.157-159, 1996.

## **CAPÍTULO III**

**Aspectos epidemiológicos de *Babesia caballi* (Nuttall; Strickland, 1912) em equinos criados nas microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro**

## RESUMO

PIRES, Marcus Sandes. **Aspectos epidemiológicos de *Babesia caballi* (Nuttall; Strickland, 1912) em equinos criados nas microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro** 2013. 38p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

O objetivo deste estudo foi avaliar os aspectos epidemiológicos da infecção por *Babesia caballi* em equinos em duas microrregiões do estado do Rio de Janeiro. Foram coletadas 516 amostras de sangue de equinos de municípios das microrregiões Serrana e de Itaguaí, entre janeiro e maio de 2009. Os animais foram inspecionados quanto à presença e ao nível de infestação por carrapatos. As condições de criação e o manejo foram avaliados em cada propriedade, através de um questionário epidemiológico. Os carrapatos coletados foram identificados conforme chave taxonômica apropriada. Foi realizada a extração do DNA das amostras de sangue dos equinos, para posterior análise através da reação da cadeia da polimerase (PCR). Do total de equinos avaliados, 17,2% (n=89/516) apresentaram DNA de *B. caballi* nas amostras de sangue. Dentre as microrregiões analisadas, observou-se que a maior frequência de positividade ocorreu nos equinos da microrregião de Itaguaí, com 28,9% (n=70/242). Dentre os aspectos inerentes aos equinos, observou-se que animais com idade abaixo de dois anos foram os mais frequentemente positivos (33,3%, n=19/57, p<0,05). Embora a condição insatisfatória da propriedade (25,5%, n=61/239) e a criação dos animais conjunta com bovinos (28,8%, n=28/97) tenham apresentado associação com a positividade dos animais, após análise multivariada dos dados, observou-se que os animais com faixa etária menor que dois anos (OR=3,33; IC= 1,7-6,5), criados em regiões de baixas altitudes (OR=3,52; IC=1,7- 7,3) e infestados por carrapatos da espécie *Dermacentor nitens* (OR=1,91; IC=1,1-3,4) foram fatores associados à positividade dos equinos por este hemoparasito nas microrregiões estudadas. O elevado grau de infestação por este carrapato também foi associado à presença de equinos positivos para *B. caballi* (OR=2,11; IC=1,25-3,54). Apesar da ocorrência de equinos infestados por *Amblyomma cajennense* apresentar associação com a positividade dos equinos, após análise multivariada dos dados, somente a presença de *D. nitens* prevaleceu associada com animais positivos (p<0,0001). Não foram evidenciadas as alterações hematológicas características da infecção por *B. caballi* nos equinos estudados. Conclui-se que equinos criados em regiões de baixa altitude, com faixa etária abaixo de dois anos, que apresentem infestações, em diferentes níveis, por carrapatos da espécie *D. nitens* são fatores que favorecem a positividade por *B. caballi* nas microrregiões estudadas.

**Palavras-chave:** Carrapatos, *Babesia caballi*, Equinos.

## ABSTRACT

PIRES, Marcus Sandes. **Epidemiological aspects of *Babesia caballi* (Nuttall; Strickland, 1912) in horses created in the Serrana and Itaguaí microregions, State of Rio de Janeiro.** 2013. 38p. Tesis (Doctor Science in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

The aim of this study was to evaluate the epidemiological aspects of infection by *Babesia caballi* in horses in two microregions of Rio de Janeiro State. 516 blood samples were collected from horses of municipalities of the microregions of Itaguaí and Serrana, between January and May 2009. The animals were inspected for the presence and level of infestation by ticks. The conditions for the creation and management were assessed on each property using an epidemiological questionnaire. Ticks collected were identified as appropriate taxonomic key. The DNA extraction was performed from blood samples of horses for further analysis by polymerase chain reaction (PCR). Of all horses evaluated, 17.2% (n=89/516) had DNA from *B. caballi* in blood samples. Among the micro-regions analyzed, it was observed that the highest frequency of positivity occurred of horses in the microregion of Itaguaí (28.9%, n=70/242). Among the aspects inherent to horses, animals aged below two years were the most affected (33.3%, n=19/57, p<0.05). Although the unsatisfactory condition of the property (25.5%, n=61/239) and the joint creation with cattle (28.8%, n=28/97) have shown a positive association with animals, after multivariate analysis of data, it was observed that the animals aged less than two years (OR=3.33, CI=1.7-6.5), in regions of low altitudes (OR=3.52, CI=1.7-7.3) and infested by ticks of the species *Dermacentor nitens* (OR=1.91, CI=1.1-3.4) were factors associated with infection of horses by this hemoparasite in the microregions studied. The high degree of infestation by this tick has also been associated with the presence of horses positive for *B. caballi* (OR=2.11, CI=1.25-3.54). Despite the occurrence of equine infested by *Amblyomma cajennense* present association with the positivity of the horses, after multivariate data analysis, only the presence of *D. nitens* associated with prevalent positive animals (P <0.0001). There were no hematological changes characteristic of infection by *B. caballi* in horses studied. It can be concluded that horses bred in low altitudes regions, aged below two years, who have infestations at different levels, by ticks of the species *D. nitens* are factors that favor the positivity for *B. caballi* at the studied microregions.

**Keywords:** Ticks, *Babesia caballi*, horses.

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Babesia* sp. caracteriza-se como um grupo de protozoários, que promovem intensa anemia, febre, icterícia e fraqueza em hospedeiros vertebrados que são acometidos. Dentre os agentes etiológicos da babesiose equina, encontra-se a espécie *Babesia caballi* (Nuttall; Strickland, 1912). Os equinos infectados, além de apresentarem os sintomas já mencionados, podem, em casos agudos da doença, evoluir para o óbito (DE WAAL, 1990; 1992). Contudo, em muitos casos, o principal agravo à saúde dos animais se caracteriza pela queda do desempenho e rendimento do equino, o que na indústria equestre, é de extrema importância.

Neste contexto a babesiose merece elevada atenção por parte das autoridades, considerando que, diante do deslocamento de animais de áreas endêmicas para áreas livres da doença, possa ocorrer transmissão destes hemoparasitos pelo parasitismo por carrapatos, fato este que caracteriza esta doença como um dos principais entraves para a circulação internacional de cavalos (KNOWLES, 1996).

No Brasil, Costa e Mello (1963) foram os primeiros autores a relatar sua ocorrência no território nacional. A transmissão deste agente no país, esta associada a carrapatos da espécie *Dermacentor nitens* (PFEIFER-BARBOSA et al., 1992; PFEIFER-BARBOSA, 1993; LINHARES, 1994; MUJICA, 2002). Pfeifer-Barbosa et al. (1992) observaram soroprevalência de 62,5% dos equinos analisados no estado do Rio de Janeiro, através do teste sorológico Westen-blot. Em estudo similar, Bittencourt et al. (1997) observaram 93,6% de soroprevalência para *B. caballi* a partir da reação de fixação de complemento (RFC) nos animais testados.

Sobre os aspectos relacionados à soropositividade, Kerber et al. (2009) observaram associação com alto nível de infestação dos equinos por carrapatos da espécie *Dermacentor nitens*. E em estudo realizado por Garcia-Bocanegra et al. (2013) observaram que a soropositividade foi associada também à infestação por carrapatos e ausência de abrigo na criação em equídeos na Espanha.

Diante do exposto e com o objetivo principal de avaliar os aspectos epidemiológicos relacionados à detecção de *B. caballi* em equinos, nas microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro o presente estudo foi desenvolvido visando ampliar o conhecimento deste importante hemoparasita, os fatores relacionados à sua casuística e contribuir para o desenvolvimento de medidas de prevenção e controle mais eficientes desta hemoparasitose na região.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Breve Histórico e Etiologia

O gênero *Babesia* Starcovici, 1893, foi intitulado desta forma, como homenagem a Victor Babés, pesquisador que descreveu o primeiro gênero deste parasita, em bovinos. Possuem formas piriforme, oval e amebóide, e têm como principal característica, o desenvolvimento no interior de eritrócitos de mamíferos (RIEK, 1966).

Em 1910, Nuttall e Strickland, a partir do desenvolvimento de um estudo sobre a febre biliar dos equinos, observaram estruturas similares ao já descrito *Piroplasma equi*, agente causal da piroplasmose equina. No entanto, considerando que estes parasitas, embora localizados no interior de eritrócitos dos equinos, fossem maiores e distintos de *P. equi*, os autores denominaram a nova espécie como *Piroplasma caballii* (Nuttall; Strickland, 1912).

O termo “piroplasma” provém da característica dos parasitos que, após se multiplicarem, apresentam uma morfologia semelhante a uma pêra. Atualmente, o gênero *Piroplasma* permanece como sinonímia para o gênero *Babesia* (UILENBERG, 2006).

### 2.2 Epidemiologia

Na Europa, a infecção por *B. caballii* já foi descrita na França, Espanha, Portugal, Bélgica e Itália, sendo considerada endêmica no sudeste Europeu, apresentando soroprevalência com elevada variação entre os países e as regiões estudadas (CORDERO del CAMPILLO et al., 1974; SCHEIN, 1988; DE WAAL, 1992).

Na África, a infecção se apresenta de elevada endemicidade com destaque da presença deste parasita em países como África do Sul, Moçambique, Angola, Namíbia, Marrocos, entre outros (NEITZ, 1956).

Da mesma forma, no continente Asiático, as infecções causadas por este hemoparasito foram reportadas na China e na Mongólia (FRIEDHOFF; SOULÉ, 1996; XU et al, 2003; BOLDBAATAR et al, 2005). Embora o Japão seja considerado livre da doença (FRIEDHOFF; SOULÉ, 1996), recentes estudos indicam a possibilidade da circulação de *B. caballii* no plantel do país (IKADAI et al, 2002).

Em relação ao continente americano, especificamente nos países da América Latina, exceto as regiões Sul do Chile e Argentina, a babesiose se manifesta de forma enzoótica (FRIEDHOFF et al., 1990). Os Estados Unidos e o Canadá são considerados livres de *B. caballii*, com exceção do estado da Flórida (HOLBROOK, 1969).

Em relação à presença deste agente no Brasil, o primeiro relato foi obtido a partir de dados clínicos e laboratoriais, realizado por Costa e Melo (1963) em equinos no Rio de Janeiro. Posteriormente, relatos clínicos de *B. caballii* foram realizados por Lima et al. (1976) em Minas Gerais, e Rocha et al. (1988) em Pernambuco.

Ainda no Brasil, diversos estudos foram conduzidos para avaliar a soroprevalência na região centro-oeste do país (LINHARES et al., 1997), e também em outros estados da federação, como São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Pará (KERBER et al., 1997; RIBEIRO et al., 1995; PFEIFER-BARBOSA et al., 1995; PFEIFER-BARBOSA et al., 2000).

### 2.3 Vetores

De acordo com Friedhoff et al. (1990) a transmissão e distribuição de *B. caballii* na Europa e Ásia estão relacionadas a cinco espécies do gênero *Dermacentor* (*D. marginatus*, *D. silvarum*, *D. nitens*, *D. nutalli* e *D. reticulatus*) e uma de *Hyalomma* (*H. marginatum*). Na

África, De Waal (1990) registrou a transmissão de *B. caballi* por *Rhipicephalus evertsi* e *H. truncatum*. O envolvimento de *D. nitens* na transmissão e distribuição de *B. caballi* nos países americanos foi registrado pela primeira vez a partir de estudos experimentais em equídeos no estado da Flórida, nos Estados Unidos (ROBY; ANTHONY, 1963). Em seguida, Holbrook e Frerichs (1968) observaram pela primeira vez as formas de multiplicação do protozoário em amostras de hemolinfa e tecidos de *D. nitens* e sua transmissão transovariana em carrapatos coletados de equinos mantidos em áreas de surto.

No Brasil, Pfeifer-Barbosa et al. (1992), Linhares (1994), Pfeifer-Barbosa, et al. (1995) e Mujica (2002) observaram formas em multiplicação de *B. caballi* em ovários e ovos de *D. nitens*, demonstrando a transmissão transovariana deste agente nesta espécie de carrapato (MUJICA, 2002).

Estudos mostram a distribuição deste carrapato pela região sudeste do país, demonstrando que o mesmo realiza mais de uma geração por ano (SOUZA; SERRA-FREIRE, 1992; SOUZA; SERRA-FREIRE, 1994; BORGES et al., 1999; BORGES et al., 2000; LABRUNA et al., 2002). A espécie *D. nitens* é caracterizada como um carrapato monoxeno, sendo estimado, em média, 63 dias para a realização do seu ciclo biológico, sob condições de laboratório (SANAVRIA; PRATA, 1996). Vale destacar que seu comportamento, na fase parasitária, tem predileção por infestar a face interna da orelha dos equídeos (FALCE, 1986; BORGES et al., 2000) e também o divertículo nasal (BORGES; LEITE, 1993). Este comportamento é importante sob a questão relacionada ao tratamento dos animais.

#### **2.4 Biologia de *Babesia caballi***

Este agente se caracteriza por apresentar uma forma infectante de 2,5 a 3,0µm de comprimento denominada esporozoíta e que se encontra na saliva do carrapato transmissor. Quando atingem o lúmen da circulação sanguínea, os esporozoítas penetram ativamente nos eritrócitos, e se diferenciam em formas arredondadas e ovaladas, designadas trofozoítas. Estes trofozoítas, após a divisão binária, que ocorre no interior das hemácias, dão origem a duas formas características deste gênero, em formato piriforme, os merozoítas, que promovem o rompimento da célula infectada. Após esta etapa, novas células são infectadas, repetindo o processo de multiplicação em outros eritrócitos (SIMPSON et al., 1967; HOLBROOK et al., 1968; MEHLHORN; SCHEIN, 1985; SCHEIN, 1988).

O ciclo do parasita no interior dos carrapatos ocorre subsequentemente após a ingestão dos gametócitos, quando se inicia o processo de gametogonia, que resulta na formação de gametas do parasito, no interior do artrópode vetor. Este processo culmina com a formação do oocineto, que após penetrar na parede intestinal do carrapato, se multiplica, formando os vermículos, que posteriormente atingem a hemolinfa, e em sequência, outros órgãos do carrapato, como os ovários e glândula salivar (MEHLHORN; SCHEIN, 1985).

Quando a infecção atinge a glândula salivar do carrapato, ocorre a esporogonia deste agente, que culmina na liberação das formas infectantes, a partir do quinto dia, iniciada a alimentação do vetor após a fixação do carrapato no hospedeiro (HOLBROOK et al., 1968; (MEHLHORN; SCHEIN, 1985).

#### **2.5 Métodos de Diagnóstico**

O diagnóstico da piroplasmose equina pode ser realizado através de métodos diretos e indiretos (POTGIETER et al., 1992), dentre os quais se destacam a pesquisa parasitológica direta, realizada por meio de esfregaços sanguíneos, a reação em cadeia da polimerase (PCR) (McLAUGHLIN et al., 1992), o cultivo *in vitro* do parasito e os métodos sorológicos, tais

como o ensaio imunoenzimático (ELISA), a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e a reação de fixação do complemento (RFC).

Entretanto, é digno de nota que todos esses testes apresentam vantagens e desvantagens, as quais devem ser cuidadosamente avaliadas.

As técnicas sorológicas são de larga aplicação em estudos de levantamento epidemiológico, devido à alta sensibilidade e, desta forma, detectam infecções subclínicas ou crônicas com eficácia superior àquela obtida através dos exames diretos em esfregaços sanguíneos. O primeiro teste sorológico aplicado para detecção de anticorpos anti-*Babesia* em equinos foi a RFC (HIRATO et al., 1945) que, desde 1969, foi considerado o teste oficial para o diagnóstico da babesiose equina.

Entretanto, posteriormente, a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) determinou que a RIFI ou mesmo o ELISA pudessem ser utilizados em substituição a RFC, pois este teste não detecta infecções crônicas e pode apresentar resultados falso-negativos (FRIEDHOFF; SOULÉ 1996; IKADAI et al. 2002).

De acordo com Böse et al. (1995), a PCR tem mostrado ser sensível e específica servindo como uma ferramenta bastante útil para o diagnóstico da babesiose; porém, os casos crônicos podem apresentar resultados falso-negativos devido à baixa concentração de DNA na amostra.

A sensibilidade da reação de PCR é mais elevada quando comparada a exame microscópico de esfregaços sanguíneos (RAMPERSAD et al., 2003; ALHASSAN et al., 2007).

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Descrição da Área de Estudo

O estudo foi realizado em quatro municípios, sendo dois da microrregião Serrana (Petrópolis e Teresópolis) e dois da microrregião de Itaguaí (Seropédica e Itaguaí), Estado do Rio de Janeiro, Brasil. O período de coleta foi realizado de janeiro a maio de 2009. Para o estudo, foi realizada uma amostragem por conveniência de um total de 274 equinos da microrregião Serrana e 242 da microrregião de Itaguaí, com base na fórmula descrita por Sampaio (2002), considerando a prevalência esperada de 50%, e margem de erro de 7%, resultando em amostra mínima de 196 animais por microrregião.

### 3.2 Questionário Epidemiológico

Um questionário semi-estruturado foi aplicado aos proprietários com o intuito de identificar possíveis fatores associados à positividade por *B. caballi* nos equinos (ANEXO1). Estes fatores foram analisados considerando as seguintes variáveis:

(i) Microrregião:

- Itaguaí
- Serrana

(ii) Manejo Sanitário e Zootécnico:

- Satisfatório (instalações zootécnicas apropriadas à criação na propriedade, animais recebem alimentação adequada, presença de controle sanitário e assistência veterinária constante)

- Insatisfatório (Instalações zootécnicas inadequadas à criação, os animais não recebem alimentação balanceada rotineiramente, o controle sanitário não é sistemático e a assistência veterinária, quando existe, é esporádica ou utilizada em casos de emergência).

(iii) Sistema de Criação

- Confinado/Semi-confinado (Animal sem acesso ou com acesso parcial a pastagem)
- Extensiva (acesso somente à pastagem)

(iv) Contato ou não com bovinos

- Contato (presença de bovinos na mesma pastagem ou próximos à equinos)
- Sem contato com bovinos

(v) Origem do animal

- Externo à propriedade
- Interno à propriedade (animal nasceu na propriedade)

(vi) Atividade do Animal

- Esporte/exposição
- Trabalho/passeio
- Reprodução

(vii) Sexo (macho e fêmea)

(viii) Idade (menor de 2 anos e maior ou igual a 2 anos)

(ix) Raça (com raça definida e sem raça definida)

(x) Presença de carrapatos (sim e não).

De cada propriedade foi mensurada a altitude local através de receptores do Sistema de Posicionamento Global (GPS).

Os equinos foram avaliados quanto à presença de carrapatos, e alguns exemplares foram coletados de cada animal infestado, sendo estes preservados em álcool isopropílico absoluto para posterior identificação taxonômica, por meio de chave dicotômica (BARROS-

BATESTTI et al., 2006). O nível de infestação foi categorizado a partir de espécimes adultos observados nos animais, segundo Labruna et al. (2001).

### 3.3 Coleta de Sangue

Foram coletados 5 mL de sangue em tubo com anticoagulante EDTA (ácido etileno diamino tetraacético) de 516 equinos, através de venopunção da veia jugular, sendo retiradas alíquotas destas amostras e acondicionadas em tubos de polipropileno de 1,5mL, estéreis, mantidos a temperatura de -80°C para extração de ácido desoxirribonucleico (DNA).

### 3.4 Extração de DNA das Amostras

De cada amostra de sangue foi extraído o DNA a partir de 300 µL de sangue total, através do kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega®, Madison, WI, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de DNA extraído do sangue foram quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop® ND-2000 (Nanodrop Technologies, DE, USA), padronizadas na concentração de 60 ng/µL, a partir da diluição em solução de Tris-EDTA, e armazenadas a -80°C até o momento da realização da técnica de PCR.

### 3.5 Sensibilidade Analítica da PCR para Detecção de *B. caballi*

Para avaliar a melhor concentração de *primers* utilizada na reação da PCR foram realizadas oito diluições seriadas de uma amostra de DNA positiva para *B. caballi* (10ng/µL até 10<sup>-7</sup>ng/µL), variando as concentrações dos *primers* (BC48) em 0,4µM, 0,6µM, 0,8µM no intuito de obter a otimização da concentração final utilizada na PCR.

### 3.6 Ensaios da PCR

As amostras de DNA foram submetidas ao diagnóstico molecular através da técnica de *nested* PCR, para a amplificação de dois fragmentos específicos de aproximadamente 530 pb para a primeira reação da PCR e 430pb para a segunda PCR, ambos do gene BC48, específico para *B. caballi* (BATTSETSEG et al., 2001). Para esta análise, utilizaram-se dois pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*); na primeira reação utilizou-se os *primers* BC48F1 (5'-ACGAATTCCCACAACAGCCGTGTT-3') e BC48R3 (5'-ACGAATTCGTAAAGCGTGGCCATG-3') e na segunda reação os *primers* BC48F11 (5'-GGGCGACGTGACTAAGACCTTATT-3'), BC48R31 (5'-GTTCTCAATGTCAGTAGCATCCGC-3'). Para a primeira e segunda reação de *B. caballi* foi utilizado um volume final de 25 µL, sendo 60ng/µL de DNA, 12,5µL de PCR MasterMix (Amplitaq Gold®), 0,6µM de cada *primer* (*forward* e *reverse*), e 7µL de água ultrapura. As condições de amplificação para *B. caballi* em ambas as PCR foram: 40 ciclos a 96°C por 4min, desnaturação a 94°C por 50s; anelamento dos *primers* a 56°C por 1min; amplificação a 72°C por 1min e extensão final a 72°C por 5min. O processo de amplificação foi realizado em termociclador (Mastercycler ProS, Eppendorf®) e a reação da PCR foi realizada baseada no estudo de Battsetseg et al. (2001) com algumas modificações.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão de corrida TAE (40mM Tris-acetato, 2 mM EDTA pH 8,0), durante 60 minutos, à 90V, seguido por coloração em brometo de etídio e visualização dos produtos amplificados sob luz ultravioleta, através de transiluminador (Electronic UV Transilluminator, L-PIX TOUCH).

### 3.7 Análises Hematológicas

Com o intuito de avaliar possíveis alterações dos parâmetros hematológicos dos equinos frente o resultado da PCR para *B. caballi*, após a coleta de sangue total dos animais foram realizadas análises destes parâmetros através de contador automático de células (ABC VET, Horiba ABX®). Esta análise foi realizada no Laboratório de Hemoparasitos e Vetores da Estação Experimental de Pesquisa Parasitológica W.O. NEITZ do Departamento de Parasitologia Animal – Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Foram observados os seguintes parâmetros: volume globular (VG), hematimetria (HEM), concentração de hemoglobina (HB), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), plaquetometria (PLAQ), volume plaquetário médio (VPM) e amplitude de distribuição dos eritrócitos (ADH), e leucometria global (LEU). Foram confeccionados esfregaços sanguíneos das amostras de sangue total para a contagem diferencial de células, obtendo-se o número de linfócitos (LINF), de monócitos (MON), de neutrófilos segmentados (NEU), de neutrófilos em bastão (BAST) e de eosinófilos (EOS). A concentração de proteína plasmática total (PPT) e fibrinogênio (FIB) foram determinados através de refratometria (COLES, 1986).

### 3.8 Análises Estatísticas

Foi realizada uma análise descritiva dos dados relacionados às propriedades e aos valores de frequência de positividade para *B. caballi* nos equinos das duas microrregiões, em função de cada microrregião de origem, através do teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher a um nível de 5% de significância. Os valores médios de equinos positivos e propriedades com equinos positivos ao teste da PCR foram analisados em função da microrregião de origem através do teste Mann-Whitney, a um nível de 5% de significância.

As variáveis independentes presentes no estudo epidemiológico foram analisadas em relação à positividade de *B. caballi* nas amostras de DNA extraído do sangue dos equinos e as frequências obtidas comparadas pelo teste Qui-quadrado em nível de 20%, sendo as variáveis com diferença estatística incluídas no modelo de regressão logística, em nível de 5% de significância, através do programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2010).

Dentre as variáveis independentes que apresentaram diferença estatística significativa ( $p < 0,20$ ) na análise bivariada, foi elaborada uma matriz de coeficiente de correção através do teste de correlação de Spearman, com o objetivo de verificar a colinearidade e eliminar as variáveis altamente correlacionadas do modelo de regressão logística. Variáveis cujo coeficiente de correlação ( $\rho$ ) está abaixo de 0,8 não estão altamente correlacionadas e, portanto, são adequadas para utilização na análise multivariada (KATZ, 1999). No teste de Spearman, somente as variáveis independentes com  $p > 0,05$ ,  $p < 0,05$  associado ao  $\rho < 0,6$  foram mantidas no modelo de regressão logística. Entre duas variáveis altamente correlacionadas ( $p < 0,05$  e  $\rho \geq 0,6$ ), a biologicamente mais importante foi mantida no modelo.

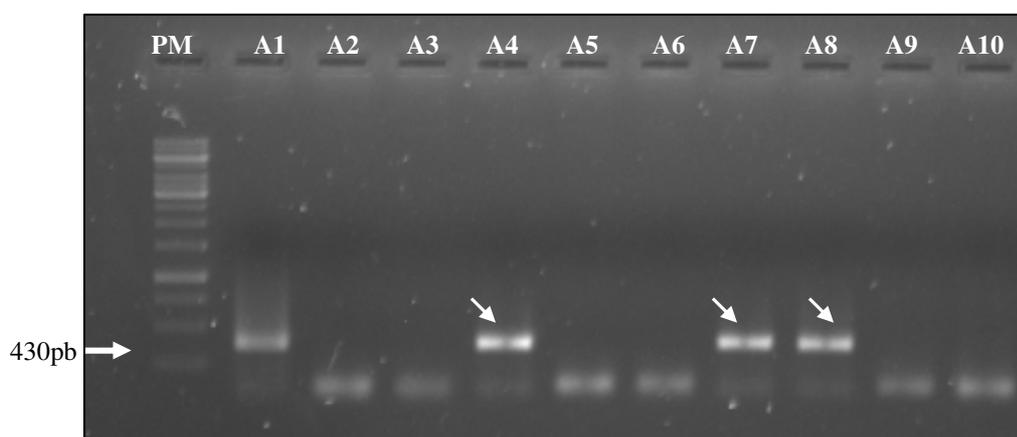
Os valores médios dos parâmetros hematológicos dos equinos positivos e negativos para *B. caballi* foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste F, em nível de 5% de significância, quando apresentaram normalidade dos dados. Quando estes dados não apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste Mann Whitney, a 5% de significância. As frequências de equinos com alterações hematológicas dentre os animais positivos e negativos para *B. caballi* foram comparadas através do teste Qui-quadrado ou pelo teste exato de Fisher em nível de 5% de significância. Para ambas as análises hematológicas foi utilizado o programa BioEstat 5.0 (AYRES et al. 2007).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Sensibilidade Analítica da Técnica de *n*PCR

Em relação à sensibilidade analítica da técnica, pôde-se observar que o limite de detecção do fragmento alvo de *B. caballi*, utilizando diluições seriadas de um DNA extraído de uma amostra sabidamente positiva (10ng/μL) para este patógeno, foi possível detectar até 10<sup>-4</sup>ng/μL de DNA alvo. Esta sensibilidade foi observada através da *n*PCR, utilizando oligonucleodídeos para amplificação de um fragmento de 430pb da segunda reação de PCR, do gene BC48, específico para *B. caballi*.

Em relação ao DNA extraído das 516 amostras de sangue de equinos testadas na *n*PCR, para o gene BC48, conforme metodologia descrita foi evidenciado a amplificação em 89 amostras (17,2%, n=516), após visualização a partir da eletroforese em gel de agarose a 1% (Figura 1).



**Figura 1:** Gel de agarose (1%) com produtos da amplificação do fragmento de 430pb do gene BC48, específico para *B. caballi*. PM: Peso molecular de 1kb; A1 (Controle Positivo); A2 (Controle negativo); A3, A5, A6, A9 e A10 (Amostras negativas); A4, A7 e A8: Amostras de DNA positiva através da PCR (seta branca).

### 4.2 Aspectos Epidemiológicos da Área de Estudo

Na Tabela 1 estão demonstrados os valores referentes à análise descritiva das propriedades, e equinos considerados positivos para *B. caballi*, nas duas microrregiões estudadas.

Em relação aos aspectos epidemiológicos relacionados à positividade dos animais, observou-se que os equinos da microrregião de Itaguaí foram os mais acometidos ( $p < 0,05$ ), apresentando uma frequência de 28,9% ( $n=70/242$ ) de positividade (Tabela 1).

O número médio  $\pm$  desvio-padrão de animais analisados por propriedade foi de  $9,2 \pm 8,1$  (amplitude: 1-36) e, destes, observou-se média  $\pm$  desvio-padrão de  $1,6 \pm 2,6$  (amplitude: 0-12) de animais positivos ao teste, por propriedade avaliada. Dentre todos os municípios estudados, Itaguaí apresentou a frequência mais elevada de equinos positivos (42,5%,  $n=106$ ). Os dois municípios da região Serrana apresentaram menor frequência de infecção dos animais, sendo Petrópolis a de menor frequência observada (3,1%;  $n=128$ ).

Em relação às propriedades presentes nas duas microrregiões estudadas, observou-se que havia pelo menos um equino na criação que estava positivo ao teste molecular para *B. caballi* em 48,2% ( $n=56$ ) das criações avaliadas. E em relação à positividade dos animais

presentes nas propriedades, foi possível observar que a frequência de equinos positivos foi maior ( $p < 0,05$ ) em propriedades da microrregião de Itaguaí, em relação às da microrregião Serrana (Tabela 1).

Este achado é reforçado ao se observar que, em média, de 9,7 equinos analisados de cada propriedade na microrregião de Itaguaí, 2,8 estavam positivos por *B. caballi*, diferindo ( $p < 0,05$ ) da microrregião Serrana, onde a média de 8,8 animais analisados por propriedade, sendo 0,6 positivos ao teste.

**Tabela 1.** Análise descritiva das propriedades e equinos positivos para *Babesia caballi*, através da *nested* PCR, nas microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.

Região	Equinos positivos		Prop. com Eq. Positivos		Equinos por propriedade				Equinos positivos por propriedade			
	N	(%)	N	(%)	M	DP	EP	Amp.	M	DP	EP	Amp.
Serrana	274	6,9 <sup>A</sup>	31	32,3 <sup>A</sup>	8,8 <sup>a</sup>	6,0	1,1	1 – 20	0,6 <sup>a</sup>	1,0	0,2	0 – 3
Itaguaí	242	28,9 <sup>B</sup>	25	68,0 <sup>B</sup>	9,7 <sup>a</sup>	8,5	1,7	1 – 36	2,8 <sup>b</sup>	3,4	0,7	0 – 12
Total	516	17,2	56	48,2	9,2	7,1	1,0	1 - 36	1,6	2,6	0,3	0 – 12

<sup>A</sup>Letras iguais entre as colunas de mesma legenda não diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de 5% de confiança. <sup>a</sup>Valores seguidos de mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente através do teste F a 5% de significância ( $p < 0,05$ ), quando normais e através do teste de Mann-Whitney a 5% de significância, quando não normais. Prop.: Propriedade; Eq.: Equinos; N: Total de Propriedades; M.: Média; DP: Desvio-padrão; EP: Erro-padrão. Amp.: Amplitude.

Em relação aos carrapatos coletados nos equinos, foram observados ocorrência de três espécies, *Amblyomma cajennense*, *Dermacentor nitens* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. No entanto, somente as duas primeiras foram incluídas e avaliadas no estudo epidemiológico. Foram observados poucos exemplares da espécie *R. microplus* sobre os equinos, sendo obtidos de apenas dois animais da região estudada. Desta forma, esta espécie de carrapato foi excluída da análise epidemiológica. As outras duas espécies foram observadas em diferentes níveis de infestação nos animais, em ambas as microrregiões.

Na Tabela 2, observa-se a análise bivariada e multivariada dos fatores associados à positividade dos equinos por *B. caballi*. Dentre todas as variáveis independentes, somente a raça e o sistema de criação não apresentaram associação estatística ( $p > 0,20$ ;  $\chi^2$ : 0,48 e  $p > 0,20$ ;  $\chi^2$ : 0,52) a partir da análise bivariada (Tabela 2). Com esta análise prévia, observou-se que a maioria dos equinos positivos para *B. caballi* foram fêmeas, com idade abaixo dos dois anos, provenientes da microrregião de Itaguaí, oriundos de criações com o manejo sanitário e zootécnico insatisfatório, criados com presença de bovinos, na mesma pastagem ou nos arredores da criação e infestados por *D. nitens* ( $p < 0,20$ ). Após análise destas variáveis associadas a partir da regressão logística, apenas a região, a idade e a infestação por *D. nitens* apresentaram associação ( $p < 0,05$ ) com a positividade para *B. caballi*, nos equinos (Tabela 2). Dentre estes fatores associados, equinos criados na microrregião de Itaguaí foi à variável que apresentou maior associação (OR=3,52; IC: 1,7–7,3), seguida por equinos com faixa etária menor que 2 anos (OR= 3,33; IC: 1,7–6,5) e a presença de *D. nitens* infestando os animais (OR=1,91; IC: 1,1-3,5).

**Tabela 2.** Análise bivariada e multivariada da frequência de *Babesia caballi* nos equinos analisados, através da *nested* PCR, em função dos fatores associados, como gênero, idade, definição racial, e manejo dos animais nas propriedades das microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.

Características dos animais e manejo	N	(%)	Bivariada		Multivariada		
			$\chi^2$	P	P	OR	IC 95%
<b>Gênero</b>							
Fêmea	245	20,0	2,47	0,15	0,06	-	-
Macho	271	14,8				-	-
<b>Idade</b>							
< 2 anos	57	33,3	11,61	0,00	0,00	3,33	(1,7 – 6,5)
≥ 2 anos	459	15,3				*	
<b>Definição racial</b>							
Com raça	255	16,1	0,48	0,56	-	-	-
Sem raça definida	261	18,4				-	-
<b>Microrregião</b>							
Serrana (>400m)	274	6,9	43,54	0,00	0,00	*	-
Itaguaí (<400m)	242	28,9				3,52	(1,7 – 7,3)
<b>Manejo Zootécnico e Sanitário</b>							
Satisfatório	277	10,1	21,35	0,00	0,92	-	-
Insatisfatório	239	25,5				-	-
<b>Origem do animal</b>							
Interno	152	19,1	0,50	0,55	-	-	-
Externo	364	16,5				-	-
<b>Atividade do animal</b>							
Esporte/exposição	285	16,1	0,81	0,66	-	-	-
Trabalho/passeio	142	17,6				-	-
Reprodução	89	20,2				-	-
<b>Sistema de criação</b>							
Semi-confinado/Confinado	427	17,8	0,52	0,56	-	-	-
Extensivo	89	14,6				-	-
<b>Contato com bovinos</b>							
Não	419	14,6	11,29	0,00	0,29	-	-
Sim	97	28,9				-	-
<b>Infestação por carrapatos (<i>Dermacentor nitens</i>)</b>							
Não	341	10,0	37,3	0,00	0,03	*	-
Sim	175	31,4				1,91	(1,1- 3,5)

N: Número de amostras de animais;  $\chi^2$ : Valor do Qui-quadrado; P: p-valor; OR: *Odds Ratio*; IC: Intervalo de confiança. \*Categoria de referência.

Embora a infestação por carrapatos tenha apresentado associação estatística com a positividade dos equinos por *B. caballi* ( $p < 0,20$ ;  $\chi^2$ : 4,55), após análise multivariada das duas espécies mais abundantes observadas nos equinos, foi possível observar que somente a espécie *D. nitens* apresentou associação com a positividade dos equinos (OR= 5,07; IC: 2,8 – 9,5) (Tabela 3). Desta forma, manteve-se no modelo final das variáveis independentes, apenas a infestação por *D. nitens* (Tabela 2).

**Tabela 3.** Análise bivariada e multivariada da frequência de *Babesia caballi* nos equinos analisados, através da *nested* PCR, em função da espécie de carrapato observada nos animais das microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.

Presença de carrapato	N	(%)	Bivariada		Multivariada		
			$\chi^2$	P	P	OR	IC 95%
<i>Amblyomma cajennense</i>							
Sim	220	21,4	4,55	0,04	0,21	-	-
Não	296	14,2					
<i>Dermacentor nitens</i>							
Sim	175	31,4	37,31	0,00	0,00	5,07	(2,8 – 9,5)
Não	341	10,0					

N: Número de amostras de animais;  $\chi^2$ : Valor do Qui-quadrado; P: p-valor; OR: *Odds Ratio*; IC: intervalo de confiança; \*: Valor de referência para análise multivariada.

A associação mais efetiva deste carrapato com a positividade dos equinos é reforçada quando se observa que, após analisar de forma isolada o grau de infestação dos animais em relação à positividade dos equinos por *B. caballi*, a associação ocorre somente quando há elevada infestação dos equinos por *D. nitens* (OR: 2,11; IC: 1,3 – 3,5) (Tabela 4).

**Tabela 4.** Análise bivariada e multivariada da frequência de *Babesia caballi* nos equinos analisados através da *nested* PCR, em função do grau de infestação da espécie de carrapato observada nos animais das microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.

Grau de infestação	N	(%)	Bivariada		Multivariada		
			$\chi^2$	P	P	OR	IC 95%
<i>Amblyomma cajennense</i>							
Moderada/alta infestação	87	20,7	0,86	0,43	-	-	-
Ausente/leve	429	16,6					
<i>Dermacentor nitens</i>							
Moderada/alta infestação	100	27,0	8,26	0,00	0,00	2,11	(1,3 – 3,5)
Ausente/leve	416	14,9					

N: Número de amostras de animais;  $\chi^2$ : Valor do Qui-quadrado; P: p-valor; OR: *Odds Ratio*; IC: intervalo de confiança; \*: Valor de referência para análise multivariada.

Na Tabela 5 estão demonstrados os valores de positividade dos equinos por *B. caballi*, em função do efeito isolado da altitude das criações, nas regiões estudadas. Através da análise bivariada e multivariada, foi possível observar que, dentre as faixas de altitude selecionadas, animais criados em altitude abaixo de 100m apresentaram 5,1 vezes mais chance de se infectarem por esta espécie de protozoário do que em regiões com altitude mais elevada (Tabela 5).

**Tabela 5.** Análise bivariada e multivariada da positividade de *Babesia caballi* nos equinos analisados através da *nested* PCR, em função da altitude da propriedade das microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.

Altitude	N	(%)*	Bivariada		Multivariada		
			$\chi^2$	P	P	OR	CI 95%
Abaixo de 100m	242	28,9	43,6	0,00	0,00	5,1	(2,4 – 10,6)
Entre 100m e 800m	152	6,6			0,79	-	-
Acima de 800m	122	7,4			*	*	*

N: Número de propriedades analisadas;  $\chi^2$ : Valor do teste Qui-quadrado; P: p-valor; OR: *Odds Ratio*; CI: Intervalo de Confiança.\*Categoria de referência.

Na Tabela 6, observa-se, a partir das análises dos fatores associados à propriedade, a relação entre a presença de pelo menos um equino positivo para *B. caballi* na propriedade, em função do local de criação, dos aspectos relacionados ao manejo e criação dos animais, e da ocorrência de equinos com elevada infestação por *D. nitens* na criação.

A partir desta análise é possível demonstrar que, embora a presença de equinos positivos na propriedade para este agente tenha relação com localização da propriedade na microrregião de Itaguaí ( $p < 0,05$ ; RF: 2,11), a presença de equinos na propriedade com elevada carga de carrapatos da espécie *D. nitens* foi 2,77 vezes maior em propriedades com equinos positivos dentro das propriedades analisadas ( $p = 0,0014$ ; IC: 1,4- 4,9) (Tabela 6).

**Tabela 6.** Análise bivariada da presença de pelo menos um equino positivo para *Babesia caballi* nas propriedades analisadas, através da *nested* PCR, em função da microrregião, do manejo utilizado, do sistema de criação, do contato com bovinos e da ocorrência de animais com elevada infestação por *Dermacentor nitens* na criação, estado do Rio de Janeiro.

Características das propriedades	N	(%)	Bivariada		
			P**	RF	CI 95%
<b>Microrregião</b>					
Serrana	31	32,3	0,01	1	(1,2 – 3,7)
Itaguaí	25	68,0		2,11	
<b>Manejo Zootécnico e sanitário</b>					
Satisfatória	27	40,7	0,20	1	(0,7 – 2,3)
Insatisfatória	29	55,2		1,35	
<b>Sistema de Criação</b>					
Semi-confinado/Confinado	42	47,6	0,43	1	(1,4 – 2,8)
Extensivo	14	50,0		2,05	
<b>Contato com bovinos</b>					
Não	40	47,5	0,45	1	(0,6 – 1,9)
Sim	16	50,0		1,05	
<b>Grau de infestação por <i>D. nitens</i> em equinos da propriedade</b>					
Moderada/alta infestação	24	75,0	0,00	1	( 1,4 – 4,8)
Ausente/leve	32	28,1		2,67	

N: Número de propriedades analisadas; P: p-valor; \*\*Teste Exato de Fisher; RF: Razão de frequência; CI: Intervalo de Confiança.

A frequência de equinos positivos para *B. caballi*, assim como propriedades com a presença de pelo menos um equino positivo, em função das práticas de manejo envolvendo o uso de produtos carrapaticidas estão descritos na Tabela 7.

O uso de carrapaticida foi estatisticamente associado à positividade dos animais ( $p < 0,05$ ). Do total de 56 propriedades analisadas, 47 utilizam a prática de tratamento regular nos animais, representando 83,9% ( $n = 56$ ). Desse total, 27 destas (57,4%) apresentam pelo menos um equino positivo para *B. caballi*.

Pôde-se observar, no presente estudo, que dos 430 equinos que recebiam algum tipo de tratamento carrapaticida, 89 (20,7%) foram positivos ao teste da PCR para *B. caballi*, diferindo significativamente, dos animais não tratados ( $p < 0,05$ ) (Tabela 7).

**Tabela 7.** Frequência de equinos e propriedades com equinos positivos para *Babesia caballi* a partir da *nested* PCR, de acordo com o tratamento carrapaticida utilizado nas microrregiões Serrana e de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.

Tratamento acaricida	Propriedades com equinos positivos		Equinos positivos	
	N	(%)	N	(%)
<b>Uso de acaricidas</b>				
Sim	47	57,4	430	20,7 <sup>a</sup>
Não	9	0,0	86	0,0 <sup>b</sup>

<sup>A</sup>Valores seguidos da mesma letra, na mesma coluna, não diferem estatisticamente pelo teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher, a 5% de significância. N: Número total da amostra.

É importante mencionar que alguns dos proprietários/responsáveis pelos animais não souberam responder com exatidão a periodicidade na aplicação carrapaticida ou a base química utilizada. E em relação à dose empregada por estes, na aplicação de produtos, alguns relataram a utilização de doses abaixo do recomendado pelos fabricantes destes produtos.

#### 4.3 Parâmetros Hematológicos de Equinos das Duas Microrregiões Diagnosticados com *B. caballi*

Os dados hematológicos dos equinos da microrregião de Itaguaí frente à positividade dos animais para *B. caballi* estão demonstrados nas tabelas 8 e 9. De acordo com estes dados é possível observar que, entre os grupos de animais testados via *nested* PCR, somente a amplitude de distribuição das hemácias (ADH) apresentou diferença ( $p < 0,05$ ) entre os grupos testados (Tabela 8). Contudo, vale destacar que embora observada diferença significativa, ambos os grupos apresentaram médias dentro dos padrões normais para a espécie equina.

Ainda na tabela 8, é possível observar que ambos os grupos de animais desta microrregião, positivos e negativos para *B. caballi*, apresentaram valores médios do hematócrito (HT) abaixo do valor de referência para este parâmetro, caracterizando um quadro de anemia normocítica normocrômica nestes animais. No presente estudo, verificou-se que, independente do resultado da *nested* PCR, os equinos apresentaram média de valores normais para a maioria dos parâmetros hematológicos observados para esta espécie animal (Tabela 8).

Em relação ao leucograma, pode se observar que, os valores médios do número de monócitos, entre os grupos de equinos analisados apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Entretanto, estes valores não estiveram acima do valor de referência para a espécie (Tabela 9).

**Tabela 8.** Valores médios dos parâmetros relacionados ao eritrograma, sólidos totais e fibrinogênio de equinos em função do resultado da *nested* PCR para *Babesia caballi* na microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.

Parâmetros	Resultado	N	Média	DP	EP	Valores limites		Valores Referenciais**
						Mínimo	Máximo	
He (x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	Negativo	172	6,8 <sup>a</sup>	1,2	0,1	4,1	9,7	6,0 – 11,3
	Positivo	70	6,8 <sup>a</sup>	1,2	0,1	2,4	9,5	
HB (g/dL)*	Negativo	172	10,9 <sup>a</sup>	1,7	0,1	6,5	15,4	10,6 – 18,9
	Positivo	70	10,5 <sup>a</sup>	1,9	0,2	3,3	15,3	
HT (%)*	Negativo	172	30,9 <sup>a</sup>	5,2	0,4	17,1	44,7	34 - 49
	Positivo	70	29,6 <sup>a</sup>	5,9	0,7	8,0	42,9	
VCM (fm <sup>3</sup> )	Negativo	172	43,6 <sup>a</sup>	5,4	0,6	33,0	53,0	38 - 49
	Positivo	70	45,5 <sup>a</sup>	3,5	0,3	34,0	55,0	
HCM (pg)	Negativo	172	15,6 <sup>a</sup>	1,9	0,2	12,2	19,6	15 - 19
	Positivo	70	16,1 <sup>a</sup>	1,1	0,1	12,3	20,3	
CHCM (g/dL)	Negativo	172	35,8 <sup>a</sup>	1,4	0,2	32,8	40,9	37 - 40
	Positivo	70	35,6 <sup>a</sup>	2,5	0,2	32,7	65,4	
ADH (%)	Negativo	172	16,1 <sup>b</sup>	1,8	0,2	6,3	18,2	15,2 – 19,8 <sup>1</sup>
	Positivo	70	16,8 <sup>a</sup>	1,1	0,1	6,5	18,2	
PLAQ (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )*	Negativo	172	143,5 <sup>a</sup>	55,8	6,7	29,0	313,0	100 – 350
	Positivo	70	138,4 <sup>a</sup>	53,4	4,1	15,0	361,0	
VPM (fm <sup>3</sup> )	Negativo	172	6,6 <sup>a</sup>	1,4	0,2	5,4	17,7	5,6 – 8,3
	Positivo	70	7,0 <sup>a</sup>	4,7	0,4	5,5	60,6	
FIB (mg/dL)	Negativo	172	341,4 <sup>a</sup>	183,8	22,0	100,0	800,0	100 - 400
	Positivo	70	333,1 <sup>a</sup>	151,8	11,6	100,0	800,0	
Sólidos Totais (g/dL)	Negativo	172	7,3 <sup>a</sup>	0,6	0,1	6,0	8,8	5,2 – 7,9
	Positivo	70	7,4 <sup>a</sup>	0,6	0,0	5,8	8,8	

\*Valores seguidos de mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente através do teste F a 5% de significância (p<0,05). <sup>a</sup>Valores seguidos de mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente através do teste de Mann-Whitney a 5% de significância (p<0,05). HE: hemácias; HB: hemoglobina; HT: hematócrito; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; ADH: amplitude de distribuição das hemácias; PLAQ: plaquetas; MPV: volume plaquetário médio; FIB: Fibrinogênio; N: número de equinos; DP: desvio padrão; EP: erro padrão. \*\*Valores de referência segundo Schalm (2010); <sup>1</sup>Valores de ADH segundo Easley (1985).

O valor médio do número de monócitos foi maior no grupo de equinos positivos para *B. caballi* (p<0,05), demonstrando também um quadro de monocitose nestes animais (Tabela 9).

Apesar de serem observadas algumas diferenças no leucograma dos equinos, com relação ao grupo de animais positivos e negativos para *B. caballi*, o número médio de leucócitos não apresentou diferença entre os grupos, assim como também não foi observado diferença para os valores de referência deste parâmetro (Tabela 9).

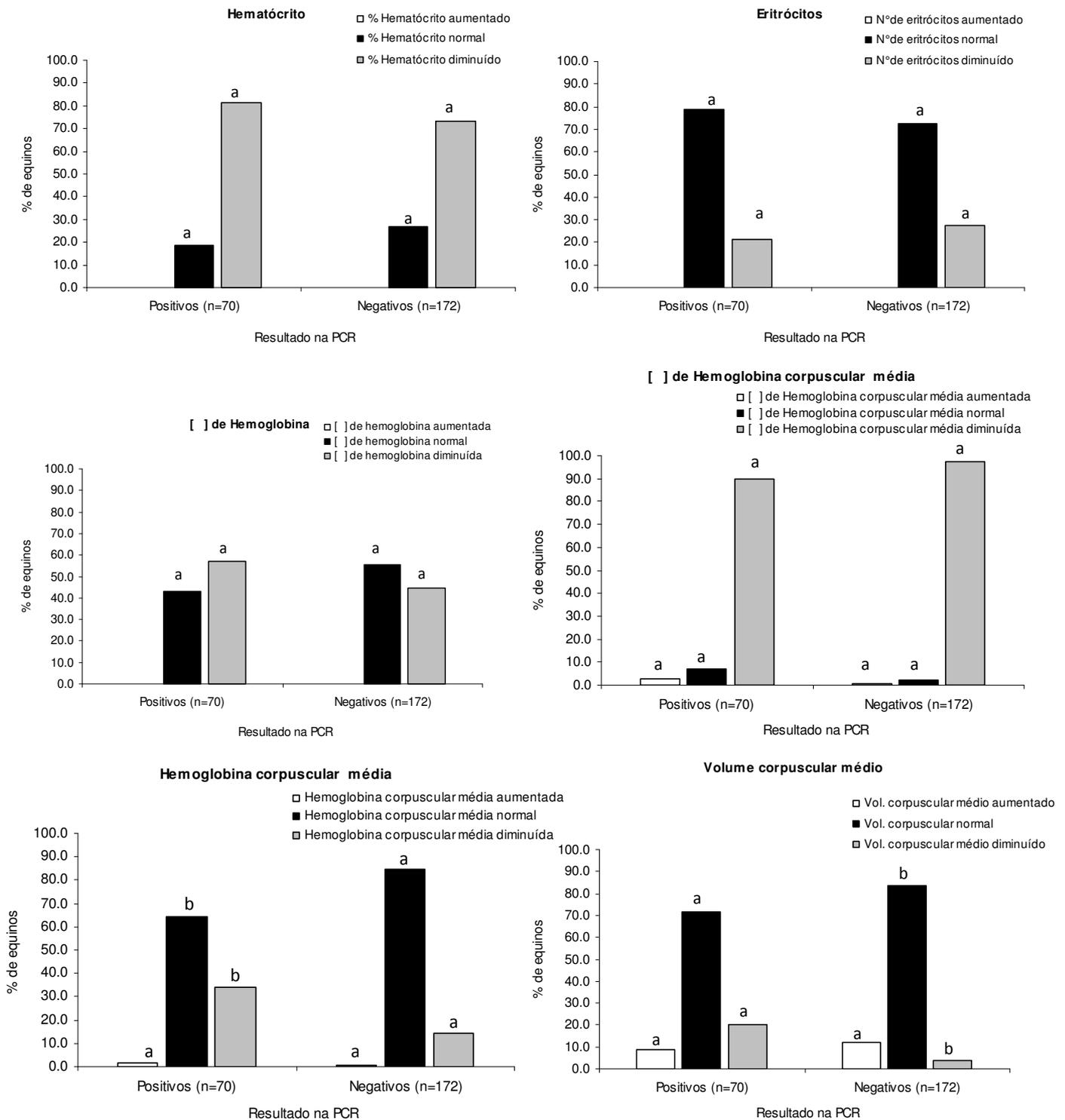
**Tabela 9.** Valores médios dos parâmetros relacionados ao leucograma de equinos em função do resultado da *nested* PCR para *Babesia caballi* na microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro.

Parâmetros	Resultado	N	Média	DP	EP	Valores limites		Valores Referenciais*
						Mínimo	Máximo	
LEUC ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	Negativo	172	10,3 <sup>a</sup>	3,0	0,2	4,1	25,0	5,3 – 13,8
	Positivo	70	10,8 <sup>a</sup>	3,3	0,4	5,5	21,8	
LINF ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	Negativo	172	3,7 <sup>a</sup>	2,3	0,2	0,4	13,5	1,1 – 5,7
	Positivo	70	3,8 <sup>a</sup>	3,1	0,4	0,5	14,6	
MON ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	Negativo	172	0,4 <sup>b</sup>	0,3	0,0	0,0	1,6	0,1 – 0,6
	Positivo	70	0,5 <sup>a</sup>	0,3	0,0	0,1	1,6	
NEUT ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	Negativo	172	5,5 <sup>a</sup>	1,9	0,1	1,0	13,3	2,7 - 9,7
	Positivo	70	5,9 <sup>a</sup>	1,7	0,2	2,1	10,4	
EOS ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	Negativo	172	0,7 <sup>a</sup>	0,5	0,0	0,0	3,7	0,1 - 0,6
	Positivo	70	0,7 <sup>a</sup>	0,5	0,1	0,0	3,0	
BAS ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	Negativo	172	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0 - 0,03
	Positivo	70	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	

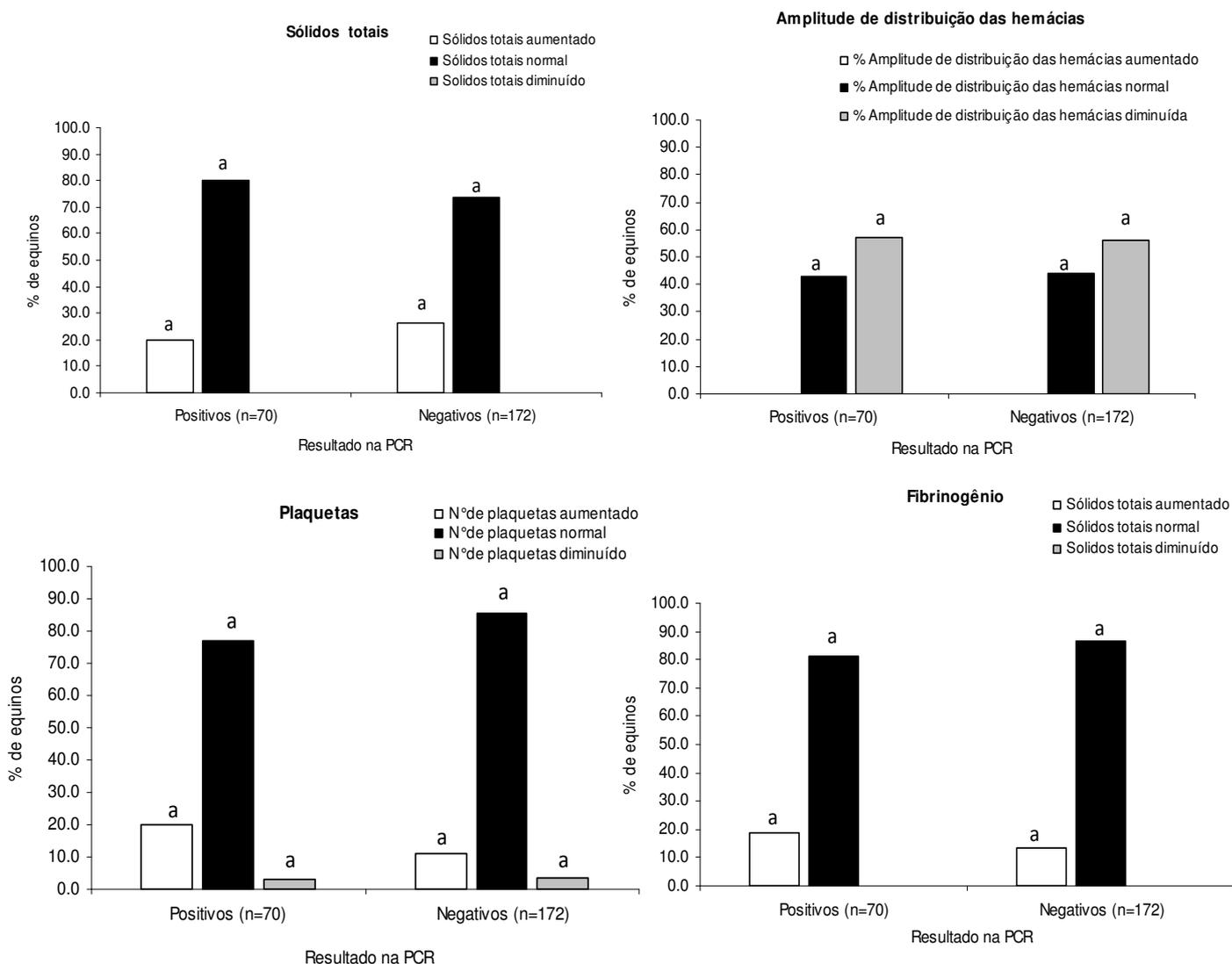
<sup>a</sup>Valores seguidos de mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente através do teste de Mann-Whitney a 5% de significância ( $p < 0,05$ ). LEUC: leucócitos; LINF: linfócitos; MON: monócitos; NEUT: neutrófilos; EOS: Eosinófilos; BAS: basófilos; N: número de equinos; DP: desvio padrão; EP: erro padrão, \*Valores de referência segundo Schalm (2010).

A frequência de equinos com alterações hematológicas em relação ao resultado da PCR dos animais da microrregião de Itaguaí pode ser observada nas figuras 2 e 3. A partir desta análise, foi possível observar que somente os índices hematimétricos hemoglobina corpuscular média (HCM) e volume corpuscular médio (VCM) apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos de animais positivos e negativos. Em ambos os parâmetros analisados, equinos do grupo positivo para *B. caballi* apresentaram maior frequência de animais com valores abaixo dos valores de referência (Figura 2).

Contudo, este achado não foi observado em nenhum outro parâmetro hematológico analisado, embora a maioria destes tenha apresentado alterações em ambos os grupos de equinos observados (positivos e negativos) (Figura 3).

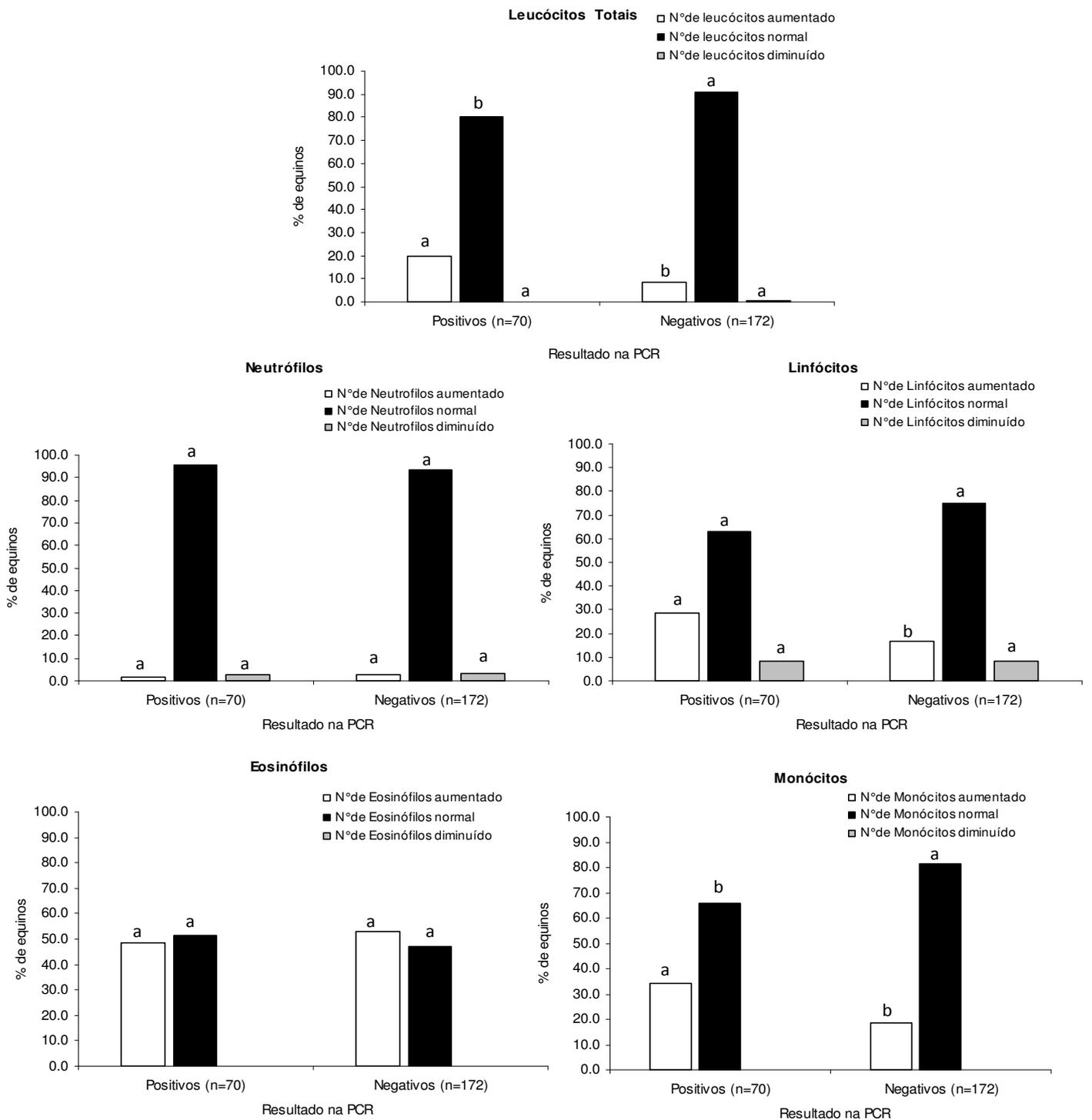


**Figura 2.** Frequência das alterações observadas no valor do hematócrito, no número de eritrócitos, na concentração de hemoglobina, na concentração de hemoglobina corpuscular média, na hemoglobina corpuscular média e no volume corpuscular médio, em função do resultado da *nested* PCR para *B. caballi*, nos equinos da microrregião de Itaguaí. <sup>a</sup>Letras iguais entre as colunas de mesma legenda não diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de 5% de confiança.



**Figura 3.** Frequência das alterações observadas no valor dos sólidos totais, na amplitude de distribuição das hemácias, no número de plaquetas e no valor de fibrinogênio em função do resultado da *nested* PCR para *Babesia caballi*, nos equinos da microrregião de Itaguaí. <sup>a</sup>Letras iguais entre as colunas de mesma legenda não diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de 5% de confiança.

Com relação às alterações observadas no leucograma dos equinos da microrregião de Itaguaí foi possível observar que a frequência de animais apresentaram um quadro de leucocitose foi maior no grupo de animais positivos ( $p < 0,05$ ). Este achado foi observado também em relação ao quadro de monocitose e linfocitose, com maior frequência nos animais positivos. Vale destacar que, o quadro de monocitose foi observado em 34,3% ( $n=24/70$ ) dos equinos positivos para na PCR para *B. caballi* (Figura 4).



**Figura 4.** Frequência das alterações observadas no número de leucócitos totais, número de linfócitos, número de neutrófilos, número de eosinófilos e número de monócitos em função do resultado da *nested* PCR para *Babesia caballi*, nos equinos da microrregião de Itaguaí. <sup>a</sup>Letras iguais entre as colunas de mesma legenda não diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de 5% de confiança.

Na tabela 10 estão demonstrados os valores médios dos parâmetros hematológicos dos equinos da microrregião Serrana, em relação aos grupos positivos e negativos para *B. caballi* a partir da PCR. É possível observar que somente o valor médio da hemoglobina corpuscular

(HCM) apresentou diferença significativa entre os grupos testados, porém não apresentando valores médios fora da faixa de normalidade para esta espécie.

Além disso, foi possível observar também que, nos equinos da microrregião Serrana, independente do grupo de animais testados, todos os parâmetros analisados apresentaram valores médios dentro da faixa de normalidade para a espécie equina (Tabela 10).

**Tabela 10.** Valores médios dos parâmetros relacionados ao eritrograma, sólidos totais e fibrinogênio de equinos em função do resultado da *nested* PCR para *Babesia caballi* na microrregião Serrana, estado do Rio de Janeiro.

Parâmetros	Resultado	N	Média	DP	EP	Valores limites		Valores de Referências**
						Mínimo	Máximo	
He ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )*	Negativo	255	8,1 <sup>a</sup>	1,4	0,1	4,4	12,0	6,0 – 11,3
	Positivo	19	8,3 <sup>a</sup>	1,1	0,2	6,0	10,5	
HB (g/dL)*	Negativo	255	12,7 <sup>a</sup>	2,0	0,1	7,7	18,0	10,6 – 18,9
	Positivo	19	12,4 <sup>a</sup>	1,4	0,3	8,3	14,5	
HT (%)*	Negativo	255	36,1 <sup>a</sup>	5,9	0,4	21,9	51,6	34 – 49
	Positivo	19	35,0 <sup>a</sup>	3,7	0,9	25,4	40,8	
VCM ( $\text{fm}^3$ )*	Negativo	255	42,7 <sup>a</sup>	2,9	0,7	37,0	48,0	38 – 49
	Positivo	19	44,4 <sup>a</sup>	5,4	0,3	4,0	54,0	
HCM (pg)*	Negativo	255	15,0 <sup>a</sup>	1,0	0,2	13,1	16,4	15 – 19
	Positivo	19	15,8 <sup>b</sup>	1,4	0,1	12,2	19,0	
CHCM (g/dL)	Negativo	255	35,2 <sup>a</sup>	2,0	0,1	15,4	39,3	37 – 40
	Positivo	19	35,3 <sup>a</sup>	1,2	0,3	32,7	36,8	
ADH (%)	Negativo	255	16,8 <sup>a</sup>	0,9	0,1	11,1	18,7	15,2 – 19,8 <sup>1</sup>
	Positivo	19	16,9 <sup>a</sup>	0,6	0,1	15,5	17,8	
PLAQ ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )*	Negativo	255	127,0 <sup>a</sup>	46,3	2,9	22,0	339,0	100 – 350
	Positivo	19	122,1 <sup>a</sup>	36,0	8,3	59,0	197,0	
MPV ( $\text{fm}^3$ )	Negativo	255	6,4 <sup>a</sup>	0,4	0,0	5,4	9,3	5,6 – 8,3
	Positivo	19	6,5 <sup>a</sup>	0,3	0,1	5,9	7,2	
FIB (mg/dL)	Negativo	255	300,4 <sup>a</sup>	163,5	10,2	100,0	800,0	100 - 400
	Positivo	19	331,6 <sup>a</sup>	141,6	32,5	100,0	600,0	
Sólidos Totais (g/dL)	Negativo	255	7,1 <sup>a</sup>	0,6	0,0	5,8	9,4	6,0 – 8,4
	Positivo	19	7,2 <sup>a</sup>	0,4	0,1	6,4	7,9	

\*Valores seguidos de mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente através do teste F a 5% de significância ( $p < 0,05$ ). <sup>a</sup>Valores seguidos de mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente através do teste de Mann-Whitney a 5% de significância ( $p < 0,05$ ). HE: hemácias; HB: hemoglobina; HT: hematócrito; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; ADH: amplitude de distribuição das hemácias; PLAQ: plaquetas; MPV: volume plaquetário médio; N: número de equinos; DP: desvio padrão; EP: erro padrão. \*\*Valores de referência segundo Schalm (2010); <sup>1</sup>Valores de ADH segundo Easley (1985).

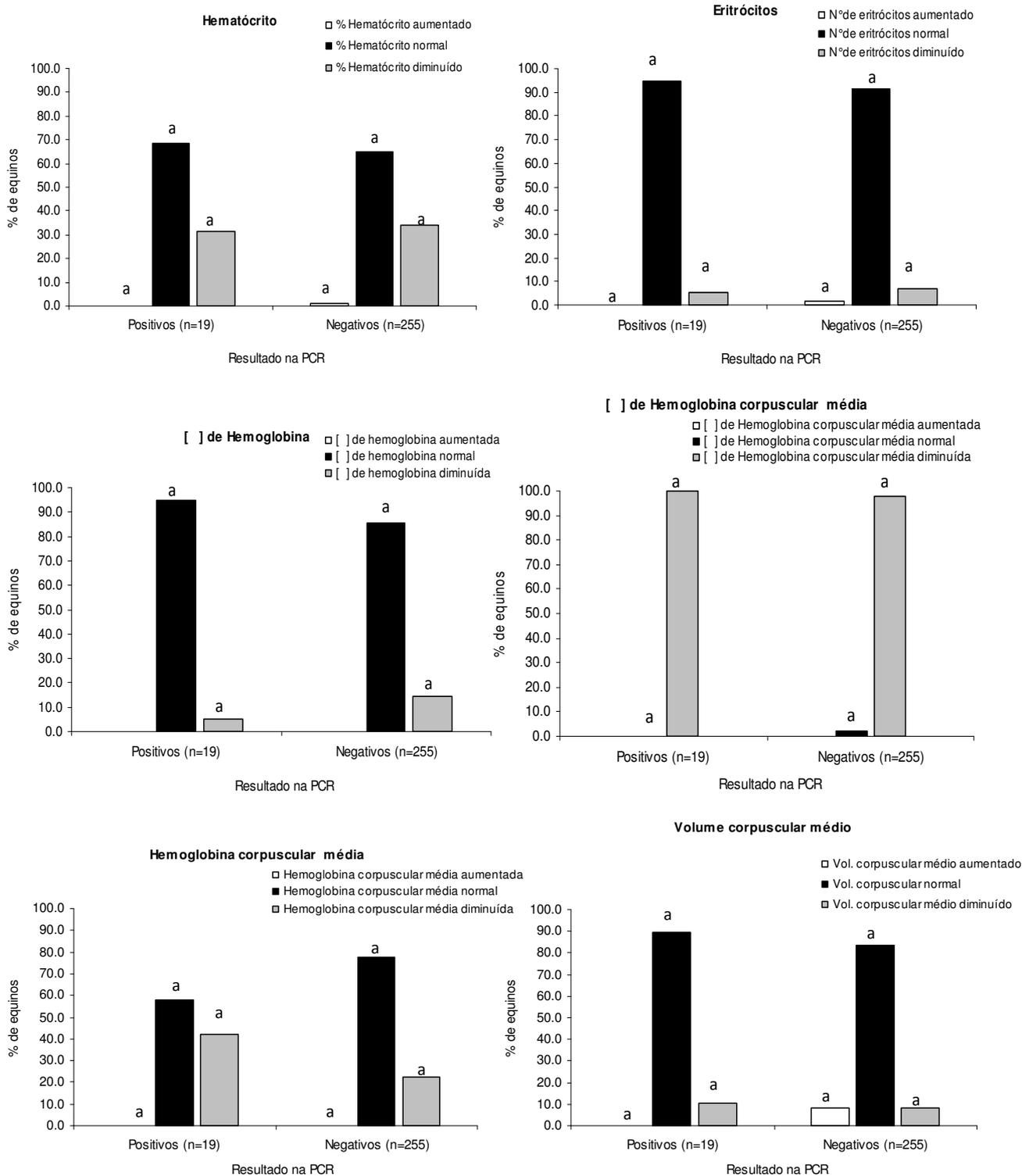
Em relação ao leucograma dos equinos da microrregião Serrana não foi evidenciada diferença significativa entre os grupos de equinos testados com relação os valores médios nos diferentes parâmetros analisados (Tabela 11). Contudo, com exceção do valor médio do número de monócitos do grupo negativo, nenhum outro valor médio do leucograma foi observado fora da faixa de normalidade para esta espécie (Tabela 11).

**Tabela 11.** Valores médios dos parâmetros relacionados ao leucograma de equinos em função do resultado da *nested* PCR para *Babesia caballi* na microrregião Serrana, estado do Rio de Janeiro.

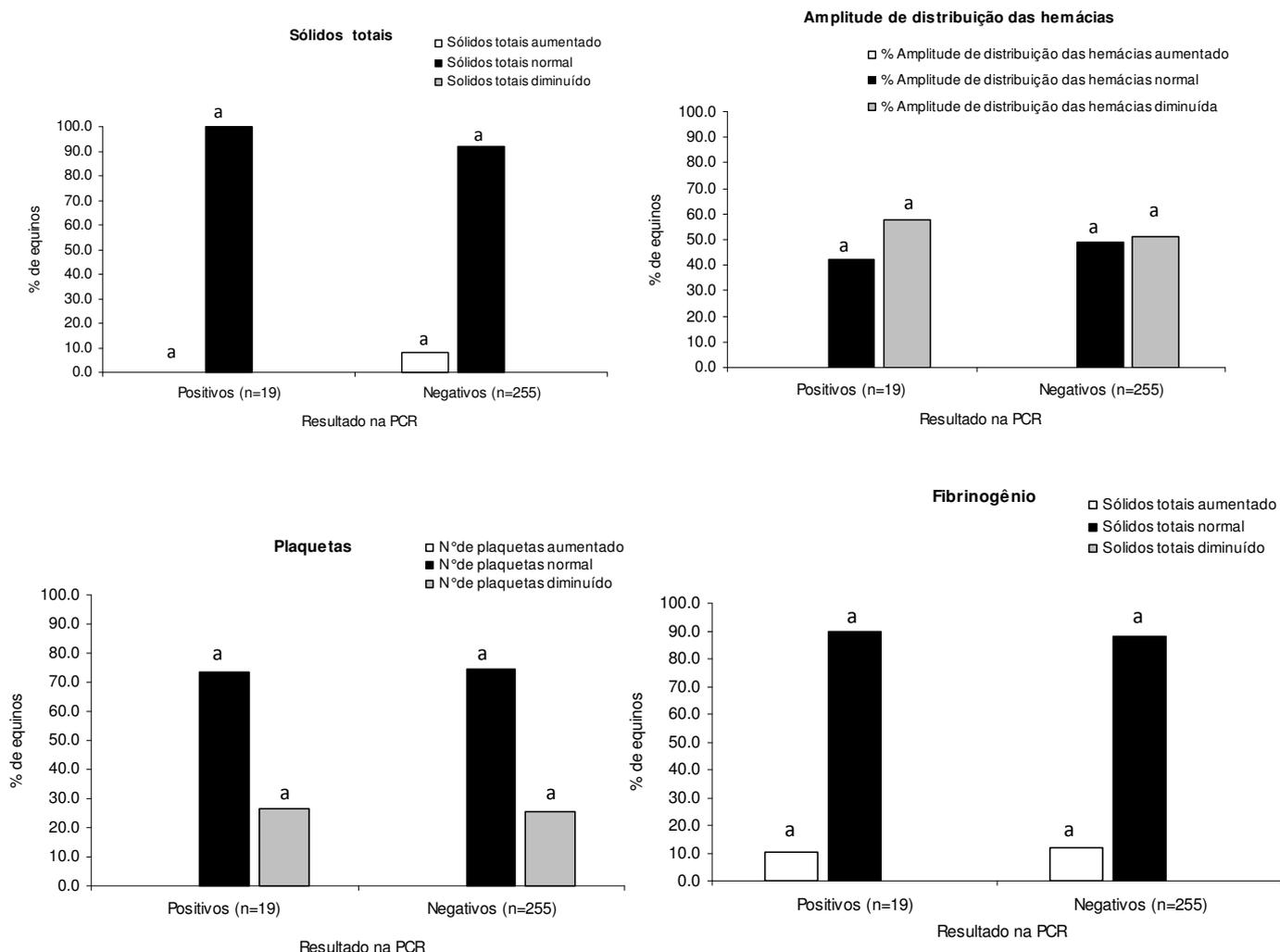
Parâmetros	Resultado	N	Média	DP	EP	Valores limites		Valores Referenciais*
						Mínimo	Máximo	
LEUC ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	Negativo	255	8,9 <sup>a</sup>	2,5	0,2	4,2	24,0	5,3 – 13,8
	Positivo	19	9,5 <sup>a</sup>	2,3	0,5	5,3	12,9	
LINF ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	Negativo	255	1,7 <sup>a</sup>	0,9	0,1	0,3	5,5	1,1 – 5,7
	Positivo	19	2,0 <sup>a</sup>	0,9	0,2	0,8	3,8	
MON ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	Negativo	255	0,7 <sup>a</sup>	0,3	0,0	0,1	1,9	0,1 – 0,6
	Positivo	19	0,6 <sup>a</sup>	0,3	0,1	0,2	1,4	
NEUT ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	Negativo	255	5,9 <sup>a</sup>	1,9	0,1	2,1	18,0	2,7 - 9,7
	Positivo	19	6,3 <sup>a</sup>	1,7	0,4	2,4	9,0	
EOS ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	Negativo	255	0,6 <sup>a</sup>	0,5	0,0	0,0	3,9	0,1 - 0,6
	Positivo	19	0,5 <sup>a</sup>	0,5	0,1	0,0	1,6	
BAS ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	Negativo	255	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0 - 0,03
	Positivo	19	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	

<sup>a</sup>Valores seguidos de mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente através do teste de Mann-Whitney a 5% de significância ( $p < 0,05$ ), LEUC: leucócitos; LINF: linfócitos; MON: monócitos; GRAN: Granulócitos; N: número de equinos; DP: desvio padrão; EP: erro padrão, \*Valores de referência segundo Schalm (2010).

Com relação às alterações dos índices hematimétricos, em função dos grupos de equinos positivos e negativos para *B. caballi* foi possível observar que, embora tenha ocorrido frequência de animais com alterações em ambos os grupos (positivos e negativos), não foi evidenciado diferença significativa em nenhum destes parâmetros avaliados (Figura 5 e 6).

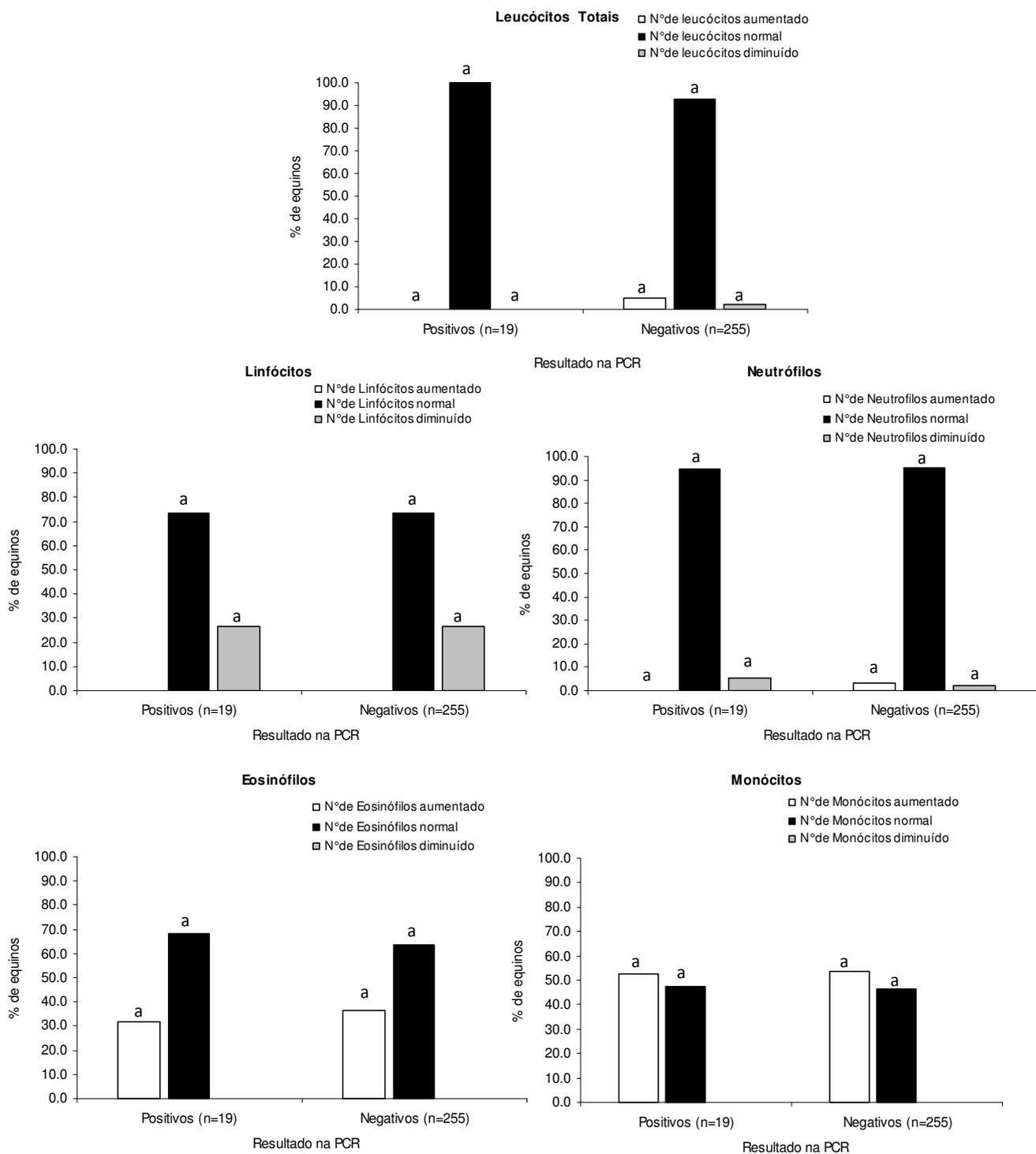


**Figura 5.** Frequência das alterações observadas no valor do hematócrito, no número de eritrócitos, na concentração de hemoglobina, na concentração de hemoglobina corpuscular média, na hemoglobina corpuscular média e no volume corpuscular médio, em função do resultado da *nested* PCR para *Babesia caballi*, nos equinos da microrregião Serrana. <sup>a</sup>Letras iguais entre as colunas de mesma legenda não diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de 5% de confiança.



**Figura 6.** Frequência das alterações observadas no valor dos sólidos totais, na amplitude de distribuição das hemácias, no número de plaquetas e no valor de fibrinogênio em função do resultado da *nested* PCR para *Babesia caballi*, nos equinos da microrregião Serrana. <sup>a</sup>Letras iguais entre as colunas de mesma legenda não diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de 5% de confiança.

A frequência de equinos da microrregião Serrana com alterações no leucograma, no grupo de animais positivos e negativos para a PCR, esta demonstrada na figura 7. Nenhum parâmetro referente ao leucograma apresentou diferença significativa entre as frequências de equinos com alterações no exame, em ambos os grupos analisados (Figura 7).



**Figura 7.** Frequência das alterações observadas no número de leucócitos totais, número de linfócitos, número de neutrófilos, número de eosinófilos e número de monócitos em função do resultado da *nested* PCR para *Babesia caballi*, nos equinos da microrregião Serrana. <sup>a</sup>Letras iguais entre as colunas de mesma legenda não diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de 5% de confiança.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Aspectos Epidemiológicos da Área de Estudo

Em relação à epidemiologia da infecção por *B. caballi* em equinos no Brasil, muitos estudos foram conduzidos em diferentes regiões do país (LINHARES et al., 1997; KERBER et al., 1997; RIBEIRO et al., 1995; PFEIFER-BARBOSA et al., 1995; PFEIFER-BARBOSA et al., 2000).

No presente estudo, observou-se uma frequência de 17,2% de equinos positivos, sendo mais acometidos os animais da microrregião de Itaguaí.

Em estudos soropidemiológicos realizados no estado do Rio de Janeiro foram observadas frequências que variaram de 62,5% a 93,6, para *B. caballi* nos equinos deste estado (PFEIFER-BARBOSA et al., 1992; BITTENCOURT et al., 1997). Embora o estudo realizado por Heim et al. (2007), no estado de Minas Gerais, tenha observado uma soroprevalência de 83% dos animais analisado, somente 12,5% destes foram positivos através da análise molecular. Da mesma forma, Battsetseg et al. (2002), utilizando a PCR, observaram uma frequência de 8,7% de equinos positivos por *B. caballi* no estado de Mato Grosso.

A partir destes estudos, pode se observar que a frequência de positividade dos animais foi um pouco acima da observada em outras regiões do país, quando comparados frente a estes ensaios moleculares. Contudo, este valor ainda está bem abaixo ao observado para estudos soropidemiológicos no mesmo estado. Este resultado ocorre em detrimento da própria técnica de diagnóstico utilizada, pois no caso da PCR, se caracteriza por ser um método de diagnóstico direto e que detecta somente as amostras de animais que estejam infectados por este parasito no momento da coleta. Já o exame sorológico pode avaliar se o animal foi exposto ao agente ou se infectou em algum momento ao longo da sua vida. Dessa forma, no exame sorológico é possível, na ausência do agente na amostra, detectar de forma indireta a infecção através dos anticorpos circulantes, ou um contato prévio deste com o hemoparasito.

A transmissão deste protozoário para equinos no Brasil está associada a carrapatos da espécie *Dermacentor nitens* (PFEIFER-BARBOSA et al., 1992; LINHARES, 1994). Dentre as principais espécies de carrapatos que acometem os equinos no Brasil são *A. cajennense*, *D. nitens* e *R. microplus* (LABRUNA et al., 2001).

No presente estudo, a infestação dos equinos por *D. nitens* demonstrou ser um dos principais fatores associados à positividade dos animais. Da mesma forma, foi possível observar que propriedades com a presença de equinos em elevada taxa de infestação por esta espécie de carrapato apresentaram, pelo menos, um animal da criação positivo para este agente.

Estes resultados corroboram com os achados obtidos no estudo de Kerber et al. (2009) no qual foi possível verificar alto nível de infestação dos equinos por carrapatos da espécie *D. nitens* e a positividade dos equinos para *B. caballi*.

A primeira identificação de formas de multiplicação deste protozoário em amostras de hemolinfa e tecidos de *D. nitens*, foi observada a partir dos estudos realizados de Holbrook et al. (1968). Estes autores apontaram a transmissão transovariana nestes carrapatos.

No Brasil, diversos estudos foram conduzidos, corroborando os achados de Holbrook et al. (1968) que observaram formas em multiplicação de *B. caballi* em carrapatos da espécie *D. nitens* (PFEIFER BARBOSA et al., 1992; LINHARES, 1994; PFEIFER BARBOSA, et al., 1995; MUJICA, 2002). Mujica (2002) observou as formas de multiplicação deste protozoário, tanto nos em ovários, quanto nos ovos de *D. nitens* (MUJICA, 2002).

E em estudo realizado por Garcia-Bocanegra et al. (2013) em equídeos na Espanha, os autores observaram que além da soropositividade dos animais estar associada à infestação por carrapatos, a ausência de abrigo para os equinos foi um fator associado à positividade para *B. caballi* na criação. No presente estudo, a presença ou ausência de abrigo foi uma variável avaliada de forma subjetiva e enquadrada no aspecto geral da propriedade, com a presença ou ausência de instalações adequadas à criação. Neste sentido, em um primeiro momento, o manejo sanitário e zootécnico insatisfatório conduzido nas criações apresentou associação com a positividade dos animais. Esta variável, que mede de forma subjetiva a qualidade da criação, após análise multivariada, não permaneceu no modelo final, já que outras variáveis foram mais associadas com a positividade dos equinos, como a presença de carrapatos da espécie *D. nitens*.

Desta forma, é possível observar que aspectos relacionados à criação e ao ambiente no qual o equino permanece na propriedade estão diretamente relacionados à presença de *B. caballi* nos animais devido à relação direta com infestação por carrapatos vetores.

Em relação à presença de carrapatos da espécie *A. cajennense* nos animais e a positividade dos equinos foram possíveis observar que, sob a ótica epidemiológica nas microrregiões estudadas, esta espécie não apresenta participação na cadeia da transmissão deste protozoário. Este resultado corrobora os achados obtidos por Kerber et al. (2009) que não observaram associação estatística entre a presença de *A. cajennense* em equinos e a soropositividade de animais para *B. caballi*.

No presente estudo, observou-se também que a presença de *D. nitens* nos equinos assim como o elevado grau de infestação promovido por este carrapato nos equinos foram fatores diretamente associados à positividade dos animais para *B. caballi*. O estudo destacou ainda que o elevado grau de infestação por esta espécie de carrapato esteve diretamente associado à presença de pelo menos um equino infectado por *B. caballi* na propriedade. Este resultado esta de acordo com os resultados obtidos por Kerber et al. (2009) que observaram que tanto a presença de carrapatos desta espécie nos equinos, como o elevado nível de infestação nos animais se apresentaram diretamente associados à positividade dos equinos para *B. caballi*.

Sobre os possíveis fatores relacionados à infestação dos equinos por *D. nitens*, Labruna et al. (2001) não conseguiram delimitar os fatores predisponentes à presença deste carrapato, em criações no estado de São Paulo. Embora os mesmos autores tenham destacado aspectos como a presença de pastos “sujos” como fator determinante para a ocorrência de *A. cajennense*, este resultado não foi observado para *D. nitens*. No presente estudo, embora não tenham sido observados fatores diretamente relacionados à infestação dos equinos por este carrapato, pôde-se observar que os animais infestados pertenciam a propriedades que mantinham os animais em sistema extensivo e em propriedades com condições de manejo zootécnico insatisfatória. Desta forma, estas condições podem ter ampliado a presença deste carrapato na propriedade, associado ao fato do difícil controle deste ectoparasito.

Labruna et al. (2001) após avaliar equinos em criações no estado de São Paulo, observaram que os tratamentos carrapaticidas utilizados não eram efetivos para o controle deste artrópode nas propriedades abordadas, destacando a dificuldade em seu controle. Cunha et al. (2007) também destacaram a dificuldade de controle deste carrapato.

Outro fator que pode estar associado à presença deste vetor nas propriedades analisadas são os aspectos climáticos das regiões estudadas. Pode-se perceber que, na microrregião de Itaguaí, existe uma maior frequência de equinos positivos para *B. caballi*, o que consequentemente pode estar relacionado às condições nas quais esta região está submetida e que favorecem uma melhor disseminação e proliferação do carrapato vetor.

Segundo Heim et al. (2007), a transmissão de hemoparasitos geralmente está influenciada pela dinâmica de populações de vetores, devido as condições climáticas. Logo, a partir deste estudo foi possível observar que os equinos localizados na microrregião Serra

apresentaram menor frequência de positividade por *B. caballi*, fato este que pode estar relacionado diretamente a influência que o clima presente nesta região exerce sobre carrapato vetor. Segundo Bastos et al. (1996), a temperatura de 18°C possui efeito deletério sobre a biologia de *D. nitens*. Assim, de acordo com estes autores, regiões aonde predominem temperaturas similares a 18°C, como na microrregião Serrana, onde caracteristicamente são identificadas áreas de elevadas altitudes com temperatura média anual em torno de 19°C, nestas condições o potencial biótico deste ixodídeo é severamente afetado dificultando a sua dispersão ou manutenção em equinos (BASTOS et al., 1996).

Além destes fatores relacionados à positividade dos animais, outro fator associado diretamente à positividade foi a faixa etária dos equinos analisados, já que equinos com idade abaixo de dois anos apresentaram 3,3 mais vezes chance de estarem positivos para *B. caballi*, através da análise molecular pela PCR. Sobre este aspecto, alguns estudos apontam que a infecção por *B. caballi* pode persistir no equino, por um período de 1 a 4 anos (HOURLIGAN; KNOWLES, 1979 apud RUEGG et al. 2008; DE WAAL; VAN HEERDEN, 1994 apud RUEGG et al. 2008). Esta relação entre a idade dos animais e a infecção por estes hemoparasitos foram bem demonstrados pelos estudos de Ruegg et al. (2007) e Ruegg et al. (2008). Estes autores observaram, através de estudos epidemiológicos, a interação entre a infecção dos equinos por *Theileria equi* e *B. caballi* de acordo com a faixa etária destes animais. Ruegg et al. (2007) a partir de modelos matemáticos propuseram que a dinâmica da infecção por *B. caballi* diminuía de acordo com o aumento da idade.

Esta observação, comum entre todos estes estudos, pode estar atrelada à premissa de que a prevalência observada nos hemoparasitas é consequência também da relação entre a carga parasitária inoculada nos animais por parte dos vetores e a taxa de sua eliminação do animal vertebrado, associada a um sistema imune competente presente nestes animais (RUEGG et al., 2007).

No presente estudo observou-se associação da positividade dos equinos por *B. caballi* com a utilização de carrapaticidas nas criações. Este achado pode estar relacionado à presença elevada de equinos infestados por diferentes espécies de carrapatos, e dentre eles, *D. nitens*, o que explicaria a elevada frequência de positividade nesses animais.

Vale destacar que, a conduta na aplicação destes produtos carrapaticidas de forma incorreta acaba exigindo por parte dos proprietários, um maior número de aplicações, o que não necessariamente é garantia de um controle eficaz deste carrapato. A forma de aplicação também demonstra ser um importante fator que contribui para o controle deste artrópode, pois conforme Cunha et al. (2007) descreveram, para o controle ser eficaz nesta espécie de carrapato, é necessária a aplicação de produto carrapaticida, não só no corpo do animal, como também no divertículo nasal dos equinos, local de ocorrência da infestação dos animais.

Com isso, o controle eficiente do principal vetor deste hemoparasito, em ambas as regiões analisadas requer condutas estratégicas que permitam seu controle nas propriedades criadoras, levando em consideração os aspectos sazonais de sua ocorrência e as formas corretas de aplicação dos carrapaticidas existentes no mercado.

## **5.2 Parâmetros Hematológicos de Equinos Diagnosticados com *B. caballi***

A infecção provocada por *B. caballi* nos equinos promovem a redução do número de hemácias, número de plaquetas e na concentração de hemoglobina (DE WAAL, 1992). Em relação aos índices hematimétricos, nos casos agudos da doença é possível observar a redução do volume corpuscular médio (VCM), assim como o aumento da hemoglobina corpuscular média (HCM), demonstrando um quadro característico de anemia hemolítica (JAIN, 1993).

No presente estudo, a partir dos valores médios dos parâmetros do eritograma observados nos equinos da microrregião de Itaguaí foi possível observar um quadro de anemia

normocítica normocrômica, independente do resultado da PCR para *B. caballi*. Este achado reforça que nesta microrregião as alterações observadas na serie vermelha do hemograma dos equinos podem estar atreladas a condições nutricionais, de manejo e de possíveis infestações por parasitos hematófagos.

Ainda sobre aspectos relacionados ao quadro de anemia dos animais, equinos da microrregião Serrana não apresentaram alterações significativas do eritrograma em nenhum dos grupos de animais analisados, embora os valores médios da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram um pouco abaixo da normalidade em ambos os grupos.

Para a avaliação do quadro de anemia, o grau de anisocitose eritrocitária pode fornecer informações importantes sobre os aspectos da resposta do organismo do animal frente a esta patologia (JAIN, 1993). Para a análise deste parâmetro, o volume corpuscular médio (VCM) é o índice mais comumente utilizado (BALARIN et al., 2006). Contudo, muitas alterações dos eritrócitos não são detectadas utilizando os valores de VCM (BALARIN et al., 2006). Desta forma, a amplitude de distribuição das hemácias (ADH) também pode ser utilizada para esta finalidade, podendo ser adicionado ao exame do esfregaço sanguíneo na avaliação de anisocitose na amostra estudada (KARNAD; POSKITT, 1985 apud BALARIN et al., 2006). Valores elevados de ADH podem estar associados a um grau de resposta ao quadro de anemia. Neste estudo, equinos de Itaguaí positivos para *B. caballi* foram evidenciados com maior valor deste índice ( $p < 0,05$ ). No entanto, ambos os grupos não apresentaram alterações frente aos valores de referencia para esta espécie.

Em relação ao leucograma, casos agudos da doença são caracterizados por neutropenia e linfopenia (RISTIC, 1985 apud DE WAAL, 1992). Ainda, segundo Hailat et al. (1997), o número de leucócitos pode variar conforme a cronicidade da infecção dos equinos por agentes da babesiose. No presente estudo, embora o número médio de leucócitos nos equinos de ambas as microrregiões tenham se apresentado dentro da faixa de normalidade, independente da positividade para *B. caballi* foram observados valores médios mais elevados no grupo de equinos positivos, sem, entretanto apresentar diferença significativa. Vale destacar ainda que a frequência de equinos com leucocitose, linfocitose e monocitose frente aos valores de referencia foi maior ( $p < 0,05$ ) nos animais considerados positivos ao teste da *nPCR*, na microrregião de Itaguaí.

Este resultado pode estar relacionado principalmente às características de cronicidade da doença nos equinos nesta microrregião. Rubino et al. (2006) também observaram um aumento do número de linfócitos, em equinos infectados cronicamente, frente aos valores de equinos não infectados. Garba et al. (2011) também observaram um quadro de linfocitose em equinos infectados por *T. equi* e *B. caballi*, e estes autores apontam que este resultado está relacionado à infecção crônica dos animais.

Foi evidenciada na microrregião de Itaguaí, equinos positivos para *B. caballi* apresentando um quadro leve de monocitose. A ativação de macrófagos é um processo conhecido nos casos de babesiose e o papel protetor destas células tem sido reportado em infecções por diferentes espécies de *Babesia* sp. (HOMER, 2000). Entretanto, Garba et al. (2011) não evidenciaram alterações no número de monócitos em equinos infectados. Já Vasconcelos (2010) observou um quadro de monocitose na infecção por *Babesia* sp., em cães.

Vale destacar que a frequência de animais apresentando um quadro de monocitose associada a positividade por *B. caballi* ocorreu somente nos equinos da microrregião de Itaguaí. E embora esta monocitose tenha sido associada à presença de *B. caballi* nestes animais, foi possível observar que uma frequência de equinos na microrregião Serrana que apresentaram um quadro de monocitose, sem associação estatística com a positividade dos animais. Este resultado ratifica a possibilidade que outros fatores, além da presença de *B. caballi* nos equinos estajam promovendo a alteração no leucograma, tanto dos animais da microrregião de Itaguaí, quando dos animais da microrregião Serrana.

Em casos agudos da doença, é possível observar também um quadro de trombocitopenia, tanto em animais infectados naturalmente (CAMACHO et al. 2005; ZOBBA et al., 2008; AL-SAAD, 2009), quanto experimentalmente (DE WAAL et al., 1987).

No presente estudo, não foram evidenciadas alterações nos valores médios do número de plaquetas, assim como entre as frequências de equinos com alterações destes valores, em ambas as microrregiões. Este resultado mais uma vez reforça o caráter crônico da doença, sem demonstrar alterações significativas, neste parâmetro hematológico, para este agente.

Outra alteração também observada em equinos com babesiose é a queda nos valores da proteína plasmática e do fibrinogênio (ZOBBA et al., 2008; AL-SAAD, 2009). No entanto, no presente estudo, não foram evidenciadas estas alterações em nenhum destes parâmetros, reforçando o aspecto crônico da doença.

## 6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir:

1) A frequência de equinos infectados por *B. caballi* foi observada nas duas microrregiões estudadas, sendo mais frequente na microrregião de Itaguaí.

2) Equinos com idade inferior a dois anos foram os mais frequentemente positivos por *B. caballi*, através da *nPCR*, do que os cavalos adultos, em idade igual ou superior a dois anos.

3) A infestação por carrapatos da espécie *D. nitens* foi um dos principais fatores associados à positividade dos equinos por *B. caballi* nas propriedades estudadas.

4) As alterações hematológicas características da infecção aguda ou subaguda por *B. caballi* não foram evidenciadas.

## 7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALHASSAN, A.; GOVIND, Y.; TAM, N.T.; THEKISOE, O.M.; YOKOYAMA, N.; INOUE, N.; IGARASHI, I. Comparative evaluation of the sensitivity of LAMP, PCR and in vitro culture methods for the diagnosis of equine piroplasmosis. **Parasitology Research**, v.100, n.5, p.1165–1168, 2007.

ALSAAD, K.M. Acute babesiosis in foals. **Journal of Animal and Veterinay Advances**, v.8, n.12, p.2585-2589, 2009.

AYRES, M.; AYRES JR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. **BioEstat 5.0 - Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas**. Sociedade Civil Mamirauá, Tefé, 2007. 380p.

BALARIN, M.R.S.; LOPES, R.S.; KOHAYAGAWA, A.; LAPOSY, C.B.; FONTEQUE, J.H. Valores da Amplitude de Distribuição do Tamanho dos Eritrócitos (RDW) em equinos Puro Sangue Inglês (PSI) submetidos a exercícios de diferentes Intensidades. **Brazilian Journal Vetererinary Research animal Science**, v.43, n.5, p.637-641, 2006.

BARROS-BATTESTI, D.M.; ARZUA. M.; BECHARA, G.H. **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies**. 1ª ed. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan; 2006. 223p.

BASTOS, K.M.S.; DAEMON, E.; FACCINI, J.L.H.; CUNHA, D.W. Efeito de diferentes temperaturas sobre a fase não parasitária de *Dermacentor (Anocentor) nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.5, n.1, p.29-32, 1996.

BATTSETSEG, B.; LUCERO, S.; XUAN, X.; CLAVERIA, F. G.; INOUE, N.;ALHASSAN, A.; KANO, T.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; MIKAMI, T.; FUJISAKI, K. Detection of natural infection of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* with *Theileria equi* and *Babesia caballi* in Brazilian horses using nested polymerase chain reaction. **Veterinary Parasitology**, v.107, n.4, p.351-357, 2002.

BATTSETSEG, B.; XUAN, X.; IKADAI, H.; BAUTISTA, J. L.; BYAMBAA, B.; BOLDBAATAR, D.; BATTUR, B.; BATTSETSEG, G.; BATSUKH, Z.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; MIKAMI, T.; FUJISAKI, K. Detection of *Babesia caballi* e *Theileria equi* in *Dermacentor nuttalli* adults ticks. **Internacional Journal of Parasitology**, v.31, n.4, p. 384-386, 2001.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; MASSARD, C.A. Aspectos epidemiológicos da babesiose Equina na microrregião Fluminense do Grande Rio-Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.4, n.1, p.13-17, 1997.

BOLDBAATAR, D.; XUAN, X.; BATTSETSEG, B.; IGARASHI, I.; BATTUR, B.; BATSUKH, Z.; BAYAMBAA, B.; FUJISAKI, K. Epidemiological study of equine piroplasmosis in Mongolia. **Veterinary Parasitology**, v.127, n.1, p.29–32, 2005.

BORGES, L.M.F.; LEITE, R.C. Comparação entre as populações auriculares e nasais de *Dermacentor nitens* (Neumann, 1897) oriundas de equinos de Minas Gerais e Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.2, n. 2, p.109-110, 1993.

BORGES, L.M.F.; OLIVEIRA, P.R.; RIBEIRO, M.F.B. Seasonal dynamics of *Anocentor nitens* on horses in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.89, n.1, p.165-171, 2000.

BORGES, L.M.F.; OLIVEIRA, P.R.; RIBEIRO, M.F.B. Seasonal dynamics of the free-living phase of *Anocentor nitens* at Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.87, n.1, p.73-81, 1999.

BÖSE, R.; JORGENSEN, W. K.; DALGLIESH, R. J.; FRIEDHOFF, K. T. DE VOS, A. J. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Veterinary Parasitology**, v.57, n.1-3, p.61-74, 1995.

CAMACHO, A.T.; GUITIAN, F.J.; PALLAS, E.; GESTAL, J.J.; OLMEDA, A.S. HABELA, M.A.; TELFORD, S.R.; SPIELMAN, A. *Theileria (Babesia) equi* and *Babesia caballi* infections in horses in Galicia, Spain. **Tropical Animal Health and Production**, v.37, n.4, p.293-302, 2005.

COLES, E.H. **Patologia Clínica Veterinária**. 3ª ed., Manole, São Paulo, 1984, 566p.

CORDERO del CAMPILLO, M.; ALVAREZ, J.O.; VÁZQUEZ, F.A.R., DIAZ, A.E. Equine babesia infection in Spain. **Trabajos de la Estación Agrícola Experimental de León**, v.11, n.1, p.11-22, 1974.

COSTA, R.P.; MELLO, R.P. Nota prévia sobre a ocorrência de *Babesia caballi* (Nuttall, 1910) em *Equus caballus* no Brasil. **Veterinária**, v.16, p.74-75, 1963.

CUNHA, A.P.; BELLO, A.C.P.P.; LEITE, R.C.; RIBEIRO, A.C.C.L.; FREITAS, C.M.V.; BASTIANETTO, E.; OLIVEIRA, P.R. Efeito do controle estratégico de *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787) (Acari: Ixodidae) sobre a população de *Anocentor nitens* (NEUMANN, 1897) (ACARI: Ixodidae) em equinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.16, n.4, p.215-219, 2007.

DE WAAL DT, VAN HEERDEN J, POTGIETER FT. An investigation into the clinical pathological changes and serological response in horses experimentally infected with *Babesia equi* and *Babesia caballi*. **Onderstepoort Journal Veterinary**, v.54, n.4, p.561–568, 1987.

DE WAAL, D. T. AND VAN HEERDEN, J. **Equine babesiosis**. In: Infectious Diseases of Livestock with Special Reference to South Africa, Oxford University Press, p.295–304., Cape Town, 1994 apud RUEGG, S. R. ; HEINZMANN, D.; BARBOUR, A.D.; TORGERSON, P. R. Estimation of the transmission dynamics of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses. **Parasitology**, v.135, n.5, p.555–565, 2008.

DE WAAL, D. T. Equine Piroplasmiasis: a review. **British Veterinary Journal**, v.148, n.1, p. 6–14, 1992.

DE WAAL, D. T. The transovarial transmission of *Babesia caballi* by *Hyalomma truncatum*. **Onderstepoort. Journal of Veterinary Research**, v.57, n.1, p.99-100, 1990.

EASLEY, J.R. Erythrogram and red cell distribution width of equidae with experimentally induced anemia. **American Journal of Veterinary Research**, v.46, n.11, p.2378-2384, 1985.

FALCE, H. C. Infestações múltiplas por ixodídeos (Acari: Ixodidae) em bovinos e eqüídeos no primeiro planalto do Estado do Paraná. **Revista do Setor de Ciências Agrárias**, v.5, n.1-2, p.11-13, 1986.

FRIEDHOFF, K. T.; TENTER, A. M.; MULLER, I. Haemoparasites of equines: impact on international trade of horses. **Revue Scientifique et Technique Office International Epizootics**, v.9, n.4, p.1187-1194, 1990.

FRIEDHOFF, K.T.; SOULÉ, C. An account on equine babesiosis. **Revue Scientifique et Technique Office international Epizootics**, v.15, n.3, p.1191–1201, 1996.

GARBA, U.M.; SACEY, A.K.B.; AGBEDE, R.I.S.; TEKDEK, L.B.; BISALLA, M. Hemogram changes in nigerian royal horses with natural piroplasmosis. **Journal Indian Veterinary Association**, v.9, n.3, p.5-9, 2011.

GARCIA-BOCANEGRA, I.; ARENAS-MONTES, A.; HERNANDEZ, E.; ADASZEK, L.; CARBONERO, A.; ALMERIA, S.; JAEN-TELLEZ, J.A.; GUTIERREZ-PALOMINO, P.; ARENAS, A. Seroprevalence and risk factors associated with *Babesia caballi* and *Theileria equi* infection in equids. **The Veterinary Journal**, v.195, n.2, p.172-178, 2013.

HAILAT, N.Q; LAFI, S.Q; AL-DARRAJI, A.M.; AL-ANI, F.K. Equine babesiosis associated with strenuous exercise: clinical and pathological studies in Jordan. **Veterinary Parasitology**, v.69, n.1-2, p.1–8, 1997.

HEIM, A. PASSOS, L.M. F.; RIBEIRO, M. F. B.; COSTA-JÚNIOR, L.M.; BASTOS, C.V.; CABRAL, D.D.; HIRZMANN, J.; PFISTER, K. Detection and molecular characterization of *Babesia caballi* and *Theileria equi* isolates from endemic areas of Brazil. **Parasitology Research**, v.102, n.1, p.63-68, 2007.

HIRATO, K.; FRERICHS, W.M.; ALLEN, P.C. Studies on the complement fixation reaction for equine piroplasmosis, **Japan Journal Veterinary Science**, v.1, p. 204-207, 1945.

HOLBROOK, A.A. Biology of equine piroplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v.155, n.2, p.453-454, 1969.

HOLBROOK, A.A.; ANTHONY, D.W. ; JOHNSON, A. J. Observations on the Development of '*Babesia caballi* (Nuttall) in the Tropical Horse Tick *Dermacentor nitens* (Neumann) **Journal Protozoology**, v.15, n.2, p. 391-396, 1968.

HOMER, M.J.; AGUILAR-DELFIN, I.; TELFORD, S.R.; KRAUSE, P.J.; PERSING, D.H. Babesiosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, n.3, p. 451-469, 2000.

HOURRIGAN, J.L.; KNOWLES, R.C. Equine piroplasmosis (E.P.) **American Association of Equine Practitioners Newsletter**, v.1, p.119-128, 1979 apud RUEGG, S. R. ; HEINZMANN, D.; BARBOUR, A.D.; TORGERSON, P. R. Estimation of the transmission dynamics of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses. **Parasitology**, v.135, n.5, p.555–565, 2008.

IKADAI, H; NAGAI, A; XUAN, X.; IGARASHI, I.; KAMIO, T.; TSUJI, N., OYAMADA, T.; SUZUKI, N.; FUJISAKI, K. Seroepidemiologic Studies on *Babesia caballi* and *Babesia equi* Infections in Japan. **Journal Veterinary Medicine Science**, v.64, n.4, p.325-328, 2002.

JAIN, N.C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Editora Philadelphia, 1º Edição, 1993. 417p.

KARNAD, A.; POSKITT, T. R. The automated complete blood cell count – use of the red blood cell volume distribution width and mean platelet volume in evaluating anemia and thrombocytopenia. **Archives of Internal Medicine**. ,v. 145, n.7, p. 1270-1272, 1985 apud BALARIN, M.R.S.; LOPES, R.S.; KOHAYAGAWA, A.; LAPOSY, C.B.; FONTEQUE, J.H, Valores da Amplitude de Distribuição do Tamanho dos Eritrócitos (RDW) em equinos Puro Sangue Inglês (PSI) submetidos a exercícios de diferentes Intensidades. **Brazilian. Journal vetererinary Research animal Science**, v.43, n.5, p.637-641, 2006.

KERBER, C. E.; LABRUNA, M.B.; FERREIRA, F.; DE WAAL, D.T.; KNOWLES, D.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of equine Piroplasmosis and its association with tick infestation in the State of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, n.4, p.1-8, 2009.

KERBER, C.E.; FERREIRA, F.; PEREIRA, M.C. Control of equine Piroplasmosis in endemic countries. In: WORLD EQUINE VETERINARY CONGRESS, Padova, Itália, 1997.

KNOWLES, D.P. Equine babesiosis (Piroplasmosis): a problem in the international movement of horses. **British Veterinary Journal**, v. 52, n.2, p. 123-126, 1996.

LABRUNA, M.B.; KASAI, N.; FERREIRA, F.; FACCINI, J.L.H.; GENNARI, S.M. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.105, n.1, p.65-77, 2002.

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

LIMA, J.D., BIONDINI, J., REIS, R. Babesiose causada por *Babesia caballi* (Nuttal & Strickland, 1910) em um equino da raça Postier em Minas Gerais, Brasil. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, v.28, n.1, p.87-92, 1976.

LINHARES, G. F. C. **Aspectos biológicos e epidemiológicos das babesioses de eqüídeos, com ênfase à microrregião de Goiânia, Goiás, Brasil**. 1994. 105 p.Tese (Doutorado em Ciência) Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

LINHARES, G.F.C.; MASSARD, C.L.; ARAÚJO, J.L.B. Estudos sobre a epizootiologia de *Babesia caballi* (Nuttall; Strickland, 1910) na microrregião de Goiânia, Estado de Goiás. **Anais da Escola de Agronomia e Veterinária**, v.27, n.2, p.27-33, 1997.

KATZ, M.H. **Multivariate Analysis: A practical Guide for Clinicians**. 1ºed. Cambridge, Cambridge University, 1999. 192p.

MCLAUGHLIN, G.L. MONTENEGRO-JAMES, S.; VODKIN, M.H.; HOWE, D.; TORO, M.; LEON, E.; ARMIJOS, R.; KAKOMA, I.; GREENWOOD, B.M.; HASSAN-KING, M.;

MARICH, J.; RUTH, J.; JAMES, M.A. Molecular approaches to malaria and babesiosis diagnosis. **Memórias do Instituto Oswaldo**, v.87, sup.3, p.57-68, 1992.

MEHLHORN, H., SCHEIN, E. The piroplasma: life cycle and sexual stage. **Advance in Parasitology**, v.23, p.37-103, 1985.

MUJICA, F. F. L. *Babesia caballi* (Nuttall & Strickland, 1912), Patogenia, transmissão e alterações hemocitárias no carrapato *Anocentor nitens* (Neumann, 1897), vetor biológico nas Américas. 2002. 106p. Tese (Doutorado) – Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

NEITZ, W.O. Classification, transmission and biology of piroplasms of domestic animals. **Annals New York Academic Science**, v.64, n.2, p.56-111, 1956.

PFEIFER-BARBOSA, I.B.; BOSE, R.; PEYMANN, B.; FRIEDHOFF, K.T. Epidemiological aspects of equine babesioses in a herd of horses in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.58, n.1-2, p. 1-8, 1995.

PFEIFER-BARBOSA, I.B.; FRIEDHOFF, K.T.; MASSARD, C.L.; LINHARES, G.F.C. Diagnosis of natural infection with *Babesia caballi* (Nuttall & Strickland, 1910) in horses and *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) in Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v.15, n.1, p.105-107, 1992.

PFEIFER-BARBOSA, I.B.; MOLNAR, L.E.; DIAS TAVARES, H.L. Determination of the serological prevalence of equine babesioses by ifa test in the state of Pará, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.9, n.1, p.7-10, 2000.

POTGIETER, F.T.; WALL, D.T.; POSNETT, E.S. Transmission and diagnosis of equine babesiosis in South África. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.87, sup.3 p.139-142, 1992.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. 2009. ISBN 3-900051-07-0, Disponível em: <http://www.R-project.org>. Acesso em 31 de janeiro de 2010.

RAMPERSAD, J.; CESAR, E.; CAMPPELL, M.D.; SAMLAL, M.; AMMONS, D. A field evaluation of PCR for the routine detection of *Babesia equi* in horses. **Veterinary Parasitology**, v.114, n.2, p.81-87, 2003.

RIBEIRO, M.F.B.; SAITO, J.F.; PIMENTEL, P.V. Babesiose equina I – Primo-infecção de potros em área endêmica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.47, n.5, p.641-647, 1995.

RIEK, R.F. The life cycle of *Babesia argentina* (Lignieres, 1903)(Sporozoa: Piroplasmidae) in the tick vector *Boophilus microplus*(Canestrini). **Australian Journal of Agricultural Research**, v.17, p.247-254, 1966.

RISTIC, M. **Equine babesiosis and trypanosomiasis**. Michigan State University, 1985 apud DE WAAL, D. T. Equine Piroplasmosis: a review. **British Veterinary Journal**, v.148, n.1, p. 6-14, 1992.

ROBY, T.O.; ANTHONY, D.W. Transmission of equine piroplasmosis by *Dermacentor nitens* Neumann. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.142, p.768-769, 1963.

ROCHA, J.M.; COSTA, N.A.; VIEIRA FILHO, H.; ALENCAR, S.P. Diagnóstico da babesiose por *Babesia caballi* no Município de Garanhuns - PE. XXI Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Salvador. In: **Anais...CONBRAVET**: Salvador. p. 202, 1988.

RUBINO, G.; CITO, A. M.; LACINIO, R.; BRAMANTE, G.; CAROLI, A.; PIERAGOSTINI, E.; PETAZZIA, F. Hematology and Some Blood Chemical Parameters as a Function of Tick-Borne Disease (TBD) Signs in Horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.26, n.10, p.475-480, 2006.

RUEGG, S. R. ; HEINZMANN, D.; BARBOUR, A.D.; TORGERSON, P. R. Estimation of the transmission dynamics of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses. **Parasitology**, v.135, n.5, p.555–565, 2008.

RUEGG, S.R.; TORGERSON, P.R.; DEPLAZES, P.; MATHIS, A. Age-dependent dynamics of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in southwest Mongolia based on IFAT and/or PCR prevalence data from domestic horses and ticks. **Parasitology**, v.134, n.7, p.939–947, 2007.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2th ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2002.

SANAVRIA, A.; PRATA, M.C.A. Ensaio metodológico para estudo do ciclo biológico do *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae) em eqüinos experimentalmente infestados. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.5, n.2, p.91-93, 1996.

SCHALM, O.W.; WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. (eds.) **Veterinary Hematology**, 6th ed. Blackwell Publishing. Iowa, 2010. 1206p.

SCHEIN, E. Equine babesiosis. In : **Babesiosis of domestic animals and man**. M. Ristic. Boca Raton. CRC, Press, p. 197-208, 1988.

SIMPSON, C.F.; KIRKHAM, W.W; KLING, J.M. Comparative morphologic features of *Babesia caballi* and *Babesia equi*. **American Journal Veterinary Science**, v.28, n.127, p.1693-1697, 1967.

SOUZA, A.P; SERRA-FREIRE, N.M. Variação sazonal da fase não parasitária de *Amblyomma cajennense* e *Anocentor nitens* no município de Itaguaí, RJ: Avaliação epidemiológica e metodológica. **Revista Universidade Rural: Série Ciência vida** v.16, n.1-2, p. 67-74, 1994.

SOUZA, A.P; SERRA-FREIRE, N.M. Variação sazonal dos estádios adultos de *Amblyomma cajennense* e *Anocentor nitens*, como parasitas de cavalos, no município de Itaguaí, RJ, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**; v.1, n.1, p.31–34, 1992.

UILENBERG, G. *Babesia* - A historical overview. **Veterinary Parasitology**, v.138, n.1-2, p.3-10, 2006.

VASCONCELOS, M. F. **Estudo da infecção por *Babesia* spp. em cães da região periurbana de Brasília, Distrito Federal.** 2010. 85p. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal). Universidade de Brasília, Brasília.

XU, Y; ZHANG, S.; HUANG, X.; BAYING, C.; XUAN, X.; IGARASHI, I; FUJISAKI, K. KABEYA, H.; MARUYAMA, S. MIKAMI, T. Seroepidemiologic studies on *Babesia* equi and *Babesia caballe* infections in horses in Jilin province of China. **Journal Veterinary Medical Science**, v.65, n.9, p.1015–1017.

ZOBBA, R.; ARDU, M.; NICCOLINI, S.; CHESSA, B. MANNA, L. COCCO, R. PARGAGLIA, M.L.P. Clinical and Laboratory Findings in Equine Piroplasmosis. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.28, n.5, p.301-308, 2008.

## 8 CONCLUSÕES GERAIS

- 1) Ambas as microrregiões apresentam infestações nos equinos por carrapatos da espécie *A. cajennense* e *D. nitens*, em diferentes níveis. Contudo, foi possível observar que os equinos da microrregião de Itaguaí apresentaram maiores índices de infestação por estes carrapatos, demonstrando que esta microrregião possui condições mais favoráveis para o desenvolvimento destas populações de carrapatos.
- 2) A microrregião de Itaguaí apresentou muitas propriedades rurais de pequeno porte, com instalações inadequadas para criação dos equinos e um manejo zootécnico incorreto destes animais, fatores estes que contribuíram significativamente para a manutenção destas populações de carrapatos observadas nos animais do estudo.
- 3) A ausência de carrapatos positivos para rickettsias do grupo da febre maculosa não descarta a possível circulação destes agentes na própria população de carrapatos presentes nestas regiões estudadas, uma vez que foi possível observar a frequência de equinos soropositivos para RGFMB em ambas as microrregiões, em diferentes níveis. Este resultado demonstra a possibilidade da circulação destes agentes nestas regiões, tornando necessária uma vigilância epidemiológica constante, principalmente devido ao histórico de casos de FMB nestas áreas.
- 4) Sob o aspecto da transmissão de *B. caballi* aos equinos, os resultados apontam a necessidade de destacar o cuidado necessário em regiões com a circulação do agente e a presença de carrapatos vetores nestes animais, o que possibilita a ocorrência de casos agudos da doença nos equinos.

## **ANEXO**

Anexo I – Questionário epidemiológico

Anexo I – Questionário epidemiológico

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS  
QUESTIONÁRIO (AO RESPONSÁVEL PELOS ANIMAIS)

INFORMAÇÕES GERAIS SOBRE A PROPRIEDADE

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**1. Dados gerais:**

Nome da propriedade: \_\_\_\_\_

Município de localização: \_\_\_\_\_

Coordenadas : \_\_\_\_\_

**2. Área da propriedade**

Total: \_\_\_\_\_ ha ou \_\_\_\_\_ alqueires

**3. Localização dos animais**

( ) só em baias ( ) só em piquetes ( ) só pasto ( ) baias e piquetes

( ) baias e pasto ( ) baias, piquetes e pasto

**4. Possui equinos na mesma pastagem de outros animais que não sejam equinos?**

( ) Sim ( ) Não Quais ? \_\_\_\_\_

**5. Alimentação dos animais**

( ) capim ( ) feno ( ) ração

**6. Origem do capim**

( ) capineira ( ) pasto Outro: \_\_\_\_\_

**7. Cama das baias:**

( ) serragem ( ) areia e carvão ( ) nenhuma ( ) outro \_\_\_\_\_

**8. Principal forrageira do pasto:**

( ) Capim gordura ( ) Capim elefante ( ) Pangola ( ) Tifton ( ) *Coast cross*

( ) Napier ( ) Alfafa ( ) Capim nativo ( ) Outros: \_\_\_\_\_

**9. Características das áreas de pasto**

( ) seca ( ) poucas áreas alagadas ( ) muitas áreas alagas ( ) rios ( ) lagos

**10. Os animais apresentam infestações por carrapatos**

( ) sim ( ) não qual época do ano

Método de controle \_\_\_\_\_

**11. Usa produtos carrapaticidas?**

sim  não

**12. Se usa, com que frequência é ou são usado(s) o(s) produto(s)?**

2x/mês  1x/mês  3 a 4 x/ano  a cada 6 meses  1x/ano

outro: \_\_\_\_\_

**13. Tipo de equipamento utilizado para aplicação do carrapaticida?**

Banheiros  Bomba costal  Pour-on  Bomba mecânica

**14. Quantos animais você banha com 20 litros (volume de uma bomba costal) do carrapaticida diluído? \_\_\_\_\_**

**15. Como você escolhe a dose utilizada em cada animal ?**

Consulta o rótulo  Consulta o Veterinário  Consulta de outros criadores

Consulta os vendedores de lojas de produtos veterinários

outros \_\_\_\_\_

**16. Qual a procedência da água que é fornecida aos animais?**

Empresa de Água  Açude  Canalização de córregos e riachos

outra \_\_\_\_\_

**17. Número de divisões do pasto (piquetes): \_\_\_\_\_**

**18. Utiliza limpeza de pasto**

sim  não periodicidade: \_\_\_\_\_ método: \_\_\_\_\_

**19. Quem cuida do(s) animais?**

Veterinário:  Agrônomo  Zootecnista  Técnico agrícola  Outro

**20. Ha quanto tempo existe a criação? \_\_\_\_\_**

**21. Percentual de animais nascidos na propriedade \_\_\_\_\_**

**22. Abriga animais de outras propriedades?**

sim  não

Ficam em áreas separadas?

sim  não

**24. Qual a época mais propicia ao aparecimento de doenças?**

verão  outono  inverno  primavera

**25. Quais doenças já ocorreram na propriedade?**

Babesiose  Cólica  Diarréia  Aparelho Locomotor

outra \_\_\_\_\_

**26. Quais doenças consideram mais importantes \_\_\_\_\_**

---

**27. Qual o tratamento utilizado para as**

**doenças?** \_\_\_\_\_

**28. Quantos animais morreram nos últimos anos?** \_\_\_\_\_

**29. Caso tenha morrido, quais foram as causas?** \_\_\_\_\_

---

### INFORMAÇÕES SOBRE O ANIMAL

**Propriedade:** \_\_\_\_\_ **Região:** \_\_\_\_\_ **Data:** \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**1. Nome:** \_\_\_\_\_

**2. Sexo:** ( ) Macho ( ) Fêmea

**3. Idade:** \_\_\_\_\_

**4. Raça:** \_\_\_\_\_

**5. Origem do animal**

( ) nascido na propriedade ( ) externa Procedência \_\_\_\_\_

**6. Há quanto tempo o animal está na propriedade?**

( ) menos de 1 mês ( ) de 1 mês a seis meses ( ) acima de 6 meses

**7. Utilização do animal**

( ) Passeio ( ) Reprodução ( ) Esporte ( ) Exposição ( ) outra \_\_\_\_\_

**8. Alguma doença atual?**

( ) sim ( ) não Qual? \_\_\_\_\_

**9. Este animal está tomando algum medicamento ou tomou há pouco tempo?**

( ) Sim ( ) Não - Caso esteja, qual? ( ) Imizol ( ) Antibióticos Outros ( )

Quais? \_\_\_\_\_

**25. Este animal apresenta carrapatos?**

( ) sim ( ) não Qual/Quais? \_\_\_\_\_

Grau de infestação: \_\_\_\_\_ Espécie: \_\_\_\_\_

**26. Este animal apresenta outros parasitos?**

( ) sim ( ) não Qual/Quais? \_\_\_\_\_

Grau de infestação: \_\_\_\_\_