

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

**DISSERTAÇÃO**

**Diagnóstico sorológico de *Rickettsia* spp. e *Borrelia* spp.  
em cães no Município de Seropédica, Estado do Rio de  
Janeiro.**

**Matheus Dias Cordeiro**

**2012**



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

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE *Rickettsia* spp. E *Borrelia* spp. EM CÃES  
NO MUNICÍPIO DE SEROPÉDICA, ESTADO DO RIO DE JANEIRO.**

**MATHEUS DIAS CORDEIRO**

*Sob a Orientação da Professora*  
**Miliane Moreira Soares de Souza**

*e Co-orientação do Professor*  
**Aivaldo Henrique da Fonseca**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2012

636.7089696

C794d

T

Cordeiro, Matheus Dias, 1983-

Diagnóstico sorológico de *Rickettsia* spp. E *Borrelia* spp. Em cães no município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro / Matheus Dias Cordeiro - 2012.

71 f.: il.

Orientador: Miliane Moreira Soares de Souza.

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

Inclui bibliografia.

1. Cão - Doenças - Teses. 2. Cão - Doenças - Rio de Janeiro (Estado) - Teses. 3. *Rickettsioses* - Diagnóstico - Teses. 4. Febre recorrente - Diagnóstico - Teses. I. Souza, Miliane Moreira Soares de, 1970-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

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

MATHEUS DIAS CORDEIRO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Sanidade Animal.

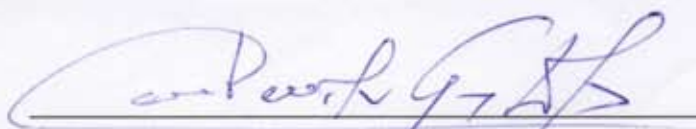
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 29/02/2012



Adivaldo Henrique da Fonseca, Ph.D. L.D. UFRRJ  
(Presidente da Banca)



Nathalie Costa da Cunha, Dr. FIOCRUZ



Carlos Wilson Gomes Lopes, Ph.D. L.D. UFRRJ

*Dedico este trabalho aos  
meus pais, Isa e Pedro, meus irmãos,  
à Daiana e minha filha, Lavigne, pelo apoio  
e o amor que nunca me faltaram.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a Deus, que me deu forças pra chegar aonde cheguei, e continua a me guiar para seguir firme.

À professora Miliane Moreira Soares de Souza, pela orientação e por acreditar em meu potencial para a realização deste trabalho.

Ao professor Adivaldo Henrique da Fonseca, pela amizade, ensinamentos e oportunidade de poder continuar crescendo profissionalmente.

Aos colegas de equipe e amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias da UFRRJ, Charles Passos Rangel, Rafaella Câmara Teixeira, Bruna de Azevedo Baêta, Carla Carolina Dias Uzedo Ribeiro, Jenevaldo Barbosa da Silva, Fabíola do Nascimento Corrêa, Antônio Amélia Mucalane Tembue, Fábio Jorge Moreira da Silva, Fábio Silva de Souza, Vanessa de Almeida Raia, Jania de Rezende, Gustavo Nunes de Santana Castro, Fabiano Soares da Silva, Ricardo de Oliveira Barbosa e Jaqueline de Almeida Valim pelo companheirismo, auxílio nas tarefas, discussão de idéias e sugestões.

Ao M.Cs.Vs. Celso Eduardo de Souza da SUCEN de Mogi Guaçu-SP, por disponibilizar seu laboratório e estar sempre à disposição em ajudar.

Ao Dr. Adriano Pinter da SUCEN-SP por correr atrás do controle positivo para a realização da PCR que será futuramente desenvolvida, e por ceder as lâminas de RIFI, fundamentais para desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Douglas McIntosh, pelos ensinamentos em Biologia Molecular, que mesmo não sendo usado nesta dissertação, serão para a vida inteira.

À Prof<sup>a</sup> Maylin Gonzalez Navarrete da Universidad Agraria de la Habana de Cuba pela amizade, convívio e por toda a ajuda.

A todos os funcionários da SUCEN de Mogi Guaçu, em especial, à Maria Benedito Belchior e Maria Regina de Jesus Eleutério, pela agradável maneira com que fui recebido, e à Mara Lúcia Menocci e Caroline Siqueira Franco por ter me ajudado no teste de RIFI.

Ao Setor de Vigilância Sanitária da Secretaria de Saúde da Prefeitura Municipal de Seropédica, por serem atenciosos ao prestar informações.

Aos amigos do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia, Fabrício do Nascimento Gaudêncio, Pedro Ivan Fázio Junior, Maria Clara da Silva Negreiros Botelho, Cássio do Nascimento Florêncio, por me ajudarem no hemograma dos animais.

Aos amigos do Laboratório de Protozoologia da UFRRJ, Joice Aparecida Rezende Villela, Cláudia Bezerra da Silva, Marcus Sandes Pires, Huarrisson Azevedo Santos, Aline

Falqueto Duarte pela amizade e coleta em conjunto.

Aos amigos do Laboratório de Coccídios e Coccidioses, em especial, Gisele dos Santos Meireles, Natália Mello Pereira da Silva e Dr. Walter Flausino pela ajuda no desenvolvimento e interpretação da técnica de Western Blotting.

À técnica do Laboratório de Biologia Molecular, Tássia Furtado pela ajuda prestada.

À Prof. Marília Massard da Fonseca, por nos receber tão bem nas “reuniões” do LDP em sua casa.

À todos os meus amigos que não participaram deste trabalho, mas que sempre torceram por mim.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, pela amizade e convívio.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, pelos ensinamentos e conselhos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro.

Aos proprietários que permitiram que entrássemos em suas casas para a realização do trabalho.

Aos animais que participaram deste estudo, sem os quais nada disso teria sido possível, meu profundo respeito e gratidão.

## BIOGRAFIA

**MATHEUS DIAS CORDEIRO**, filho de **Pedro Dias Moreira** e **Isa Cordeiro Pires Moreira**, natural da cidade de Carangola, MG.

Cursou o Ensino Fundamental na Escola Estadual Mello Viana da Cidade de Divino, MG. Ingressou o Ensino Médio nível técnico no ano 2000, na Escola Agrotécnica Federal de Rio Pomba, atual IFET-Sudeste *campus* Rio Pomba, sendo diplomado como Técnico Agrícola em Agropecuária no ano de 2002.

Em 22 de Novembro de 2004, ingressou no Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, graduando-se Médico Veterinário no dia 5 de Setembro de 2009.

Durante a graduação, realizou estágios em diversas áreas da Medicina Veterinária, integrando-se como estagiário do Laboratório de Doenças Parasitárias em Outubro de 2006, onde foi bolsista de Iniciação Científica–CNPq, no período de 2007 a 2009.

Em março de 2010, ingressou no Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias área de concentração Sanidade Animal, sendo bolsista do CNPq.

E nesta data, apresenta e defende esta dissertação como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Ciências.



## RESUMO

CORDEIRO, Matheus Dias. **Diagnóstico sorológico de *Rickettsia* spp. e *Borrelia* spp. em cães no Município de Seropédica, RJ.** 2012. 60p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

A Febre Maculosa Brasileira e a Síndrome de Baggio-Yoshinari são enfermidades emergentes, caracterizadas como as únicas zoonoses conhecidamente transmitidas por carrapatos, no Brasil. O presente estudo teve como objetivo detectar anticorpos da classe IgG contra *Rickettsia rickettsii* e *Borrelia burgdorferi* e estudar a fauna de Ixodídeos nesses animais. Para investigar a prevalência de anticorpos contra *R. rickettsii* e *B. burgdorferi* foi efetuada a coleta de sangue de 293 cães, em quatro áreas do município de Seropédica-RJ. Os soros obtidos foram processados através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), contra antígenos brutos de *R. rickettsii*. Os mesmos animais foram submetidos à pesquisa de anticorpos homólogos da classe IgG contra *B. burgdorferi* cepa americana G39/40, utilizando o Ensaio de Imunoadsorção Enzimático (ELISA) Indireto. Para confirmação da presença de *Borrelia* spp. no município, 102 amostras positivas foram testadas pelo Western Blotting (WB). A fauna de ixodídeos foi estudada através da coleta de carrapatos a partir da inspeção das regiões das orelhas, dorso e coxins palmares e plantares dos animais. Os espécimes encontrados foram removidos manualmente e acondicionados em frascos de polipropileno, e posteriormente, identificados. O estudo da associação entre animais soropositivos e as variáveis avaliadas, foram realizados por meio do teste de Qui-quadrado e Análise de Variância (ANOVA), com nível de significância de 5%. Dos 283 soros testados à RIFI, 23,67% (67/283) apresentaram reatividade contra antígenos espécie-específico de *R. rickettsii*, sendo encontrada uma frequência de 21,11% (19/90) no “Km 40”, 21,84% (19/87) no “Km 49”, 25% (8/32) no “Km 54” e 28,38% (21/74) no *campus* da UFRRJ. A titulação variou entre 1:64 à 1:512. Por outro lado, dos 293 animais estudados, 154 (52,56%) foram positivos para anticorpos homólogos anti-*B. burgdorferi*, sendo encontrada uma frequência de 43,75% (14/32) no “Km 54”, 51,72% (45/87) no “Km 49”, 46,67% (42/90) no “Km 40” e 63,1% (53/84) na UFRRJ. Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as prevalências de anticorpos contra *Borrelia* spp. encontradas em caninos errantes e domiciliados. Os cães com acesso a rua tiveram uma frequência de anticorpos contra *R. rickettsii* significativamente ( $p < 0,05$ ) maior que animais mantidos preso. Não foram observadas diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ) entre a relação das variáveis: presença de carrapatos, sexo dos animais, hábitos de frequentar pastos e idade dos animais com a soropositividade observada em nenhuma das duas espécies. Quanto aos carrapatos, 64,5% (189/293) dos cães estavam infestados por carrapatos no momento da coleta. Apenas duas espécies de carrapatos foram identificadas, *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma cajennense*. A presença de anticorpos homólogos anti-*R. rickettsii* e anti-*B. burgdorferi* em caninos de Seropédica-RJ é um indicativo da presença de rickettsia do grupo da Febre Maculosa e espiroquetas em cães nesta área.

**Palavras chave:** *Rickettsioses, ixodídeo, caninos, borreliose*

## ABSTRACT

CORDEIRO, Matheus Dias. **Serological diagnosis of *Rickettsia* spp. and *Borrelia* spp. in dogs in the Municipality of Seropédica, RJ.** 2012. 60p. Dissertation (Master in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Brazilian Spotted Fever and Baggio-Yoshinari Syndrome are emerging diseases characterized as the only known tick-borne zoonoses in Brazil. This study aimed to evaluate IgG antibodies against *Borrelia burgdorferi* and *Rickettsia rickettsii* in stray and domiciled dogs from Seropédica-RJ and studying the fauna of ixodida these animals. To investigate the prevalence of antibodies against *R. rickettsii* and *B. burgdorferi* was performed to collect blood from 293 dogs in four areas of the city of Seropédica-RJ. Serum samples were processed by Indirect Immunofluorescence (IFA) against crude antigens of *R. rickettsii*. The same animals were tested for IgG antibodies against *B. burgdorferi* strain of North American origin, using the Indirect Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). To confirm the presence of *Borrelia* spp., 102 positive samples were tested by Western Blotting (WB). Ticks were also collected from the inspection of the animals. The specimens found were manually removed and stored in polypropylene bottles, and later identified. The association between seropositive animals and variables, were performed using the chi-square and analysis of variance (ANOVA) with significance level of 5%. Of the 283 sera tested by IFA, 23.67% (67/283) showed reactivity against species-specific antigens of *R. rickettsii*. Thus, we found a prevalence of 21.11% (19/90) in "40 km", 21.84% (19/87) in "Km 49", 25% (8 / 32) in "54 km" and 28.38% (21/74) in UFRRJ. The titles ranged from 1:64 to 1:512. On the other hand, of the 293 animals studied, 154 (52.56%) were positive for homologous antibodies anti-*B. burgdorferi*. It was founded a prevalence of 43.75% (14/32) in the "54 km", 51.72% (45/87) in the "49 km", 46.67% (42/90) in the "40 km" and 63.1% (53/84) in UFRRJ. It was no significant difference ( $p < 0.05$ ) between the prevalence of antibodies against *Borrelia* sp. in stray dogs and domiciled. Dogs with access to the street had a frequency against *R. rickettsii* significantly ( $p < 0.05$ ) greater than animals kept in prison. There were no statistical differences ( $p > 0.05$ ) the relationship between the variables: presence of ticks, animal sex, habits, frequenting pastures and age of the animals with seropositivity observed in either species. Regarding ticks, at least 64.5% (189/293) dogs were infested with ticks at the moment of collection. Only two species of ticks were identified, *Rhipicephalus sanguineus* and *Amblyomma cajennense*. The presence of antibodies anti-*R. rickettsii* and anti-*B. burgdorferi* in dogs from Seropédica-RJ is indicative of the presence of rickettsias of the Rock Mountain Spotted Fever Group and spirochetes dogs in this area.

**Key words:** *Rickettsiosis*, *ixodida*, *dogs*

## SUMÁRIO

Pág.

INTRODUÇÃO GERAL .....	1
------------------------	---

### CAPÍTULO I – PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS PARA *Rickettsia* spp. EM CÃES NO MUNICÍPIO DE SEROPÉDICA, ESTADO DO RIO DE JANEIRO.

1 RESUMO .....	3
2 ABSTRACT .....	4
3 INTRODUÇÃO.....	5
4 REVISÃO DE LITERATURA .....	6
4.1 Rickettsias do Grupo da Febre Maculosa e seus vetores.....	6
4.2 Diagnóstico das rickettsioses.....	7
4.3 Hospedeiros, reservatórios e amplificadores.....	8
4.4 Cães como sentinelas para Febre Maculosa Brasileira.....	10
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
5.1 Local do estudo.....	12
5.2 Amostragem e delineamento de estudo .....	12
5.3 Coleta dos soros.....	16
5.4 Perfil dos animais.....	16
5.5 Coleta e identificação dos carrapatos.....	17
5.6 Reação de imunofluorescência indireta.....	17
5.7 Análise estatística.....	18
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	19
7 CONCLUSÕES.....	24
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	25

### CAPÍTULO II - SOROPREVALÊNCIA PARA *Borrelia* spp., EM CANINOS DO MUNICÍPIO DE SEROPÉDICA, ESTADO DO RIO DE JANEIRO

1 RESUMO .....	34
2 ABSTRACT .....	35
3 INTRODUÇÃO.....	36

4 REVISÃO DA LITERATURA.....	37
4.1 Características gerais do gênero <i>Borrelia</i> .....	37
4.2 Vetores, Hospedeiros e Reservatórios.....	37
4.3 Diagnóstico de borreliose.....	38
4.4 Borreliose em animais.....	39
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
5.1 Amostragem e Delineamento do Estudo.....	40
5.2 Coleta dos soros.....	40
5.3 Ensaio de Imunoadsorção Enzimático (ELISA).....	40
5.4 Padronização do Western Blotting.....	41
5.5 Análise estatística.....	42
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
7 CONCLUSÕES.....	47
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
CONCLUSÕES GERAIS.....	54
ANEXOS.....	55

## INTRODUÇÃO GERAL

Depois dos mosquitos, carrapatos hematófagos estão em segundo lugar como fonte de transmissão de patógenos aos seres humanos, mas estão em primeiro lugar como fonte de transmissão de patógenos para os animais. Um longo período de íntima associação com o hospedeiro é apontado como componente mais importante da sua competência vetorial. Muitos patógenos virais, bacterianos e parasitários têm sido associados com a transmissão por carrapatos. A importante disseminação de patógenos por uma maior mobilidade das populações humanas e seus animais de companhia, combinada com mudanças nos ecossistemas favoráveis para a sobrevivência de ectoparasitos, levaram ao reconhecimento de doenças transmitidas por carrapatos em áreas normalmente consideradas como livre dessas infecções.

A Febre Maculosa Brasileira e a Síndrome de Baggio-Yoshinari são enfermidades emergentes caracterizadas como as únicas zoonoses conhecidamente transmitidas por carrapatos no Brasil

Neste contexto, a presente dissertação foi desenvolvida em dois capítulos. O primeiro capítulo trata-se de um inquérito soro-epidemiológico de *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da Febre Maculosa, em caninos, utilizando um teste padrão para essa enfermidade (imunofluorescência indireta). Este inquérito foi realizado no município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, onde fica situada a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Recentemente, no ano de 2008, houve um caso de Febre Maculosa que culminou em óbito de um dos estudantes desta universidade, caso este confirmado pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

O segundo capítulo refere-se à um estudo sorológico de *Borrelia* spp., o agente etiológico da Síndrome de Baggio-Yoshinari, em cães da cidade de Seropédica, utilizando Ensaio de imunoabsorção enzimática como diagnóstico e Western Blotting como um ensaio confirmatório. Para a realização destas técnicas, foram usados antígenos bruto de *Borrelia burgdorferi* cepa G39/40, causador da Doença de Lyme nos EUA.

## **CAPÍTULO I**

### **PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS PARA *Rickettsia* spp. EM CANINOS NO MUNICÍPIO DE SEROPÉDICA, ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

## 1 RESUMO

O gênero *Rickettsia* reúne bactérias Gram-negativas, estritamente intracelulares e transmitidas a humanos e animais pela picada de artrópodes hematófagos. Os cães são considerados importantes sentinelas da Febre Maculosa por serem parasitados por seus principais reservatórios, os carrapatos. O objetivo do presente estudo foi verificar a ocorrência de cães reativos sorologicamente contra *Rickettsia rickettsii*, utilizando a técnica de reação de imunofluorescência indireta (RIFI), e estudar a fauna de carrapatos ixodídeos nesses animais, no Município de Seropédica-RJ. Para investigar a prevalência de anticorpos contra *R. rickettsii* foi efetuada a coleta de sangue de 293 cães, em quatro áreas do município de Seropédica-RJ (Km 54, Km 49, Km 40 e UFRRJ). Dos 283 soros testados à RIFI, 23,67% (67/283) apresentaram reatividade contra antígenos espécie-específico de *R. rickettsii*. Desta forma, foi encontrada uma frequência de 25% (8/32) no “Km 54”, 21,84% (19/87) no “Km 49”, 21,11% (19/90) no “Km 40” e 28,38% (21/74) na UFRRJ. A titulação variou entre 1:64 à 1:512. Quanto aos carrapatos, 64,5% (189/293) dos cães coletados, estavam infestados por carrapatos no momento da coleta. Foram identificadas duas espécies de carrapatos, *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma cajennense*. Não foram observadas diferenças estatísticas entre a relação das variáveis: presença de carrapatos, sexo dos animais, hábitos de frequentar pastos, acesso à rua e idade dos animais com a soropositividade observada. A presença de anticorpos contra *R. rickettsii* em cães no município de Seropédica, RJ mesmo que em baixos títulos, sugere a circulação de rickettsias do grupo da Febre Maculosa neste local, devendo ser melhor estudada.

## 2 ABSTRACT

Brazilian spotted fever (BSF), which is caused by tick-borne *Rickettsia rickettsii*, is the most important and frequently reported rickettsial disease in Brazil. The dogs have been identified as potential sentinels for numerous diseases that also affect people. This study aimed to evaluate IgG antibodies against *Rickettsia rickettsii* in stray and domiciled dogs from Seropédica-RJ and studying the fauna of ixodid ticks on these animals. To investigate the prevalence of antibodies against *R. rickettsii*, a study was performed to collect blood from 293 dogs from Seropédica-RJ. Canine sera were tested by the indirect immunofluorescence assay (IFA), using crude antigens of *R. rickettsii*. Ticks were also collected through inspection of the animals. The specimens found were manually removed and stored in polypropylene bottles and later identified. The association between seropositive animals and variables, were performed using the chi-square and analysis of variance (ANOVA) with significance level of 5%. Of the 283 sera tested by IFA, 23.67% (67/283) showed reactivity against species-specific antigens of *R. rickettsii*. Thus, we found a prevalence of 21.11% (19/90) in "40 km", 21.84% (19/87) in "Km 49", 25% (8 / 32) in "54 km" and 28.38% (21/74) in UFRRJ. The titres ranged from 1:64 to 1:512. Dogs with access to the street had a frequency of antibodies to *R. rickettsii* significantly ( $p < 0.05$ ) greater than animals kept in prison. There were no statistical differences ( $p > 0.05$ ) the relationship between the variables: presence of ticks, animal sex, frequenting pastures and age of the animals with seropositivity. Regarding ticks, at least 64.5% (189/293) dogs were infested with ticks at the moment of collection. Only two species of ticks were identified, *Rhipicephalus sanguineus* and *Amblyomma cajennense*. The presence of antibodies anti-*R. rickettsii* in dogs from Seropédica-RJ is indicative of the presence of rickettsias of the Rock Mountain Spotted Fever Group in dogs in this area.



### 3 INTRODUÇÃO

A Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (Rocky Mountain Spotted Fever) é uma zoonose altamente letal para humanos causada pela bactéria *Rickettsia rickettsii*, foi descrita nos Estados Unidos por Howard Taylor Ricketts em 1909, quando isolou pela primeira vez o agente etiológico (RICKETTS, 1909). No Brasil, a enfermidade foi descrita na década de 20, sendo chamada de “Tifo exantemático”, anos depois passou a ser denominada de Febre Maculosa Brasileira (FMB), devido à semelhanças com a doença relatada nos Estados Unidos da América (EUA). Considerada como uma doença de notificação obrigatória desde 2001, a FMB é transmitida para o homem por carrapatos, principalmente do gênero *Amblyomma*, destacando-se no Brasil a espécie *Amblyomma cajennense* (DIAS; MARTINS, 1939; TAVARES; MARINHO, 2005).

O gênero *Rickettsia*, pertencentes à família Rickettsiaceae, reúne diferentes espécies de bactérias GRAM-negativas, pleomórficas, intracelulares obrigatórias, com curta viabilidade fora dos seus hospedeiros e de difícil cultivo em laboratório. Estes organismos se reproduzem em células nucleadas, principalmente células endoteliais, e se proliferam facilmente, ocasionando vasculite multissistêmica em pequenas artérias, veias e capilares (LA SCOLA; RAOULT, 1997).

Assim como os equinos, os caninos também podem ser parasitados por *A. cajennense*, estes hospedeiros são importantes sentinelas para vigilância de FM, devendo existir um programa de análise sorológica desses animais em áreas onde humanos têm potencial de serem parasitados por essa espécie de carrapato (LABRUNA et al., 2002).

No Estado do Rio de Janeiro, já foram notificados alguns casos de FMB. Dentre eles, foi confirmado pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), no município de Seropédica, no *Campus* da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), aonde uma estudante veio a óbito em 2008. Desde então, ocorreram casos suspeitos relacionados com o histórico de picadas de carrapatos após passeio no entorno de um dos lagos da Universidade, o Lago Açú, onde há mais de sete anos vive uma família de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*).

Neste contexto, visando ampliar o conhecimento epidemiológico referentes à FMB, seus agentes e vetores, o presente estudo teve como objetivo: verificar a ocorrência de caninos reativos sorologicamente à *R. rickettsii* através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) no município de Seropédica; avaliar o potencial dos caninos do município como sentinelas de um possível foco de ocorrência para a FMB e estudar a fauna de ixodídeos.

## 4 REVISÃO DA LITERATURA

### 4.1 Rickettsias do Grupo da Febre Maculosa e seus vetores

As riquetsioses são doenças causadas por bactérias da ordem Rickettsiales, família Rickettsiaceae, constituída pelos gêneros *Rickettsia* e *Orientia* (GALVÃO et al., 2005).

As espécies de *Rickettsia* são classificadas em três grupos, baseando-se em padrões antigênicos, morfológicos, moleculares e ecológicos: o Grupo Ancestral (GA) compreende as espécies *R. belli* e *R. canadensis*; o Grupo Tifo (GT) compreende as espécies *R. prowazekii* e *R. typhi*, associadas primariamente com piolhos e pulgas, respectivamente; e o Grupo da Febre Maculosa (GFM), composto por mais de 20 espécies, estando a grande maioria associada primariamente a carrapatos (GALVÃO et al., 2005; FUXELIUS et al., 2007). *R. felis* e *R. akari*, que estão associadas com pulgas e ácaros gamasida, respectivamente, pertencem atualmente ao Grupo de Transição (GTR) (FUXELIUS et al., 2007). Todos os membros do gênero *Rickettsia* são parasitas obrigatórios do interior dos eucariotos, com algumas espécies que são patogênicas e são conhecidas por causar doenças em seres humanos, como por exemplo, *R. prowazekii*, o agente causador da tifo epidêmico e *R. rickettsii*, o agente da FM. Algumas rickettsias são importantes tanto como patógenos emergentes, assim como agentes selecionados para o desenvolvimento de armas biológicas (GILLESPIE et al., 2007).

As espécies do GFM parecem estar associadas à distribuição geográfica de seus vetores, pelo menos 10 das espécies pertencentes ao GFM e GTR causam doenças ao homem em diferentes regiões geográficas: *R. rickettsii* nas Américas do Norte e do Sul, *R. conorii* no sul da Europa, Ásia e África, *R. africae*, na África, *R. australis*, na Austrália, *R. honei*, na Oceania, *R. sibirica*, no norte da Ásia, *R. japonica*, no Japão, *R. akari*, nos EUA e na Ásia, *R. felis*, recentemente descrita nos EUA, México, Brasil, França e Alemanha (RAOULT; ROUX, 1997) e *R. parkeri*, descrita no EUA, Uruguai e Brasil (VENZAL et al., 2004; SILVEIRA et al., 2007).

Dentro do GFM, destaca-se *R. rickettsii* como a mais importante e mais patogênica, sendo frequentemente relatada no Brasil, com ocorrências nos estados do Rio de Janeiro (LEMONS et al., 2002; ROZENTAL et al., 2006; LAMAS et al., 2008), São Paulo (LEMONS et al., 2001; LIMA et al., 2003; ANGERAMI et al., 2006), Minas gerais (DA COSTA et al., 2002; GALVÃO et al., 2003a; GALVÃO et al., 2003b; GALVÃO et al., 2006; AMÂNCIO et al., 2011), Espírito Santo e em outras regiões do Brasil (MANCINI et al., 1983). Os principais carrapatos vetores de *R. rickettsii* nos EUA são do gênero *Dermacentor* (*D. andersoni* e *D. variabilis*) (AZAD; BEARD, 1998; NIEBILSKY et al., 1999), enquanto que, no Brasil são do gênero *Amblyomma*, principalmente as espécies *A. cajennense* e *A. aureolatum* conhecidos como “Carrapato Estrela” e “Carrapato Amarelo do cão”, respectivamente (LABRUNA et al., 2004b). Ainda podem estar associados à FMB, *A. dubitatum* (SÁ DEL FIOLE et al., 2010) e *Rhipicephalus sanguineus* comumente conhecido como “Carrapato Marrom do cão”, um carrapato específico do cão em área urbana, porém no Brasil já foi encontrado parasitando aves (SZABÓ et al., 2008) e humanos (DANTAS-TORRES et al., 2006), e recentemente esta espécie já foi encontrada infectada por *R. rickettsii* (CUNHA et al., 2009; MORAES-FILHO et al., 2009).

*Rickettsia felis* foi descrita em humanos no ano de 2001, no Estado de Minas Gerais, a partir da confirmação por métodos sorológicos e da detecção por biologia molecular no vetor (RAOULT et al., 2001). O vetor é a pulga do gênero *Ctenocephalides*, porém esta rickettsia já foi detectada também em carrapatos, *R. sanguineus* (CARDOSO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008) e *Amblyomma* spp. (HORTA, 2002; CARDOSO et al., 2006), entretanto, não se

sabe exatamente se existe uma efetiva participação dos carrapatos no ciclo da *R. felis* nas regiões estudadas. A interação entre essa bactéria e o carrapato, além da comprovação da capacidade e competência vetorial, precisam ser melhor estudadas (HORTA, 2006). Essa rickettsia ainda não foi isolada de humanos (GALVÃO et al., 2005).

*Rickettsia parkeri* foi isolada pela primeira vez nos EUA no ano de 1937 de um *A. maculatum* coletado de bovino, sendo inicialmente tratada como não patogênica (PADDOCK, 2005). Na América do sul foi isolada pela primeira vez no Uruguai em *A. triste* por Venzal et al. (2004), segundo os autores existe uma associação epidemiológica desse achado com um caso relatado de rickettsiose humana (VENZAL et al., 2004). No Brasil existem apenas suspeitas de casos de Febre Maculosa causada por *R. parkeri* (PADDOCK, 2005; SPOLIDORIO et al., 2010), embora esta bactéria já tenha sido detectada e isolada, de *A. triste* (SILVEIRA et al., 2007) e *A. nodosum* (OGRZEWALSKA et al., 2009).

No GFM, a maior parte das riquetsias é considerada apatogênica, por ainda não terem sido isoladas de humanos. As riquetsias ditas apatogênicas poderiam induzir quadros atípicos e passar despercebidas, sem diagnóstico clínico ou laboratorial (GALVÃO et al., 2005). No entanto, aquelas espécies consideradas não patogênicas podem apresentar um papel fundamental na história natural de espécies patogênicas, pois uma vez que um carrapato esteja infectado por uma espécie não patogênica, ele se torna incapaz de se infectar e transmitir uma espécie patogênica (MACALUSO et al., 2002). Este fato é de grande importância prática, pois muitas populações de carrapatos estão infectadas com riquetsias não patogênicas em taxas de infecção muitas vezes maiores do que as taxas de infecção por riquetsias patogênicas (LABRUNA et al., 2004a; PINTER; LABRUNA, 2006). As rickettsias consideradas não patogênicas no Brasil são: *R. rhipicephalii*, detectada e isolada de *Haemaphysalis juxtakochi* (LABRUNA et al., 2005; LABRUNA et al., 2007b), *R. amblyommii* detectada e isolada de *A. cajennense* e *A. coelebs* as duas rickettsias do GFM; e *R. belli* do GA sendo a mais prevalente, foi isolada e detectada de *A. scalpturatum*, *A. humerale*, *A. rotundatum*, *A. oblongoguttatum*, *H. juxtakochi*, *A. dubitatum*, *A. cajennense*, *A. aureolatum*, *Ixodes loricatus* (LABRUNA et al., 2004c; ESTRADA et al., 2006; PINTER; LABRUNA, 2006; LABRUNA et al., 2007b; HORTA et al., 2007; LABRUNA, 2009).

#### 4.2 Diagnóstico das rickettsioses

O diagnóstico mais recomendado é o baseado em características clínicas e epidemiológicas individuais, pois o tratamento deve ser recomendado de imediato e não após esperar o resultado de exames. Porém o diagnóstico baseado em teste sorológico é um método prático e específico para confirmação de FM (CHEN; SEXTON 2008).

O teste considerado padrão ouro para diagnóstico das rickettsioses, recomendado pela OMS, é a Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) que utiliza antígenos espécie-específicos de *Rickettsia* (GALVÃO et al., 2005). Porém a RIFI não consegue distinguir infecções entre rickettsias, devido à existência de reações heterólogas entre as diferentes espécies de bactérias do GFM. Outros ensaios sorológicos, tal como Ensaio de imunoadsorção enzimático (ELISA), Fixação de Complemento e Teste de aglutinação, também apresentam resultados de reação cruzada com outros membros do GFM (CHEN; SEXTON, 2008). Essa inespecificidade na distinção entre *R. rickettsii* e outras rickettsias do grupo da febre maculosa, faz com que os inquéritos sorológicos sejam um instrumento limitado na identificação de áreas de risco para febre maculosa. O grande número de rickettsias não patogênicas dentro desse grupo contribui para essa limitação (GALVÃO et al., 2004). Para um diagnóstico sorológico mais específico é recomendado o uso das técnicas sorológicas testando o soro contra todas as espécies de rickettsia presente em uma certa área (LA SCOLA; RAOULT, 1997; PAROLA et al., 2005).

A técnica de Western Blott é considerada mais sensível do que a RIFI, pois detecta anticorpos IgM precocemente e teoricamente é mais específica, também pode ser usada como importante ferramenta para estudos de soroprevalência e confirmação de resultados, especialmente se empregada com anticorpos monoclonais para determinadas espécies de riquetsias (LA SCOLA E RAOULT, 1997; GALVÃO et al, 2005).

O teste Weil-Felix foi o primeiro ensaio a ser usado, é um método de diagnóstico de baixa sensibilidade e especificidade, baseado na detecção de anticorpos, utilizando como antígeno várias espécies do gênero *Proteus* que fazem reação cruzada com organismos do gênero *Rickettsia*, (LA SCOLA; RAOULT, 1997; CHEN; SEXTON, 2008; RAOULT; ROUX, 1997).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem contribuído para identificação em carrapatos de rickettsias do GFM (GUEDES et al, 2005; LABRUNA et al, 2004b; EREMEEVA et al., 1994; GALVÃO et al., 2003a; LABRUNA et al, 2004c; SANGIONI et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2005). Os artrópodes servem como ferramentas epidemiológicas para detectar a presença, através da PCR, de determinado patógeno numa área específica (PAROLA; RAOULT, 2001).

Novas espécies têm sido identificadas em diversos países em anos recentes, em grande parte graças ao maior poder discriminatório dos métodos de biologia molecular. As manifestações clínicas dessas infecções são muito semelhantes e superpostas, dificultando com isto o diagnóstico etiológico. Até recentemente, os recursos laboratoriais disponíveis não permitiam discriminar com precisão as diferentes espécies. Mesmo o cultivo *in vitro* das riquetsias, não acessível à maioria dos laboratórios, não permite essa discriminação, uma vez que as características morfológicas e bioquímicas das diferentes espécies são virtualmente idênticas (GALVÃO et al., 2005).

A detecção de rickettsias em sangue total raramente ocorre, já que uma vez infectado, os vertebrados apresentam uma rickettsemia por apenas alguns dias ou semanas, e depois disso ela não é encontrada mais no sangue total (BURGDORFER, 1988). Além disso, *Rickettsia* spp. infectam células endoteliais de vertebrados, sendo assim encontrada em baixa concentração no sangue, por isso incapaz de ser detectada por análises moleculares (LA SCOLA; RAOULT 1997).

O diagnóstico direto também pode ser feito através da reação de imunofluorescência direta (RIFD), teste da hemolinfa, isolamento do agente em cultura de células, inoculação em animais e ovos embrionados, imunohistoquímica e genotipagem (SPENCER; PARKER, 1923; MELLES et al., 1992; ROZENTAL et al., 2002; EREMEEVA et al., 2004; GALVÃO et al., 2005; ELLISON et al., 2008).

### 4.3 Hospedeiros, reservatórios e amplificadores

No geral, considera-se como vetor o hospedeiro intermediário, enquanto um reservatório seria o hospedeiro no qual o parasita teria uma fase do ciclo de vida essencial para sua manutenção na natureza. No caso das rickettsias, os carrapatos ixodídeos podem atuar como vetores, reservatórios ou amplificadores de rickettsias do GFM (BACELLAR, 1996; PAROLA et al., 2005). Geralmente, adquirem a bactéria durante o repasto sanguíneo no período de rickettsemia dos hospedeiros vertebrados ou através da transmissão transovariana e perpetuação transtadial (BURGDORFER; BRINTON, 1975, NIEBYLSKI et al., 1999).

Múltiplos fatores podem influenciar a manutenção da *R. rickettsii* na natureza. Apesar das rickettsias serem mantidas na natureza por meio de artrópodes vetores, elas frequentemente infectam vertebrados, que por sua vez permitem que novas linhagens de vetores adquiram a infecção através de hospedeiros rickettsêmicos (AZAD; BEARD, 1998). Alguns autores consideram que a associação de bactérias da família Rickettsiaceae com

invertebrados seria evolutivamente mais antiga, pois os artrópodes, a exceção do piolho, não apresentam patologias evidentes associadas à infecção por estes microrganismos atuando, portanto, como vetores ou hospedeiros primários (HOOGSTRAAL, 1967). Porém a principal causa da baixa taxa de carrapatos infectados por *R. rickettsii* é a patogenicidade conferida aos carrapatos (BURGDORFER; BRINTON, 1975; NIEBYSLKY et al., 1999; LABRUNA et al., 2008). Assim, mesmo sendo os principais reservatórios de *R. rickettsii* na natureza, a patogenicidade para os carrapatos impede que sua estabilidade enzoótica ocorra apenas por transmissão transovariana e perpetuação transtadial. Neste caso, a participação de amplificadores (animais vertebrados que desenvolvem uma rickettsemia em alguns dias) é crucial, quando novos carrapatos não infectados tornam-se infectados e iniciam novas linhagens de carrapatos infectados dentro de uma população de carrapatos (LABRUNA, 2009).

O envolvimento de vertebrados, incluindo seres humanos, no ciclo de riquetsias é variável e, em alguns casos, complexo. Com exceção do tifo epidêmico, os seres humanos não são essenciais no ciclo de rickettsias (HOOGSTRAAL, 1967). Os seres humanos adquirem a infecção por rickettsias dos vetores infectados, sendo essa um reflexo de mudanças ecológicas produzidas no ambiente (AZAD; BEARD, 1998).

Um bom hospedeiro amplificador é aquele que é frequentemente parasitado pelos estágios imaturos do carrapato vetor e, ao mesmo tempo, é capaz de se infectar com a bactéria e desenvolver uma bacteremia (presença de bactéria no sistema circulatório) por alguns dias (BARROS-BATTESTI, 2006).

Para que um animal vertebrado seja considerado um hospedeiro amplificador da bactéria, ele deve preencher cinco características básicas, como: ser abundante em área endêmica para febre maculosa; ser um bom hospedeiro natural do carrapato vetor; ser susceptível à infecção por *R. rickettsii*; manter níveis circulantes da bactéria na corrente sanguínea (riquetsemia) suficientes para causar infecção de carrapatos que nele se alimentem; e ter elevada taxa de renovação populacional, que significa a capacidade de entrada no meio ambiente de animais susceptíveis à doença (LABRUNA, 2006).

Os mamíferos são referidos como hospedeiros da maior parte das espécies de ixodídeos e, dentro deste grupo de vertebrados, nos EUA os pequenos mamíferos como esquilos (*Tamias* spp.), Ratazanas (*Microtus* spp.), Esquilos (*Spermophilus* spp.) e Lagomorfos (*Sylvilagus* spp.) são hospedeiros comuns para carrapatos de fase imatura de *Dermacentor* spp., altamente susceptíveis à infecção por rickettsias e aparentes hospedeiros amplificadores de *R. rickettsii* (LABRUNA, 2009). No Brasil há pelo menos dois animais que são incriminados por atuar como eficientes amplificadores de *R. rickettsii*, a capivara (*Hydrochoerus* spp.) e o gambá (*Didelphis* spp.) (SOUZA et al., 2008; HORTA et al., 2009). Além da capivara e o gambá outros também incriminados como amplificadores são a lebrinha do campo (*Sylvilagus brasiliensis*) e o cão doméstico (DIAS; MARTINS, 1939). Porém juntamente com os cavalos, as capivaras assumem grande importância na cadeia epidemiológica da doença, pois são os principais reservatórios dos carrapatos transmissores da febre maculosa. Os animais mantidos em pastos sujos, com vegetação alta, ou em matas ciliares, encontram um ambiente bastante propício para a infestação pelo *A. cajennense* (LEMOS et al., 1996b; SÁ DEL FIOL et al., 2010).

Outro roedor que possivelmente está envolvido na manutenção e amplificação de *R. rickettsii* é a guiana (*Euryzgomatomys spinosus*), pois está relacionado filogeneticamente com cobaios (*Cavea aperea porcellus*), que são altamente sensíveis a infecção por *R. Rickettsii*; são abundantes em áreas endêmicas, além de serem o hospedeiro da fase imatura do carrapato *A. aureolatum* (LABRUNA, 2009). Por possuir relatos de sorologia positiva, roedores como *Myocastor coypus bonariensis* e *Rattus norvegicus* também podem estar envolvidos, em algum grau, na cadeia epidemiológica da FMB em áreas endêmicas (LEMOS

et al., 1996a).

Em geral pequenos roedores são considerados como importantes hospedeiros e em muitos casos também reservatórios de rickettsias em seu ambiente natural. Estudos experimentais realizados com pequenos roedores confirmaram que estes animais são sensíveis à infecção e desenvolvem riquettsemia suficiente para infectar os ectoparasitas durante o repasto sanguíneo, embora por um curto período de tempo (REHACEK et al., 1992). Estes mamíferos têm uma área de dispersão limitada e um tempo de vida curto, sendo considerado bons indicadores da existência de rickettsias numa dada área, quando encontrados naturalmente infectados (REHACEK; URVOLGYI, 1978; REHACEK, 1992).

Os pássaros migradores, principalmente os habitantes do estrato sub-bosque, também participam da circulação de rickettsias, por transportarem os ectoparasitas infectados a grandes distâncias, causando focos pontuais de infecção em zonas não endêmicas, podendo estabelecer novos focos se os ixodídeos se adaptarem à nova área geográfica (BURGDORFER, 1975; SANTOS, 2007).

#### **4.4 Cães como sentinelas para Febre Maculosa Brasileira**

Animais sentinelas devem ter como características, sensibilidade ao agente da doença em questão e gerar uma resposta clínica ou imunológica (SCHMIDT, 2009). Entre os animais domésticos, o cão é considerado de grande importância na epidemiologia da FM (BURGDORFER, 1975). Embora ele não seja essencial ao ciclo natural das riquettsias, ele desempenha um papel primordial na manutenção e dispersão dos vetores infectados, além de estar envolvido na transmissão peri-domiciliar de doenças riquettsiais ao carregarem para o domicílio carrapatos infectados (PADDOCK et al., 2002; MCDADE; NEWHOUSE, 1986). O contato íntimo entre habitats de cães e carrapatos, faz deles sensíveis indicadores da presença ambiental de vetores infectados, e assim, úteis como sentinelas para os membros da família ou outras pessoas na mesma localização geográfica. Pois cães infectados com FM não apresentam um risco de transmissão direta para as pessoas, embora teoricamente eles possam levar carrapatos infectados para o ambiente peridomiciliar (SCHMIDT, 2009). Assim, os caninos podem servir como bons sentinelas para FM, e infecções em cães pode significar risco aumentado da doença nos proprietários (PADDOCK et al., 2002)

A doença clínica em cães foi demonstrada experimentalmente por Piranda et al. (2008) e sugere fortemente que a ocorrência da FMB em caninos é subestimada, sendo possível que alguns dos casos foram erroneamente identificados como Erliquiose Monocítica Canina, uma doença altamente prevalente transmitida por carrapatos no Brasil que é causada por *Ehrlichia canis* que induz a sintomas clínicos e hematológicos muito semelhantes aos causados por *R. rickettsii* (PIRANDA et al., 2008). Apenas recentemente no país, foram confirmados casos clínicos de FMB em dois animais procedentes do município de Itu, no estado de São Paulo (LABRUNA et al., 2009).

Embora as informações sobre casos clínicos de FMB em cães ainda sejam escassas no Brasil, inquéritos sorológicos por todo o Brasil indicam que cães de áreas endêmicas, estão expostos à infecção pela bactéria (HORTA et al., 2007; HORTA et al., 2004).

Em estudo no estado de São Paulo, Sangioni et al. (2005) observaram que, enquanto equinos e caninos de áreas endêmicas se mostravam positivos para o agente da FMB, nenhum equino ou canino de áreas consideradas não endêmicas reagiu sorologicamente pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI), contra *R. rickettsii*, apesar do contato com *A. cajennense*. Embora esta espécie de artrópode seja comum, havia ocorrido poucos casos relatados de FMB e, provavelmente um dos fatores que regulam a ocorrência de *R. rickettsii* são as diferenças ecológicas das regiões, sendo a maior diferença ecológica entre áreas endêmicas e não endêmicas a presença de capivaras apenas em áreas endêmicas. O estudo também sugere que

nas áreas não endêmicas podem estar ocorrendo espécies de rickettsias de patogenicidade desconhecida nas populações de *A. cajennense*.

Cunha (2009), no Município de Rezende, Estado do Rio de Janeiro, região endêmica para FMB, avaliou a infecção por *R. rickettsii* em 105 soros de cães, encontrando uma positividade de 27,62%, com títulos variando de 1:64 a 1:4096. Neste estudo, os animais que apresentaram maiores títulos eram animais pertencentes a propriedades próximas ao local onde ocorreu um surto da doença.

Estudando a infecção por rickettsias do GFM em cães e carrapatos, em uma área endêmica para FMB onde o principal vetor é o carrapato *A. aureolatum*, a comunidade de Recreio da Borda do Campo, Município de Santo André-SP, Moraes-filho et al. (2009) observaram uma prevalência de 69,6% de animais reativos para *R. rickettsii*, com títulos variando de 1:256 a 1:32768. Além disso, dois dos três cães que viviam na casa onde dois exemplares de *R. sanguineus* coletados estavam infectados por *R. rickettsii*, tinham títulos de 1:8192 e 1:32768.

Em Monte Negro, Estado de Rondônia, Labruna et al. (2007a) através da RIFI, testou 164 amostras de soro de cães de área rural e 153 de área urbana, contra 3 espécies de rickettsias que são conhecidas por ocorrer na região (*R. bellii*, *R. amblyommii* e *R. rhipicephali*) e três que ocorrem frequentemente na região sudeste (*R. rickettsii*, *R. parkeri*, e *R. felis*). A prevalência total para *Rickettsia* spp. encontrada foi de 11,6% e 3,9% em área rural e área urbana, respectivamente, apresentando a evidência de reatividades de soros homólogos para *R. parkeri*, *R. amblyommii* e *R. rhipicephali* por apresentarem títulos ao menos quatro vezes maior que as outras rickettsias testadas. A maior prevalência encontrada entre animais de área rural está possivelmente relacionada à maior diversidade de carrapatos que esses cães são expostos, em contraste com a área urbana, que em geral é parasitado pelo carrapato *R. sanguineus* (LABRUNA et al., 2007a).

Em um estudo realizado no município de Pedreira, Estado de São Paulo, área endêmica para FMB, Lemos et al (1996b) não só confirmaram a participação dos caninos como sentinelas para a doença, encontrando 12 positivos (36,4%) de 33 animais testados com a RIFI, mas também mostraram a importância dos equinos (com 77,8% soropositivos) como marcadores indiretos da presença de rickettsias do GFM. Para comparação, amostras de sangue de caninos e equinos procedentes de área não-endêmica, foram testadas e, apenas 4 (12,9%) dos 31 cães e 3 (27,3%) dos 11 equinos foram positivos na RIFI para rickettsias do GFM. Os resultados mostraram que a prevalência de anticorpos anti-rickettsias do GFM foi significativamente maior em caninos e equinos de áreas endêmicas quando comparados com os de área não endêmica (LEMOS et al., 1996b). Alguns anos depois, Horta (2002) encontrou também em Pedreira-SP, 31,25% de positividade em caninos para *R. rickettsii* e uma prevalência de 77,27% de animais positivos em equinos.

Em Minas Gerais, Cardoso et al. (2006) revisitaram um foco aparentemente silencioso, 12 anos após o último surto, e nenhum dos 73 cães reagiu sorologicamente à RIFI, enquanto que, no ano de ocorrência do surto, 25% foram positivos para *R. rickettsii*, diferentemente dos caninos, 17% dos equinos, neste estudo, foram positivos, sendo inferior à positividade de 53% encontrada no ano em que ocorreu o surto. A ausência de sorologia positiva no cão, associada à ausência de casos humanos diagnosticados no local nos últimos 12 anos parece ser importante para a caracterização de foco silencioso (CARDOSO et al., 2006).

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Local do estudo

As coletas foram realizadas no município de Seropédica, que fica na região oeste da Baixada Fluminense, Microrregião de Itaguaí, na Mesorregião Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, Brazil. Localiza-se a 22° 44' 38" de latitude sul, 43° 42' 28" de longitude oeste, a uma elevação de 33 metros do nível do mar. O Município fica a uma distância de 75 Km do centro da capital do estado, ocupa uma área de 283.794 km<sup>2</sup>, e sua população foi estimada no ano de 2011 em 78183 habitantes, sendo então o 31º município mais populoso do estado e o segundo mais populoso de sua microrregião. Faz divisa com os municípios Itaguaí, Nova Iguaçu, Japeri, Queimados e Paracambi.

No município de Seropédica fica localizado o *campus* principal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), considerado o maior *campus* universitário da América Latina com aproximadamente 3024 hectares. Dentro do *campus*, existem moradias onde residem professores e funcionários, algumas ficam concentradas em um bairro chamado Ecologia e outras espalhadas pelo *Campus* próximo aos Institutos (Instituto de Veterinária, Instituto de Tecnologia e etc.), além dos Alojamentos dos alunos de graduação e Pós-graduação. Várias espécies de animais domésticos e silvestres, são encontrados por toda essa extensão, tais como caninos, equinos, bovinos, roedores, etc. Dentre os animais silvestres pode-se destacar: capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) (Figura 1); gambás (*Didelphis aurita*); cutias (*Dasyprocta aguti*); preás (*Cavia aperea*) e tatus (*Dysipus novectus*) que são incriminados como reservatório de diversos agentes patogênicos.

No *campus* da UFRRJ, a vegetação é secundária, apresentando pastagens, fragmentos de matas e capoeiras, com espécies nativas e introduzidas, e de reflorestamento, com diferentes espécies de eucalipto. O solo predominante é do tipo latossolo e podzólico, sendo o relevo considerado como planície litorânea (SILVEIRA, 2010).

### 5.2 Amostragem e delineamento de estudo

O tipo de desenho de estudo utilizado foi o estudo transversal. Para calcular a amostragem, foi utilizado como estudo piloto os dados de um inquérito sorológico realizado nos anos de 2008 e 2009, onde sete dos 44 soros dos cães errantes na UFRRJ, testados através da RIFI, foram considerados homólogos para *R. rickettsii*. Portanto, foi considerada uma prevalência esperada de 15,91%. O número ideal de animais foi determinado pela fórmula de amostragem aleatória simples, utilizando 95% de intervalo de confiança e erro máximo de 5% (THRUSFIELD, 1995). Desta forma, determinou-se um número amostral de 206 animais.





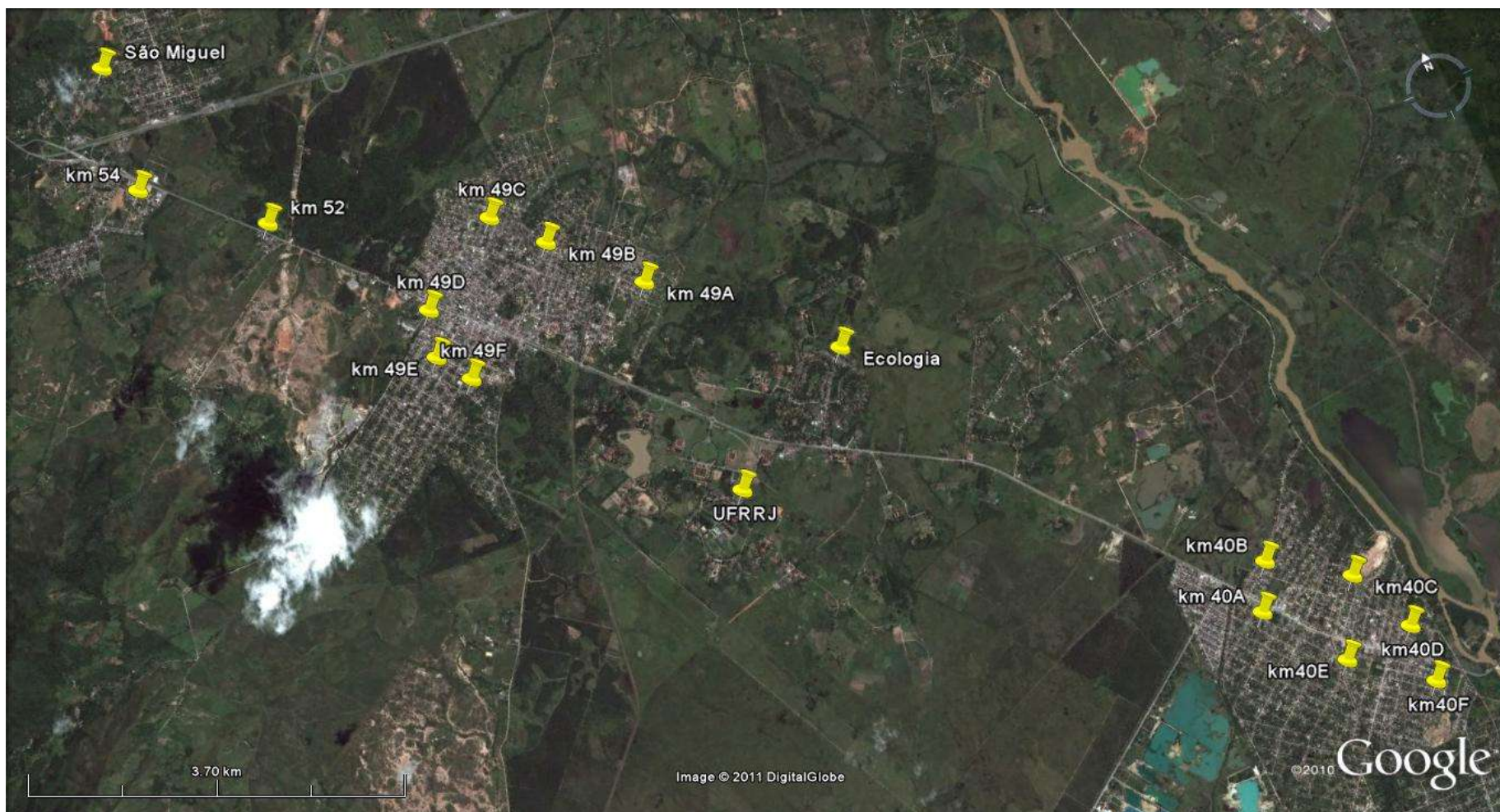
**Figura 1.** Família de capivaras habitando um dos lagos da UFRRJ, locais de intensa antropização.

Para a coleta das amostras, o município de Seropédica foi subdividido em 3 áreas, identificadas da seguinte forma: “Km 54”, “Km 49” e “Km 40” (Tabela 1). Os cães examinados dentro do *campus* da UFRRJ (errantes e domiciliados) não foram incluídos ao cálculo de amostragem, pois a Universidade tem uma área diferenciada das demais, com características de área rural, apresentando uma vegetação típica de Mata Atlântica com fragmentos florestais no interior onde grande parte está caracterizada por vegetação secundária com grandes áreas campestres e áreas de pastagem para bovino e equinos e lagos com capivaras (FERREIRA et al., 2010). As outras áreas de estudo são caracterizadas apenas como áreas urbanas (Figura 2).

Para se obter uma amostra proporcional de cada área dentro do município, foi utilizado como base os dados do número de animais vacinados nos anos de 2008 e 2009, cedidos pelo setor de Vigilância Sanitária da Secretaria Municipal de Saúde de Seropédica (Tabela 1). A distância entre os pontos de coletas mais extremos é de 14,60 Km em linha reta. De um total de 293 animais coletados, 283 foram submetidos à RIFI.

**Tabela 1.** Número de animais coletados por área no município de Seropédica, segundo o percentual de cães de áreas urbanas vacinados nos anos de 2008 e 2009.

Área	Cães Vacinados 2008/2009	Percentual	Animais por área	Pontos de coletas	Animais examinados	Total examinado
<b>Km 54</b>	2101	15,64	32	S. Sofia	7	32
				Km 52	8	
				S. Miguel	17	
				Km 49A	11	
				Km 49B	19	
				Km 49C	22	
<b>Km 49</b>	5647	42,03	86	Km 49D	10	87
				Km 49E	15	
				Km 49F	10	
				Km 40A	15	
				Km 40B	12	
				Km 40C	19	
<b>Km 40</b>	5688	42,33	88	Km 40D	13	90
				Km 40E	19	
				Km 40F	12	
				UFRRJ	35	
				Ecologia	49	
				<b>UFRRJ</b>	-	
<b>Total</b>	13436	100	206			293



**Figura 2** Localização dos pontos de coleta, em relação a cada uma das quatro áreas coletadas dentro do município de Seropédica-RJ. “Km 54” (São Miguel, Km54 e Km 52), “Km 49” (Km49A, Km49B, Km49C, Km49D, Km49E e Km49F), UFRRJ (UFRRJ e Ecologia) e “Km 40” (Km 40A, Km 40B, Km 40C, Km 40D, Km 40E, Km 40F).

### 5.3 Coleta dos soros

Os proprietários permitiram que a coleta fosse feita em seus animais e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1). No momento da coleta, realizou-se uma entrevista com cada proprietário, direcionada individualmente para cada animal, com finalidade de obter a resenha dos cães e informações sobre a rotina de criação (Anexo 2).

Este projeto está de acordo com os princípios básicos para pesquisa envolvendo animais segundo o comitê de ética da pesquisa da UFRRJ/COMEP (Anexo 3).

As coletas ocorreram durante o período de Outubro de 2010 à Abril de 2011. Para executar as coletas, os animais foram devidamente contidos com amordaças. As amostras foram obtidas por punção da veia cefálica em seringas descartáveis de 5 ml e transferidas para frascos estéreis sem anticoagulante. Posteriormente, o sangue foi centrifugado e os soros obtidos foram acondicionados em frascos estéreis de polipropileno e mantidos a 20° graus Celsius negativo até o momento da análise sorológica.

### 5.4 Perfil dos animais

Os cães eram de diferentes idades, machos e fêmeas, apresentando aspecto físico geral de ruim a bom (Figura 3). Quanto à raça, grande maioria (65,87%) era sem raça definida (SRD). Os cães que participaram do estudo considerados errantes, são animais, SRD, vadios que vivem no entorno dos alojamentos da UFRRJ aos cuidados dos alunos da Universidade (Figura 4).



**Figura 3.** Aspecto geral dos animais domiciliados examinados no Município de Seropédica-RJ. A) Cão mantido preso sem acesso à rua. B) Cão com acesso total à rua.

Quanto ao tipo de criação, 59,43% dos animais domiciliados tinham acesso à rua, entre os animais que não tinham acesso à rua, a maioria vivia em quintais, cimentados ou não (Figura 3). E entre os cães que tinham acesso à rua, 49 deles frequentavam matas com a finalidade de caçar.



**Figura 4.** Aspecto geral dos cães errantes coletados na UFRRJ. A) Cão positivo, através da RIFI, para *Rickettsia rickettsii* transitando à margem do lago onde vivem as capivaras. B) Cães nos corredores do Alojamento Masculino da UFRRJ.

### 5.5 Coleta e identificação dos carrapatos

Para a coleta dos carrapatos, os caninos foram inspecionados, principalmente, nas orelhas, dorso e coxins palmares e plantares. Os espécimes encontrados foram removidos manualmente ou com auxílio de pinça oftalmológica e acondicionados em frascos de polipropileno com a tampa furada e então encaminhados ao Laboratório de Doenças Parasitárias da UFRRJ.

Os carrapatos coletados foram mantidos em estufa para demanda biológica de oxigênio (B.O.D.), em temperatura de 27° C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) e umidade relativa acima de 80%, até o momento da identificação. Todas as identificações ocorreram em prazo máximo de 48 horas após a coleta. A identificação taxonômica dos adultos e ninfas foi realizada com auxílio de lupa estereoscópica e baseada na chave de Barros-Battesti (2006). Os carrapatos coletados foram estocados em freezer a 20° graus Celsius negativos para futura análise molecular.

### 5.6 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

A técnica de RIFI foi realizada no Laboratório de Carrapatos da Superintendência de Endemias do Estado de São Paulo (SUCEN – SP) situado no município de Mogi Guaçu-SP.

Como controle positivo, foi utilizado o soro de um animal infectado naturalmente por *R. rickettsii* com título de 1:8192, cedido pelo Dr. Jonas Moraes-Filho da FMVZ/USP à SUCEN-SP de Mogi Guaçu. Para controle negativo foi utilizada uma amostra de soro de um canino previamente testado estocado à 20° Celsius negativos na SUCEN-SP de Mogi Guaçu. O conjugado com soro anti-canino marcado com isoticianato de fluoresceína foi utilizado na titulação de 1:80.

Para realização da técnica de RIFI foram utilizadas lâminas de 10 orifícios, produzidas pelo Dr. Adriano Pinter no laboratório da SUCEN-SP de São Paulo-SP, utilizando cultivo de *R. rickettsii* cepa Taiacu em células Vero, conservadas a 20° Celsius negativos. As lâminas foram retiradas da refrigeração e imersas em tampão salino fosfatado (PBS) pH 7,4, por 10 minutos. A diluição dos soros-teste e controles, negativo e positivo, foi de 1:64. Assim, 20µL dos soros-teste e dos controles diluídos em PBS foram dispostos em cada orifício das lâminas, e estas, armazenadas em câmara úmida dentro de uma estufa bacteriológica a 37°C durante 30 minutos. Após este tempo, as lâminas foram lavadas com Tampão de Lavagem (PBS com Triton X 100 a 0,1%) e secas ao ar. Sendo assim, foram adicionados 20µL de conjugado

diluído em PBS e as lâminas armazenadas sob as mesmas condições por mais 30 minutos. Posteriormente, foram lavadas duas vezes por imersão em Tampão de Lavagem acrescido de Azul de Evans (na proporção de 0,3 mL de Azul de Evans para cada 100 mL de Tampão de Lavagem) por 10 minutos em uma cuba coberta por papel alumínio para evitar a entrada de luz. Em seguida, as lâminas foram secas ao abrigo da luz em temperatura ambiente. Para realizar a leitura, foram montadas com duas pequenas gotas de glicerina tamponada e cobertas por lamínula. Realizou-se a leitura das lâminas em microscópio de fluorescência à luz ultravioleta com aumento de 40 vezes. Foram considerados positivos todos os orifícios que apresentaram pontos fluorescentes mais ou menos uniformes com formas cocóides, bacilares ou cocobacilares. Os soros-teste que apresentaram reatividade foram diluídos até chegarem a sua titulação máxima.

### **5.7 Análise estatística**

O estudo das associações entre as variáveis de interesse foi realizado por meio do Teste de Qui-quadrado e da Análise de Variância (ANOVA), com nível de significância de 5%. As análises foram realizadas com o auxílio do programa computacional BioEstat 5.0. Para a análise epidemiológica dos dados, foi calculado a Razão de Prevalência (RP), conforme Medronho (2004).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 283 soros testados à RIFI, 23,67% (67/283) apresentaram reatividade contra antígenos espécie-específico de *R. rickettsii*. Desta forma, foi encontrada uma prevalência de 21,11% (19/90) no “Km 40”, 21,84% (19/87) no “Km 49”, 25% (8/32) no “Km 54” e 28,38% (21/74) no *campus* da UFRRJ. A titulação variou entre 1:64 à 1:512 (Tabela 2).

**Tabela 2.** Resultados da reação de imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos da classe IgG anti-*Rickettsia rickettsii* de caninos procedentes do município de Seropédica-RJ, de acordo com as áreas de procedência.

<b>Título</b>	<b>Km 54</b>	<b>Km 49</b>	<b>Km 40</b>	<b>UFRRJ</b>	<b>Total</b>
<b>1:64</b>	5 (7,45%)	12 (17,91%)	12 (17,91%)	8 (11,94%)	37 (55,22%)
<b>1:128</b>	1 (1,49%)	4 (5,97%)	4 (5,97%)	8 (11,94%)	17 (25,37%)
<b>1:256</b>	2 (2,99%)	2 (2,99%)	2 (2,99%)	5 (7,45%)	11 (16,42%)
<b>1:512</b>	0 (0,00%)	1 (1,49%)	1 (1,49%)	0 (0,00%)	2 (2,99%)
<b>Total</b>	8 (11,94%)	19 (28,35%)	19 (28,35%)	21 (31,34%)	67 (100%)

O maioria dos animais positivos foram com titulação a 1:64 (Tabela 2), este fato pode ter ocorrido devido à reação cruzada com outras espécies do gênero *Rickettsia*.

Os dados obtidos através da entrevista feita aos proprietários dos animais domiciliados (Anexo 2) revelaram que 46 dos 64 animais reativos à RIFI tinham acesso livre à rua (Tabela 3), sendo significativamente maior ( $p < 0,05$ ) em relação aos animais que não tinham acesso à rua. O acesso à rua facilita o contato com cães errantes, bovinos, equinos e animais selvagens, podendo ser infestado por diferentes espécies de carrapatos, aumentando a chance de se infectar por *Rickettsia* sp.

**Tabela 3:** Frequência sorológica de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii* em cães domiciliados no município de Seropédica-RJ, determinada pela Reação de Imunofluorescência indireta, em relação ao acesso à rua.

	<b>Com acesso</b>	<b>Sem acesso</b>	<b>Total</b>
<b>Reativo</b>	46 (71,88%)	18 (28,12%)	64 (100%)
<b>Não Reativo</b>	106 (54,92%)	87 (45,08%)	193 (100%)
<b>Total</b>	152 (59,14%)	105 (40,86%)	257 (100%)

$p < 0,05$  RP=1,77

A análise estatística em relação ao sexo mostrou que, apesar de existir um maior número de positividade entre as fêmeas (36/64), não houve diferença estatística (Tabela 4).

**Tabela 4:** Frequência sorológica de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii* em cães do município de Seropédica-RJ, determinada pela Reação de Imunofluorescência indireta, em relação ao sexo do animal.

	<b>Fêmea</b>	<b>Macho</b>	<b>Total</b>
<b>Reativo</b>	38 (56,72%)	29 (43,28%)	67 (100%)
<b>Não reativo</b>	118 (54,63%)	98 (45,37%)	216 (100%)
<b>Total</b>	156 (55,12%)	127 (44,88%)	283 (100%)

p>0,05 RP = 1,07

Os cães que tinham hábitos de frequentar pastos e matas não tiveram maior tendência a serem reativos contra antígenos de *R. rickettsii*, como era esperado (Tabela 5 e 6).

**Tabela 5:** Frequência sorológica de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii* em cães domiciliados no município de Seropédica-RJ, determinada pela Reação de Imunofluorescência indireta, em relação ao hábito de frequentar pastos e/ou currais.

	<b>Frequenta</b>	<b>Não Frequenta</b>	<b>Total</b>
<b>Reativo</b>	26 (40,62%)	38 (59,38%)	64 (100%)
<b>Não reativo</b>	66 (34,20%)	127 (65,80%)	193 (100%)
<b>Total</b>	92 (35,80%)	165 (64,20%)	257 (100%)

p>0,05 RP = 1,23

Entretanto, tais hábitos possibilitam maior chance de ter contato com uma ampla diversidade de espécies de carrapatos, principalmente, *A. cajennense* e *A. aureolatum*, os principais vetores da FMB (LABRUNA et al., 2004b). Cunha (2009) observou que cães da cidade de Resende-RJ, com hábitos de frequentar matas e pastos, tiveram 12 vezes mais chance de serem reativos a *R. rickettsii*. A partir da análise multivariada, Saito et al. (2008) observaram que cães em contato com pastos e matas apresentaram associação com a positividade.



**Tabela 6.** Frequência sorológica de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii* em cães domiciliados no município de Seropédica-RJ, determinada pela Reação de Imunofluorescência indireta, em relação ao hábito de frequentar matas.

	Frequenta	Não Frequenta	Total
<b>Reativo</b>	13 (20,31%)	51 (79,69%)	64 (100%)
<b>Não reativo</b>	36 (18,65%)	157 (81,35%)	193 (100%)
<b>Total</b>	49 (19,07%)	165 (80,93%)	257 (100%)

$p > 0,05$  RP = 0,86

A prevalência de anticorpos para *R. rickettsii* encontrada no presente estudo (23,67%) corrobora com os dados sorológicos observados por Milagres (2010), onde 20,89% (14/67) dos caninos foram reativos à *R. rickettsii*, no município de Santa Cruz do Escalvado, uma área de baixa endemicidade para FMB no Estado de Minas Gerais. Além de caninos, Milagres (2010) também analisou o soro de equinos, gambás e pequenos roedores, e os resultados indicaram a circulação de rickettsias no local. Apesar da positividade para *R. rickettsii*, a única espécie detectada no estudo de Milagres (2010), através da PCR, foi *R. felis*.

O presente estudo também corrobora com Cunha (2009), que avaliou a infecção por *R. rickettsii* em 105 soros de cães no Município de Rezende, Estado do Rio de Janeiro, região endêmica para FMB, encontrando uma positividade de 27,62%, com títulos variando de 1:64 a 1:4096.

Prevalências de proporções menores que o presente estudo, foram encontradas por Labruna et al. (2007b) em cães de área rural e urbana, no município de Monte Negro, Estado de Rondônia, onde 11,6% e 3,9%, respectivamente, reagiram positivamente à, pelo menos uma das 6 espécies de rickettsias testadas. Em área urbana deste município foram detectadas rickettsias com patogenicidade desconhecida infectando *R. sanguineus*, o que não é muito comum na literatura. Porém a maior prevalência encontrada entre cães de área rural está ligada possivelmente à maior diversidade de carrapatos que esses cães são expostos, em contraste aos animais de área urbana, onde apenas a população do carrapato *R. sanguineus* foi estabelecida (LABRUNA et al., 2007b).

Em contrapartida, resultado superior ao presente estudo foi relatado por Moraes-filho et al. (2009) na comunidade de Recreio da Borda do Campo município de Santo André-SP, Município de Santo André-SP, Moraes-filho et al. (2009) que observaram uma prevalência de 69,6% de animais reativos para *R. rickettsii*, com títulos variando de 1:256 a 1:32768.

A prevalência de 28,38% encontrada na UFRRJ é proporcionalmente maior que as demais áreas, que apesar de não ser estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ), está possivelmente ligado ao maior contato dos cães com equinos e capivaras (Figuras 1 e 4). No inquérito sorológico, realizado no período de agosto de 2008 a julho de 2009, utilizado como piloto para o presente estudo, foi encontrada uma prevalência geral para *Rickettsia* spp. de 73,81% (31/44). Para o agente *R. rickettsii* a soroprevalência foi de 42,24% (19/44), com títulos de 1:64 (14/19) e 1:128 (5/19). Somente sete (15,91%) desses soros foram considerados homólogos a *R. rickettsii*, uma vez que o título de anticorpos para esta espécie foi pelo menos quatro vezes maior que os títulos obtidos para as demais espécies de riquetsias testadas. Dessas sete amostras, três (6,81%) apresentaram títulos de 1:64 e quatro (9,09%) com títulos

de 1:128. Para a realização do trabalho atual, foram examinados soros de 30 cães errantes da UFRRJ. Porém, apenas 10% (3/30) foram reativos à RIFI, todos com títulos de 1:256. Essa diferença pode ser justificada, em parte, por serem, na maioria, animais recém introduzidos, uma vez que no primeiro inquérito os animais coletados eram antigos no local.

Tecnicamente, o procedimento utilizado no presente estudo não permite uma identificação precisa do agente rickettsial circulante. Na melhor das hipóteses, indica a presença de anticorpos para uma rickettsia do GFM, devido à existência de reações cruzadas entre as diferentes espécies. A confirmação do diagnóstico a partir de uma infecção de rickettsias do GFM deve ser feita através da combinação dos resultados das técnicas sorológicas, como a RIFI, com técnicas moleculares como a PCR e o sequenciamento (HORTA et al., 2007).

Não houve diferença estatística ( $p>0,05$ ) em relação à idade dos animais (Tabela 7).

**Tabela 7:** Frequência sorológica de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii* em cães domiciliados no município de Seropédica-RJ, determinada pela Reação de Imunofluorescência indireta, em relação idade do animal.

<b>Idade</b>	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	<b>Total</b>
<b>≤ 2 anos</b>	25 (25,77%)	69 (74,33%)	<b>97 (100%)</b>
<b>2 ≤ 5 anos</b>	22 (25,88%)	63 (74,22%)	<b>85 (100%)</b>
<b>&gt; 5 anos</b>	15 (23,08%)	47 (76,92%)	<b>65 (100%)</b>
<b>Não informada</b>	2 (20,00%)	8 (80,00%)	<b>10 (100%)</b>
<b>Total</b>	<b>64 (24,90%)</b>	<b>193 (75,10%)</b>	<b>257 (100%)</b>

$p>0,05$

Quanto aos carrapatos, 66,78% (189/283) dos cães coletados, estavam infestados por ixodídeos no momento da coleta (Tabela 8).

**Tabela 8:** Resultados de caninos sorologicamente reativos à Reação de imunofluorescência indireta no município de Seropédica-RJ, em relação ao parasitismo por carrapatos no momento da coleta.

	<b>Parasitados</b>	<b>Não Parasitado</b>	<b>Total</b>
<b>Reativo</b>	43 (64,18%)	24 (35,82%)	67 (100%)
<b>Não reativo</b>	146 (67,59%)	70 (32,41%)	216 (100%)
<b>Total</b>	189 (66,78%)	94 (33,22%)	283 (100%)

$p>0,05$  RP = 0,89

*Rhipicephalus sanguineus*, que se caracteriza por ser uma espécie nidícola e predominantemente de áreas urbanas, foi a espécie mais abundante (Tabela 9). A presença de *R. rickettsii* neste carrapato, detectada de através da hemolinfa (ROZENTAL et al., 2002) e por meio de técnicas moleculares (CUNHA et al., 2009; MORAES-FILHO et al., 2009), indica uma provável participação deste ixodídeo na cadeia epidemiológica da FMB.

*Amblyomma cajennense*, encontrada em menor número, é uma espécie que possui baixa especificidade para hospedeiros em estágios imaturos, e tem como hospedeiros primários equinos, antas e capivaras (ARAGÃO, 1936). É um dos principais vetores da FMB (LEMOS et al., 1997; GUEDES et al., 2005)

**Tabela 9.** Total de carrapatos da fase adulta (machos e fêmeas) e de fase imatura (Larvas e Ninfas) coletados de 293 cães, errantes e domiciliados, separados por áreas (“Km 54”, “Km 49”, “Km 40”, “UFRRJ”) do Município de Seropédica-RJ.

Espécie	Km 54		Km 49		Km 40		UFRRJ		Total
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	
<i>Amblyomma cajennense</i>	0	0	2	0	0	0	1	7	<b>10 (1,29%)</b>
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	34	37	147	113	78	90	55	74	<b>610 (78,91%)</b>
Ninfas <i>Amblyomma</i> sp.	0		3		0		15		<b>17 (2,20%)</b>
Ninfas <i>Rhipicephalus</i> sp.	10		38		35		0		<b>83 (10,74%)</b>
Larvas	0		4		4		8		<b>16 (2,07%)</b>
<b>Total</b>	<b>81</b>		<b>307</b>		<b>207</b>		<b>178</b>		<b>773 (100%)</b>

Uma pequena parte dos proprietários relatou levar seus animais com certa frequência ao veterinário, em geral quando adoecem, e 76,65% deles disseram fazer tratamento contra carrapatos e pulgas, por conta própria. No entanto, esses mesmos proprietários relataram a dificuldade de controlar artrópodes em seus animais, e 90,87% deles disseram ver pulgas ou carrapatos com grande frequência.

Foram coletados também algumas pulgas da espécie *Ctenocephalides* sp. e piolhos da espécie *Trichodectes* sp. As pulgas são os principais vetores e reservatórios de *R. felis* (REIF; MACALUSO, 2009), enquanto que os piolhos do gênero *Trichodectes*, não há relatos de transmissão de doenças ao homem e aos animais.

## 7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados observados, pode-se concluir que:

- A presença de anticorpos contra *R. rickettsii* em caninos no município de Seropédica sugere a circulação de rickettsias neste local, sendo um alerta para as autoridades sanitárias.
- O Acesso à rua influenciou em 1,77 vezes para o animal apresentar positividade para a infecção por *R. rickettsii*, uma vez que os animais tiveram maior contato com outros animais, e com eles outras espécies de carrapatos.
- Para uma possível identificação da espécie de Rickettsia que provavelmente está causando a infecção faz-se necessário uso de técnicas moleculares, como a PCR.
- As espécies mais prevalentes de carrapatos em caninos no município de Seropédica são *A. cajennense* e *R. sanguineus*
- O acesso dos cães à rua influenciou positivamente na presença de carrapatos da espécie *A. cajennense*. Constituindo-se em importantes veiculadores de carrapatos para o peridomicílio.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGERAMI, R.N.; RESENDE, M.R.; FELTRIN, A.F.C.; KATZ, G.; NASCIMENTO, E.M.; STUCCHI, R.S.B.; SILVA, L.J. Brazilian Spotted Fever: A Case Series from an Endemic Area in Southeastern Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.1078, p.252–254, 2006.
- AMÂNCIO, F.F.; AMORIM, V.D.; CHAMONE, T.L.; BRITO, M.G.; CALIC, S.B.; LEITE, A.C.; FRAGA, G.L.; FERRAZ, M.L. Epidemiological characteristics of Brazilian spotted fever in Minas Gerais State, Brazil, 2000-2008. **Caderno Saúde Pública**, v.27, n.10, p.1969-1976, 2011.
- 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.
- ARAGÃO, H. Ixodidas brasileiros e de alguns países limítrofes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.31, n.3-4, p.759-843, 1936.
- AZAD, A.F.; BEARD, C.B. Rickettsial Pathogens and their Arthropod Vectors. **Emerging Infectious Diseases**, v.4, n.2, p.179-186, 1998.
- BACELLAR, F.C. **Rickettsias isoladas em Portugal: contribuição para identificação e classificação de estirpes**. Tese de doutorado, Universidade de Évora, 1996
- BARROS-BATTESTI, D. M. **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies**; por Darci Moraes Barros-Battesti, Márcia Arzua e Gerváio Henrique Bechara. São Paulo, Vox/ICTTD-3/Butantan, 1-223p., 2006.
- BURGDORFER, W. A review of Rocky Mountain Spotted Fever (tick-borne typhus), its agent, and its ticks vectors in the United States. **Journal of Medical Entomology**, v.12, n.3, p.269-278, 1975.
- BURGDORFER, W.; BRINTON L.P. Mechanisms of transovarial infection of spotted fever Rickettsiae in ticks. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.266, p.61-72, 1975.
- BURGDORFER, W. **Ecological and epidemiological considerations of Rock Mountain spotted fever and scrub typhus**. In: Walker, D.H. Biology of rickettsial diseases, v.1 CRC Inc, Boca Raton, p.33-50, 1988.
- CARDOSO, L.D.; FREITAS, R.N.; MAFRA, C.L.; NEVES, C.V.B.; 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.
- CHEN, L.F.; SEXTON, D.J. What's New in Rocky Mountain Spotted Fever? **Infectious Disease Clinicals of the North American**. v.22, p.415–432, 2008.

CUNHA, N.C.; FONSECA, A.H.; REZENDE, J.; ROZENTAL, T.; FAVACHO, A.R.M.; BARREIRA, J.D.; MASSARD, C.L.; LEMOS, E.R.S. 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.

DA COSTA, P.S.G.; BRIGATTE, M.E.; ALMEIDA, E.P.; VALLE, L.M.C. Atypical Fulminant *Rickettsia rickettsii* Infection (Brazilian Spotted Fever) Presenting as Septic Shock and Adult Respiratory Distress Syndrome. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v.6, n.2, p.91-96, 2002.

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

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

ELLISON, D.W.; CLARK, T.R.; STURDEVANT, D.E.; VIRTANEVA, K.; PORCELLA, S.F.; HACKSTADT, T. Genomic comparison of virulent *rickettsia rickettsii* sheila smith and avirulent *rickettsia rickettsii* lowa. **Infection and Immunity**. v.76, n.2, p. 542–550, 2008.

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.803-10, 1994.

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

FERREIRA, I; VENTURA, P. E. C.; LUZ, H. R. 2010. **Aves no campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**. Editora da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 255p.

FUXELIUS, H.-H.; DARBY, A., MIN, C.-K.; CHO, N.-H.; ANDERSSON, S.G.E. The genomic and metabolic diversity of *Rickettsia*. **Research in Microbiology**, v.158 p.745-753, 2007.

GALVÃO, M.A.M.; CALIC, S. B.; CHAMONE, C. B.; MAFRA, S. C. L.; CESARINO FILHO, G.; OLANO, J. P.; WALKER, D. H. Spotted fever rickettsiosis in Coronel Fabriciano, Minas Gerais state. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**; v.36, n.4: p.479-81 2003a.

GALVÃO, M.A., CARDOSO, L.D, MAFRA CL, CALIC SB, WALKER DH. Revisiting Brazilian spotted fever focus of Caratinga, Minas Gerais State, Brazil. **Annals of New York of the Academy of Sciences**. v.1078, p.255-256, 2006.

GALVÃO, M. A. M. Diagnósticos e inquéritos sorológicos para riquetsioses do gênero *rickettsia* no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, supl. 1, p.188-189, 2004.

GALVÃO MAM, DUMLER JS, MAFRA CL, CALIC SB, CHAMONE CB, CESARINO FILHO G, OLANO JP, WALKER D.H. Fatal spotted fever rickettsiosis, Minas Gerais, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**. v.9, p.1402-1405 , 2003b.

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

GILLESPIE, J.J., BEIER, M.S., SAYEEDUR RAHMAN, M., AMMERMAN, N.C., SHALLOM, J.M., PURKAYASTHA, A., SOBRAL, B.S., AZAD, A. Plasmids and rickettsial evolution: Insight from *Rickettsia felis*. **PLoS One**, v.2 n.3, e266, 2007.

GUEDES, E.; LEITE, R.C.; PRATA, M.C.A.; PACHECO, R.C.; WALKER, D.C. 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.

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

HORTA, M. C. **Estudo epidemiológico de *Rickettsia felis* em áreas endêmicas e não-endêmicas para febre maculosa no Estado de São Paulo**. Epidemiologic study of *Rickettsia felis* in endemic and non-endemic areas for spotted fever in the State of São Paulo. 2006. 106 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

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

HORTA, M.C.; MORAES-FILHO, J.; CASAGRANDE, R.A.; SAITO, T.B.; ROSA, S.C.; OGRZEWALSKA M.; MATUSHIMA, E.R.; LABRUNA, M. B., Experimental infection of opossums *Didelphis aurita* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**. v.9 n.1: p.109-117, 2009.

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. 72 f. Dissertação (Mestrado Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, SP, 2002.

LABRUNA, M. B. Carrapatos. **A Hora Veterinária**, São Paulo, v. 23, n. 137, p. 63-65, 2004a

LABRUNA, M.B.; CAMARGO, L.M.A; CAMARGO, E.P.; WALKER, D.H. Detection of a spotted fever group *Rickettsia* in the tick *Haemaphysalis juxtakochi* in Rondônia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.127, n.2, p.169-174, 2005.

LABRUNA, M.B. Ecology of *Rickettsia* in South America. In: Rickettsiology and Rickettsial Diseases-Fifth International Conference: **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.1166: p.156–166, 2009.

LABRUNA, M. B. Epidemiologia da Febre Maculosa no Brasil e nas Américas. In: I SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ACAROLOGIA, 2006a, Viçosa-MG. **Anais...** Viçosa, 2006, p.63-78.

LABRUNA, M.B.; HORTA, M.C.; AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.T.; PINTER, A.; GENNARI, S.M.; CAMARGO, L.M.A. Prevalence of *Rickettsia* Infection in Dogs from the Urban and Rural Areas of Monte Negro Municipality, Western Amazon, Brazil. **Vector-borne and zoonotic diseases** v.7, n.2: p.249-255, 2007a.

LABRUNA, M.B.; KAMAKURA, O.; MORAES-FILHO, J.; HORTA, M.C.; PACHECO, R.C. Rocky Mountain spotted fever in dogs, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**. v.15: p.458–460, 2009.

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

LABRUNA, M.B.; OGRZEWALSKA, M.; MARTINS, T.F.; PINTER, A.; HORTA, M.C. Comparative susceptibility of larval stages of *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma cajennense*, and *Rhipicephalus sanguineus* to infection by *Rickettsia rickettsii*. **Journal of Medical Entomology**, v.45, n.6, p. 1156-1159, 2008.

LABRUNA, M.B.; PACHECO, R.C.; RICHTZENHAIN, L.J.; SZABO, M.P.J. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* from *Haemaphysalis juxtakochi* Ticks in the State of São Paulo, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73 n.3: p.869–873, 2007b.

LABRUNA, M.B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M.C.; BOUYER, D.H.; MCBRIDE, J.W.; PINTER, A.; POPOV, V.; GENNARI, S.M.; WALKER, D.H. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the State of São Paulo, Brazil, where brazilian spotted fever is endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.1, p.90-98, 2004b.

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; BOUYER, D. H.; MACBRIDGE, J.; 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, 2004c.

LAMAS, C.; FAVACHO, A.; ROZENTAL, T.; KIRSTEN, A.H.; GUTERRES, A.; BARREIRA, J. LEMOS, E.R. Characterization of *Rickettsia rickettsii* in a case of fatal



Brazilian spotted fever in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal Infection Disease**, v.12, n.2, p.149-151, 2008.

LA SCOLA, B.; RAOULT, D. L. Laboratory diagnosis of Rickettsioses: Current approaches diagnosis of old and new Rickettsial Diseases. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35; n.11; p.2715-2727, 1997.

LEMOS, E.R.S.; MACHADO, R.D.; COURA, J.R.; GUIMARÃES, M.A.A.; FREIRE, M.N.S. Infestation by Ticks and Detection of Antibodies to Spotted Fever Group Rickettsiae in Wild Animals Captured in the State of São Paulo, Brazil. A Preliminary Report. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.91, n.6, p.701-702, 1996a.

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 an Endemic Area in the State of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo v.38, n. 6, p.427-430, 1996b.

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

LEMOS, E. R. S. Rickettsial diseases in Brazil. **Virus Reviews and Research**, v.7, p.7-16, 2002.

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

LIMA, V.L.C.; SOUZA, S.S.L.; SOUZA, C.E.; VILELA, M.F.G.; PAPAORDANOU, P.M.O.; DEL GUÉRCIO, V.M.F.; ROCHA, M.M.M. Situação da febre maculosa na Região Administrativa de Campinas, São Paulo, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v.19, n.1, p.331-334, 2003

MACALUSO, K.R.; SONENSHINE, D.E.; CERAUL, S.M.; AZAD, A. F. Rickettsial infection in *Dermacentor variabilis* (Acari:Ixodidae) inhibits transovarial transmission of a second *Rickettsia*. **Journal of Medical Entomology**, v.39, n.6, p. 809-813, 2002.

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

MEDRONHO, R.A. **Epidemiologia**. São Paulo: Atheneu, 2004.493 p.

MILAGRES, B.L. **Pesquisa de Rickettsia em animais sinantrópicos e domésticos e em seus ectoparasitos em duas áreas de baixa endemicidade para Febre Maculosa da Região Leste de Minas Gerais, de 2005-2007**. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências Biológicas) Universidade Federal de Ouro Preto, 2010, 132p.

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

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

MORAES-FILHO, J.; PINTER, A.; PACHECO, R.C.; GUTMANN, T.B.; BARBOSA, S.O.; ADELAIDE, M.; GONZÁLES, 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 Zoonotic Disease**.v.9 n.1: p.73-78, 2009.

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

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

OGRZEWALSKA, M.; PACHECO, R. C.; UEZU, A.; RICHTZENHAIN, L. J. ; FERREIRA, F.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in *Amblyomma nodosum* ticks (Acari: Ixodidae) from Brazil. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 103, p. 413-425, 2009.

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.

PADDOCK, C.D.; BRENNER, O.; VAID, C.; BOYD, D.B.; BERG, J.M.; JOSEPH,R.J.; ZAKI, S.R.; CHILDS, J.E. Short Report: Concurrent Rocky Mountain Spotted Fever in a Dog and its Owner. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.66 n.2: p.197–199, 2002.

PADDOCK, C.D. *Rickettsia parkeri* as a Paradigm for Multiple Causes of Tick-Borne Spotted Fever in the Western Hemisphere. **Annals of New York of the Academy Sciences**. v.1063, p.315–326, 2005.

PAROLA P.; PADDOCK C.D.;RAOULT D. Tick-borne Rickettsioses around the world: Emerging Diseases Challenging Old Concepts. **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, n.4, p.719-756, 2005.

PAROLA, P.; RAOULT, D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. **Clinical Infectious Diseases**, v.32, p.897–928, 2001.

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 Sciences**, v. 1078, p. 523-529, 2006.

PIRANDA, E.M.; FACCINI, J.L.; PINTER, 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.

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

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

REHÁČEK, J.; ÚRVOLGYI, J.; KOCIANOVÁ, E.; JEDLICKA, L. Susceptibility of some species of rodents to rickettsiae. **Folia Parasitologica**. v.39: p.265-284, 1992.

REHÁČEK, J.; ÚRVOLGYI, J. Towards more standardized methods in ecological studies of Rickettsiae in relation to their vectors hosts. In: VII International Congress of Infectious and Parasitic Diseases. 1978, p.1-8.

REIF, K.E; MACALUSO, K. R. Ecology of *Rickettsia felis*: A Review. **Journal of Medical Entomology**. V.46, n.4, p.723-736, 2009.

RICKETTS, H. T. Some aspects of Rocky Mountain Spotted Fever as shown by recent investigations. **Medical Record**, n. 76, p. 843-855, 1909.

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**, 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**, v.1078, p.257-259, 2006.

SÁ DEL FIOL, F.; JUNQUEIRA, F.M.; ROCHA, M.C.P.; TOLEDO, M.I.; FILHO, S.B. A febre maculosa no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Publica**. v.27, n.6, p.461-466, 2010.

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

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

SANTOS, A. P. **Aspectos ecológicos da febre maculosa brasileira em um foco endêmico no Estado de São Paulo**. Ecological aspects of Brazilian Spotted Fever in an endemic area in

the State of São Paulo. 2007. 86 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

SCHMIDT, P.L. Companion Animals as Sentinels for Public Health. **Veterinary Clinical Small Animals**. v.39, n.1: p.241-250, 2009.

SILVEIRA, A.K. **Caracterização de ecossistemas com potenciais de risco para infestação por carrapatos e transmissão de riquetsias para humanos no Estado do Rio de Janeiro**. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Veterinárias) Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 2010.

SILVEIRA, I.; PACHECO, R.C.; SZABÓ, M.P.J.; RAMOS, H.G.C.; LABRUNA, M.B. *Rickettsia parkeri* in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**. v.13, n.7, p.1111-1113, 2007.

SOUZA, C.E.; SOUZA, S.S.L.; LIMA, V.L.C.; CALIC, S.B.; CAMARGO, M.C.G.O.; SAVANI, E.S.M.M.; D'AURIA, S.R.N.; LINHARES, A.X.; YOSHINARI, N.H. Identificação sorológica de *Rickettsia* spp do grupo da febre maculosa em capivaras na região de Campinas, SP, Brasil. **Ciência Rural**, v.38, n.6, p.1694-1699, 2008.

SPENCER, R. R.; PARKER, R. R. Rocky Mountain spotted fever: infectivity of fasting and recently fed ticks. **Public Health Reports**, v.38: p.333-339, 1923.

SPOLIDORIO, M.G.; LABRUNA, M.B.; MANTOVANI, E.; BRANDÃO, P.E.; RICHTZENHAIN, L.J.; YOSHINARI, N.H. Novel spotted fever group rickettsiosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, n.3, 2010.

SZABÓ, M.P.J.; PASCOLI, G.V.T.; JÚNIOR, O.M.; FRANCHIN, A.G.; TORGA, K. Brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* parasitizing the bird *Coereba flaveola* in the Brazilian cerrado. **Ciência Rural**, v.38, n.2, p.543-545, 2008.

TAVARES, W.; MARINHO, L. A. C. **Rotinas de diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias**. Editora Atheneu: São Paulo, 2005. 1206p.

THRUSFIELD, M. V. **Veterinary epidemiology**. 2nd. ed. Oxford: Blackwell, 1995. 479 p.

VENZAL, J.M.; PORTILLO, A.; ESTRADAPEÑA, A.; CASTRO, O.; DE SOUZA, C.G.; FELIX, M.L.; NAVA, S.; GUGLIELMONE, A.A. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma triste* from Uruguay. **Emerging Infectious Diseases**, v.10, p.1493-5, 2004.

## **CAPÍTULO I I**

### **SOROPREVALÊNCIA PARA *Borrelia* spp, EM CANINOS NO MUNICÍPIO DE SEROPÉDICA, ESTADO DO RIO DE JANEIRO.**

## 1 RESUMO

O estudo teve como objetivo verificar a frequência de anticorpos homólogos da classe IgG anti-*Borrelia burgdorferi* em cães do município de Seropédica-RJ. Foi efetuada a coleta de sangue de 293 cães em quatro áreas do município de Seropédica-RJ, e os soros obtidos foram submetidos à pesquisa de anticorpos homólogos da classe IgG contra *B. burgdorferi* cepa americana G39/40, utilizando o teste de Ensaio de Imunoadsorção enzimático (ELISA) indireto. Para confirmação da presença de *Borrelia* spp. no município, 102 amostras positivas foram testadas pelo Western Blotting (WB). Também foram coletados carrapatos, a partir da inspeção das regiões das orelhas, dorso e coxins palmares e plantares dos animais. Os espécimes encontrados foram removidos manualmente e acondicionados em frascos de polipropileno e posteriormente identificados. O estudo da associação entre animais soropositivos para *B. burgdorferi* e as variáveis avaliadas, foram realizados por meio do teste de Qui-quadrado e Análise de Variância (ANOVA), com nível de significância de 5%. Dos animais estudados, 154 (52,56%) foram positivos para anticorpos homólogos anti-*B. burgdorferi*. Foi encontrada uma prevalência de 43,75% (14/32) no “Km 54”, 51,72% (45/87) no “Km 49”, 46,67% (42/90) no “Km 40” e 63,1% (53/84) na UFRRJ. Apenas duas espécies de carrapatos foram identificadas, *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma cajennense*, sendo encontradas em 189 (64,5%) cães. Das 102 amostras submetidas ao WB como teste confirmatório, 85,29% (87/102) apresentaram pelo menos cinco das dez bandas específicas. Foi observada diferença significativa entre as prevalências encontradas em caninos errantes e domiciliados. Os cães com idade acima de 2 anos, tiveram uma frequência de anticorpos significativamente maior ( $p < 0,05$ ) que animais mantidos preso. Não foram observadas diferenças estatísticas entre a relação das variáveis presença de carrapatos, sexo dos animais, hábitos de frequentar pastos e acesso à rua com a soropositividade observada. A presença de anticorpos homólogos anti-*B. burgdorferi* em caninos de Seropédica-RJ é um indicativo da presença de espiroquetas em cães nesta área.

## 2 ABSTRACT

This study aimed to verify the presence of IgG antibodies against *B. burgdorferi* in stray and domiciled dogs from Seropédica-RJ. To investigate the prevalence of antibodies against *B. burgdorferi*, blood was collected from 293 dogs in four areas of the city of Seropédica-RJ. Serum samples were analyzed through of the indirect Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), using crude antigens of *B. burgdorferi* strain of North American origin. To confirm the presence of *Borrelia* spp., 102 positive samples were tested by Western Blotting. Ticks were also collected through of inspection of the animals. The specimens found were manually removed and stored in polypropylene bottles and later identified. The association between seropositive animals and variables, were performed using the chi-square and analysis of variance (ANOVA) with significance level of 5%. Of the 293 sera tested, 154 (52.56%) were positive for homologous antibodies anti-*B. burgdorferi*. It was founded a prevalence of 43.75% (14/32) in “km 54”, 51.72% (45/87) in “km 49”, 46.67% (42/90) in “km 40” and 63.1% (53/84) in UFRRJ. It was significant difference ( $p < 0.05$ ) between the prevalence of antibodies against *Borrelia* sp. In stray dogs and domiciled. dogs with access to the street had a frequency significantly ( $p < 0.05$ ) greater than animals kept in prison. There were no statistical differences ( $p > 0.05$ ) the relationship between the variables: presence of ticks, animal sex, habits, frequenting pastures and age of the animals with seropositivity observed in either species. Regarding ticks, at least 64.5% (189/293) dogs were infested with ticks at the moment of collection. Only two species of ticks were identified, *Rhipicephalus sanguineus* and *Amblyomma cajennense*. The presence of antibodies anti-*B. burgdorferi* in dogs from Seropédica-RJ is indicative of the presence of spirochetes dogs in this area.

### 3 INTRODUÇÃO

A borreliose de Lyme (BL) foi descrita pela primeira vez em 1975 por Steere et al (1977), ao investigar um surto de artrite em adolescentes na comunidade de Old Lyme em Connecticut nos Estados Unidos (EUA). O agente etiológico da BL foi identificado em 1982 por Willy Burgdorfer sendo denominado *Borrelia burgdorferi*, uma bactéria transmitida ao homem através da picada de carrapatos ixodídeos infectados (CDC, 2008; YOSHINARI et al., 2010).

No Brasil a enfermidade tem algumas diferenças clinicamente, por esse motivo foi denominada como Doença de Lyme-símile, Síndrome Infecto-Reacional Lyme-símile (SIRLS) ou Doença de Lyme-símile Brasileira com intuito de diferenciá-la da BL clássica. Os primeiros casos foram identificados em 1992, no entanto, laboratorialmente, em nenhum momento foram isoladas bactérias do complexo *B. burgdorferi* sensu lato nos fluidos biológicos ou em tecidos. No intuito de desvincular esta zoonose brasileira da BL, objetivando incentivo às pesquisas e a difusão desta enfermidade emergente à classe médica brasileira, mudou-se a nomenclatura para Síndrome Baggio-Yoshinari (SBY) (YOSHINARI et al., 2010).

Em território brasileiro, os estudos soroepidemiológicos das borrelioses foram realizados em humanos (YOSHINARI et al., 2003; CORRADI et al., 2006;), em cães (SOARES, 1998; JOPPERT, et al., 2001; ALVES et al., 2004; ODWYER et al., 2004; SALGADO, 2006), equinos (SALLES et al., 2002; MADUREIRA, 2004), bovinos (ISHIKAWA, 1996; FONSECA et al., 1996) e bubalinos (CORRÊA, 2007; CORRÊA, 2011) e a soroprevalência na maioria dos estudos apresentam valores próximos aos reportados em áreas endêmicas na América do Norte (GREENE, 1990). O carrapato vetor pode variar conforme a região fisiográfica (SOARES et al., 2000). No Brasil, os prováveis carrapatos responsáveis pelo ciclo silvestre pertencem aos gêneros *Ixodes* enquanto o gênero *Amblyomma* é o principal suspeito na transmissão para animais domésticos e seres humanos (FONSECA et al., 2005).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a ocorrência de anticorpos homólogos da classe IgG contra *B. burgdorferi* em cães no município de Seropédica, RJ.



## 4 REVISÃO DA LITERATURA

### 4.1 Características gerais do gênero *Borrelia*

O gênero *Borrelia* é membro da ordem Spirochaetales, família Spirochaetaceae. Distinguem-se morfologicamente dos demais gêneros, desta família, por serem maiores e por possuírem maior número de flagelos periplasmáticos (15 a 20) e menor número de espiras (PFISTER et al., 1994; QUINN et al., 1994). Os microrganismos deste gênero possuem o formato helicoidal com 3 a 10 espiras e medem de 0,2 a 0,5 µm por 3 a 30 µm. Este organismo tem protoplasma cilíndrico envolto pela membrana celular, da qual partem flagelos, possui externamente outra membrana contendo diversas proteínas de superfície, e não possui túbulos citoplasmáticos (KRIEG; HOLT, 1984; BARBOUR; HAYES, 1986). São bactérias gram negativas, microaerófilas e se reproduzem por fissão binária transversal (AUSTIN, 1993).

Estas bactérias crescem à temperatura de 33°C em meios artificiais como BSK (Babour-Stoenner-Kelly), coram-se facilmente pelos corantes derivados da anilina e Romanowski e podem ser visualizadas através de microscopia de campo escuro, de contraste de fase ou ainda em tecidos, quando por colorações à base de prata (BARBOUR; HAYES, 1986; QUINN et al., 1994).

As espiroquetas sofrem transformações estruturais, assumindo formas de cistos ou corpos densos, quando as bactérias são submetidas a condições desfavoráveis de cultivo, como nas mudanças de nutriente, pH, presença de antibióticos, retornando à morfologia espiralada quando as condições de cultivo melhoram. No Brasil, é possível que a falta de isolamento do agente etiológico em materiais biológicos, seja justificado pela ocorrência de borrelias que conservam permanentemente a forma atípica, tanto nos hospedeiros vertebrados como nos invertebrados (YOSHINARI et al., 2010).

O complexo *B. burgdorferi Sensu Lato* engloba 14 espécies: *B. burgdorferi Sensu Stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. spielmanii*, sendo essas quatro associadas com a Borreliose de Lyme, *B. bissettii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. turdae*, *B. sínica*, *B. andersonii*, *B. californiensis* e *B. carolinensi* (SANTOS et al., 2010).

As borrelias patogênicas conhecidas determinam cinco grupos de enfermidades distintas: (a) febre recorrente epidêmica humana, causada pela *B. recurrentis*, e febre recorrente endêmica, com mais de 20 espécies do gênero *Borrelia*, até recentemente nominadas de acordo com o carrapato transmissor; (b) borreliose aviária, a qual é determinada por uma única espécie, a *B. anserina*, e causa processo anemiante febril, apatia e altas taxas de morbidade nas aves; (c) borreliose bovina, causada pela *B. theileri*. Essa espécie é cosmopolita e pode determinar discreto processo anemiante em ruminantes e equinos, sendo considerada pouco patogênica; (d) aborto enzoótico bovino, enfermidade que acomete bovinos e cervídeos, determinada pela *B. coriaceae*; (e) borreliose de Lyme (ou doença de Lyme) e borreliose de Lyme *simile*, as quais são causadas pelo grupo da *B. burgdorferi lato sensu* (FONSECA et al., 2005).

### 4.2 Vetores, Hospedeiros e Reservatórios

Doença de Lyme é reconhecida como uma das principais doenças emergentes transmitidas por carrapatos aos seres humanos, tanto em regiões temperadas da América do Norte e na Europa. A Borreliose de Lyme é transmitida por diferentes espécies de carrapatos do gênero *Ixodes*, principalmente *I. scapularis* no meio-oeste, nordeste e superior dos Estados Unidos, e *I. pacificus* ao longo da costa do Pacífico na América do Norte, *I. ricinus* na Europa, onde a distribuição de carrapatos infectados está em expansão, mesmo em áreas

urbanas, e *I. persulcatus* na Ásia (CHOMEL, 2011).

Os carrapatos infectam-se durante o repasto sanguíneo em animais portadores da espiroqueta *B. burgdorferi*. Quanto à eficiência na transmissão, o tempo de fixação do carrapato no hospedeiro é importante. Estudos demonstraram que para os ixodídeos é necessário um tempo superior a 48 horas, podendo ainda ocorrer transmissão pela urina entre roedores, por transfusão sanguínea, transplante de tecido, por contato ou congenitamente em cães (ALVIM et al, 2005).

A transmissão por carrapatos Argasídeos raramente ocorre por via salivar, o principal modo de transmissão de *Borrelia* spp., dos ínstares adultos desses carrapatos, é através do líquido coxal (BURGDORFERI et al., 1989).

Dentre os animais silvestres, as aves têm papel relevante na epidemiologia atuando como reservatórios para *B. burgdorferi*. Nos Estados Unidos, a borreliose de Lyme acomete cervídeos e roedores, embora raramente estes adoeçam, onde atuam como reservatórios mantendo a espiroqueta no ambiente silvestre. Os principais reservatórios são os cervos de cauda branca (*Odocoileus virginianus*) e os camundongos, embora outras espécies, como o *Cervus nippon yesoensis*, também possam atuar como reservatório (SOARES et al., 2000). Títulos sorológicos elevados de anticorpos específicos para *B. burgdorferi* já foram encontrados em gado bovino, caprino e em cães, o que sugere que esses animais também possam atuar como reservatórios. No Brasil, os reservatórios ainda não foram identificados, embora já tenham sido detectados anticorpos anti-*B. burgdorferi* em cães, marsupiais, equinos e búfalos, sem, contudo, ter sido elucidada a participação desses animais na transmissão da doença (SANTOS et al., 2010; ABEL, 1996; CORRÊA, 2007). Estudos demonstraram que os marsupiais podem participar na epidemiologia da borreliose no Brasil, sendo observado espiroquetas com características morfológicas de *Borrelia* sp. em sangue periférico de *Didelphis aurita* (FONSECA et al., 1995; ABEL, 1996).

### 4.3 Diagnóstico de borreliose

O isolamento de *Borrelia* spp. pode ser realizado em meios artificiais, como BSK, a partir de saliva, hemolinfa, tecidos de carrapatos, além de soro, fluidos corporais e tecidos humanos e de animais, obtendo-se crescimento da espiroqueta à temperatura de 33°C em, aproximadamente, sete dias (ANDERSON, 1988; EWING et al., 1994; LANE et al., 1994; DICKINSON; BATTLE, 2000). No entanto há limitações, pois nem todas as espécies de *Borrelia* são de fácil cultivo ou ainda não são cultiváveis (SMITH; ROGERS, 1998; OLIVEIRA et al., 2004). A visualização destas espiroquetas pode ser realizada em microscopia de campo escuro, de contraste de fase ou em tecidos corados pela prata (BARBOUR; HAYES, 1986; QUINN et al., 1994). Não é possível a identificação entre as espécies baseando-se em características bioquímicas (HADANI et al., 1985).

Existem vantagens e desvantagens para cada método de detecção de anticorpos em relação à sensibilidade, especificidade, facilidade de padronização e custo (MAGNARELLI et al., 2004). Em todas as regiões onde se tem relatado a borreliose de Lyme, o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) indireto tem sido utilizado para diagnóstico e levantamentos epidemiológicos, representando a principal ferramenta imunológica, devido às suas altas sensibilidade e especificidade (MAGNARELLI et al., 1987; SOARES et al., 2000).

A utilização de proteínas recombinantes específicas para *B. burgdorferi*, como as de pesos moleculares de 31kDa (OspA), 34kDa (OspB) e 110kDa, têm sido empregadas em ELISA, com soros de humanos, cães e equinos, a fim de aumentar a sensibilidade desses testes (GREENE et al., 1988; CAPUTA et al., 1991; MAGNARELLI et al., 1997).

Ensaio como o Western Blotting (WB) têm sido empregado para confirmação dos resultados, após triagem realizada com o método ELISA, pois demonstram maior

sensibilidade e especificidade que este. É uma técnica mais trabalhosa e possui alto custo de realização (GRODZICKI; STEERE, 1988). A técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) é o mais específico dos ensaios, garante o resultado específico por meio da amplificação do DNA do agente (LIENBLING et al., 1993).

A Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é uma prova subjetiva que pode ser usada para triagem ou ocasionalmente, quando dados clínicos e epidemiológicos fortalecem o diagnóstico (BENNETT, 1995), porém o ELISA indireto supera quanto à especificidade e sensibilidade. As determinações espectrofotométricas dos valores de absorbância e análises estatísticas do ELISA produzem resultados quantitativos, o que é melhor em relação à classificação subjetiva da imunofluorescência. Com a automação, os procedimentos do ELISA permitem a abordagem de um número maior de amostras em programas de vigilância. (MAGNARELLI et al., 1984).

#### **4.4 Borreliose em animais domésticos**

O primeiro relato de Borreliose em cães foi feito por Lissman et al. (1984). Burgess (1986) conseguiu isolar o agente, *B. burgdorferi*, a partir de um animal sadio, sugerindo os cães como potenciais reservatórios. Não há registro de manifestação clínica de borreliose em animais no Brasil (FONSECA et al., 2005). Diversas pesquisas sorológicas desenvolvidas no Brasil confirmam os caninos como excelentes sentinelas para a circulação de *Borrelia* spp. (JOPPERT et al., 2001; SOARES et al., 1999; ALVES et al., 2004; O'DWYER et al., 2004).

Há poucos estudos de borreliose em felinos, sendo sua incidência muito baixa, mesmo em áreas enzoóticas. Em ruminantes foi observada na América do Norte, na Europa e no Brasil onde estudos soropidemiológicos demonstram que animais positivos, em sua maioria, são assintomáticos (SOARES et al., 2000; ISHIKAWA, 1996).

Formas típicas de um espiroquetídeo, *Borrelia* sp., semelhante a *B. theileri* foram observadas em esfregaço sanguíneo de um búfalo (*Bufallus bubalis*) fêmea do estado do Pará (SCOFIELD et al., 2005). Posteriormente, Corrêa (2007), no Estado do Pará, e Corrêa (2011), no Estado do Rio de Janeiro avaliaram a presença de anticorpos da classe IgG em búfalos encontrando 83,91% e 59,2% respectivamente.

A Borreliose aviária é causada pela *Borrelia anserina*, transmitida por carrapatos do gênero *Argas* (WALKER et al., 2002).

Em equinos, Madureira (2007) observou 15 animais soropositivos no Estado do Pará, e fez a primeira descrição genotípica de um isolado brasileiro de *B. theileri*. Outros estudos sorológicos no Brasil evidenciam a presença de *Borrelia* spp. em equinos e a participação epidemiológica dos carrapato na transmissão (SALLES et al., 2002; MADUREIRA, 2004).

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Amostragem e delineamento de estudo

O tipo de desenho de estudo utilizado foi o estudo transversal. Para calcular a amostragem foi considerada uma prevalência esperada de 15,58%, baseado em um estudo sorológico para *B. burgdorferi* realizado em cães de área rural do Estado do Rio de Janeiro (O'DWYER et al., 2004). O número ideal de animais foi determinado pela fórmula de amostragem aleatória simples, utilizando 95% de intervalo de confiança e erro máximo de 5% (THRUSFIELD, 1995). Desta forma, determinou-se um número amostral de 203 animais. Para evitar que possíveis perdas de material durante a coleta e processamento dos soros pudessem interferir no resultado final da pesquisa, e pelo fato da possibilidade de estudo da prevalência de outras doenças, foi estabelecida uma amostra de 209 cães na área urbana.

A área urbana do município de Seropédica foi subdividida em três áreas, sendo, área 1: “Km 40”, com um total de 90 animais; área 2: “Km 49”, com um total de 87 animais e área 3: “Km 54”, com um total de 32 animais, e o número de animais examinados de cada área decorreu da proporção média de cães vacinados nos anos de 2008 e 2009<sup>1</sup>. Foram coletadas outras 84 amostras de soro de cães no *Campus* da UFRRJ, sendo 49 animais domiciliados no Bairro Ecologia e 35 animais errantes.

### 5.2 Coleta dos soros

Os proprietários permitiram que a coleta fosse feita em seus animais e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1). No momento da coleta, realizou-se uma entrevista com cada proprietário, direcionada individualmente para cada animal, com finalidade de obter a resenha dos cães e informações sobre a rotina de criação (Anexo 2).

Foram coletadas, 209 amostras de soros de caninos em área urbana do município de Seropédica e 79 na UFRRJ (44 de cães domiciliados e 35 de cães errantes) entre outubro de 2010 a abril de 2011. Os cães eram de diferentes idades, machos e fêmeas, aparentemente saudáveis e predominantemente sem raça definida (SRD). Os cães que participaram do estudo considerados errantes, são animais vadios que vivem no entorno dos alojamentos da UFRRJ aos cuidados dos alunos da Universidade.

As amostras sanguíneas foram obtidas por punção da veia cefálica em seringas de 5 ml e posteriormente transferidas para frascos estéreis sem anticoagulante. Posteriormente, o sangue foi centrifugado e os soros obtidos foram acondicionados em frascos de polipropileno e mantidos a 20° Celsius negativo até o momento da análise sorológica.

### 5.3 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática Indireto (ELISA)

Os soros obtidos foram submetidos primeiramente à pesquisa de anticorpos da classe IgG contra antígeno bruto de *B. burgdorferi* utilizando o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) indireto padronizado por Soares et al. (1999).

Neste ensaio foram utilizadas microplacas de poliestireno de 96 orifícios (CORNING®) sensibilizadas com 100 µL do antígeno de *B. burgdorferi* cepa G39/40 diluído a 15 µg/mL em tampão carbonato pH 9,6 e incubadas durante 12 horas em câmara úmida à 4°C. Após a sensibilização, as placas foram lavadas três vezes com Tampão salino fosfato (PBS Tween 20 0,05% pH 7,4) e bloqueadas com 200 µL de Leite em pó 5% diluído em PBST e incubadas

<sup>1</sup> Secretaria de Saúde – Setor de Vigilância Sanitária – Prefeitura Municipal de Seropédica.

por 90 minutos, em câmara úmida, em estufa bacteriológica a 37° Celsius. Em seguida foram realizadas novamente as três lavagens da placa.

Foram utilizadas 12 amostras negativas de animais previamente testados e um controle positivo de um animal inoculado com antígeno inativado de *B. burgdorferi* cepa G39/40. Os 12 controles negativos, o controle positivo e os soros testes foram diluídos na concentração de 1:800 em PBST e dispostos 100 µL nas placas, que foram incubadas à 37° Celsius por 90 minutos em câmara úmida e, posteriormente lavada como na etapa anterior. Então, foi disposto 100 µL do conjugado IgG de coelho anti IgG canino ligado a fosfatase alcalina (anti-dog IgG, whole molecule, alkaline phosphatase, SIGMA®) na diluição de 1:5000 em PBST com mais 90 minutos de incubação nas mesmas condições anteriores, em seguida, lavagens das placas.

Após esta última incubação foi empregado 100 µL do substrato revelador Paranitrofenilfosfato de Sódio (PNPP - SIGMA Chemical) diluído em Tampão de Dietanolamina pH 9,8 na concentração de 1 mg/mL. Em aproximadamente 15 minutos, as placas foram lidas em espectrofotômetro para microplacas de 96 orifícios (Termo Scientific® Uniscience Multiskan FC) sob comprimento de onda de 405 nm.

O ponto de corte (“*cutoff*”) para o ensaio foi determinado utilizando a distribuição T-Student com um grau de confiança de 99,99%, segundo a média mais três vezes o desvio padrão dos valores da densidade óptica (DO) dos controles negativos (FREY et al., 1998). O índice de densidade óptica foi calculado com base na fórmula  $DO \times 100 / \text{“cutoff”}$ .

#### 5.4 Padronização do Western Blotting

Os soros de 102 animais que apresentaram positivos no teste ELISA indireto foram testados ao Western Blotting (WB) como exame confirmatório.

Para a padronização do WB foi realizado o protocolo segundo Madruga et al. (2001) com modificações. Realizou-se a eletroforese (Mini-Protean II System, Bio Rad) de 250 µg de antígeno bruto de *B. burgdorferi*, por duas horas utilizando corrente de 25 mA em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% e gel de empilhamento de 5%. Fez-se a transferência das proteínas para o papel de nitrocelulose, utilizando uma corrente de 30V, 70 mA e 25W (Mini-Trans Blot System, Bio Rad). Após a transferência, a fita foi corada com Ponceau S, com a finalidade de identificar a presença de proteínas, sendo, a seguir bloqueada com leite desnatado a 5% por uma hora. O blot foi preso no aparato Mini-Protean II Multiscreen formando canaletas individuais. Em seguida, colocou-se, em cada canaleta, o controle positivo, o controle negativo e as amostras a serem testadas, todos diluídos na proporção de 1:500 em Tampão salino fosfato (PBS Tween 20 a 0,1% e pH 7,2) e num volume de 500µl, em seguida foi incubando em agitador de placas à temperatura ambiente por uma noite. Depois de lavados com PBST 0,1%, foi adicionado 500 µl do conjugado (anti-dog IgG, whole molecule, alkaline phosphatase, SIGMA®) diluído à 1:1000 em PBST 01% e incubado também a temperatura ambiente por pelo menos duas horas em agitador de placas. Ao final desse tempo, acrescentou-se o substrato revelador BCIP/NBT e aguardou-se a revelação das bandas no controle positivo e nas amostras. Em seguida, os blots foram escaneados e as bandas identificadas e calculadas a partir do programa Quantity One®<sup>2</sup>. Foram considerados positivos os soros que apresentaram pelo menos cinco das dez principais bandas para infecção crônica (18, 23, 28, 30, 39, 41, 45, 58, 66, 93 kDa) segundo Wang et al. (2010).

---

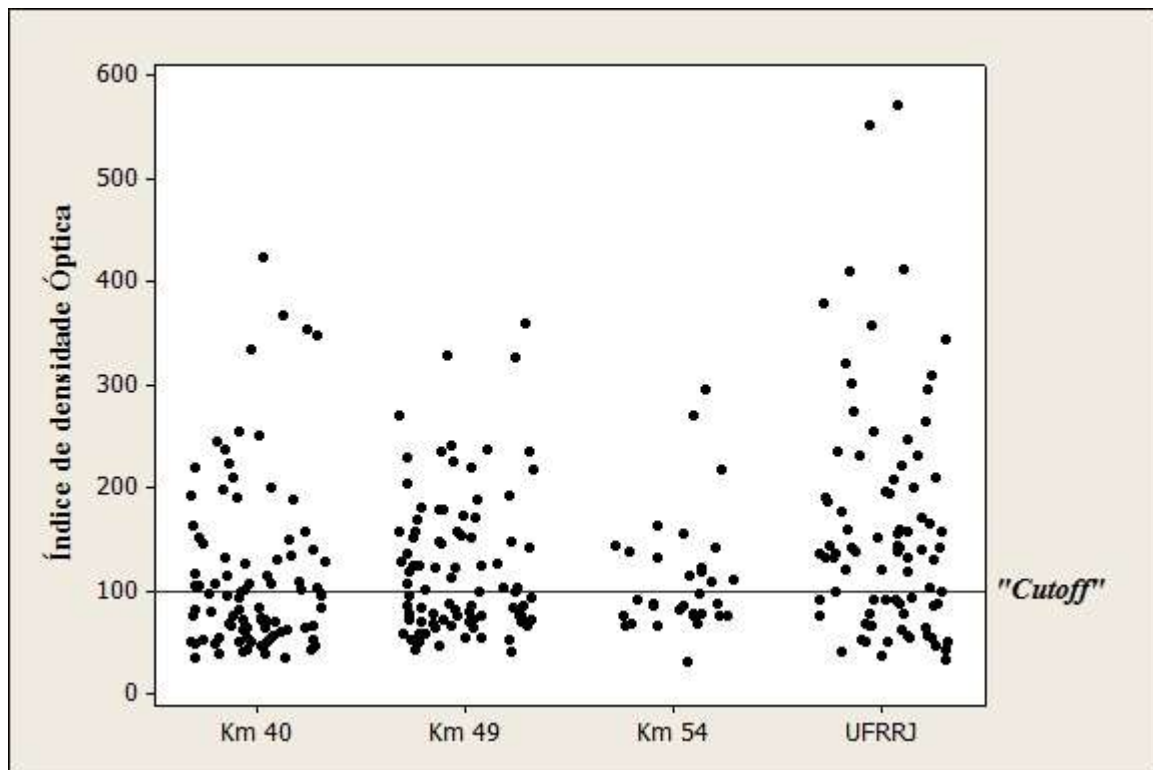
<sup>2</sup> SigmaVersão 4.5.2/ 1-D Analysis Software – Bio Rad, Laboratories, EUA

## **5.5 Análise Estatística**

O estudo das associações entre as variáveis de interesse foi realizado por meio do Teste de Qui-quadrado e Análise de Variância, com nível de significância de 5%. As análises foram realizadas com o auxílio do programa computacional BioEstat 5.0. Para a análise epidemiológica dos dados, foi calculado a Razão de Prevalência (RP), conforme Medronho (2004).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise soro-epidemiológica dos 293 soros testados revelou que um total de 154 (52,56%) animais foram reativos ao ELISA indireto. Desta forma, foi encontrada uma prevalência de 46,67% (42/90) no “Km 40”, 51,72% (45/87) no “Km 49”, 43,75% (14/32) no “Km 54” e 63,1% (53/84) na UFRRJ. Os índices de densidade óptica obtido em cada área estão apresentados na Figura 1.



**Figura 1** - Distribuição dos índices de densidades ópticas dos animais em relação ao “cutoff” ( $DO \times 100 / \text{“cutoff”}$ ) obtidas do ensaio ELISA indireto para *Borrelia* spp. dos soros-teste de cães coletados no município de Seropédica-RJ.

A alta prevalência encontrada no presente estudo pode ser justificada, em parte, pelo número de cães errantes e o tipo de criação dos animais domiciliados com acesso frequente à rua (Tabela 1), o que facilita o contato com animais errantes, bovinos, equinos e animais selvagens, aumentando a chance de infecção (TORRENCE et al., 1990). Os animais domésticos e selvagens apresentam maior risco em adquirir o agente etiológico porque são parasitados por grande número e diversidades de carrapatos (FONSECA et al., 2005).

A prevalência encontrada no *campus* da UFRRJ (63,1%) foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) que a prevalência encontrada em cães de área urbana no município de Seropédica (48,33%). Este fato se deu, provavelmente, pelo número expressivo de animais errantes coletados no *campus* da Universidade, os quais são animais com alto índice de infestação por carrapatos. Um outro motivo que levou a UFRRJ à uma maior frequência, é que o seu *campus* universitário possui características de área rural, apresentando uma vegetação típica de Mata Atlântica com fragmentos florestais no interior onde grande parte está caracterizada por vegetação secundária com grandes áreas campestres e áreas de pastagem para bovino e equinos (FERREIRA et al., 2010).

**Tabela 1:** Frequência sorológica de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* em cães domiciliados no município de Seropédica-RJ, determinado pelo ELISA indireto, em relação ao acesso à rua.

	Com acesso	Sem acesso	Total
<b>Positivo</b>	87 (33,85%)	55 (21,4%)	132 (51,36%)
<b>Negativo</b>	65 (25,29%)	50 (19,46%)	125 (48,64%)
<b>Total</b>	152 (59,14%)	105 (40,86%)	257 (100%)

p>0,05 RP = 1,09

Os dados obtidos através da entrevista feita aos proprietários dos animais domiciliados revelaram que 51 dos 132 animais positivos no ELISA indireto tinham hábito de frequentar pastos ou currais (Tabela 2). Apesar de não apresentar significância, o hábito de frequentar pastos e currais, expõe o animal ao contato prévio com carrapatos do gênero *Amblyomma* (principalmente *A. cajennense*, o “Carrapato Estrela” do cavalo), e isto pode representar um maior risco de infecção, uma vez que, acredita-se ser, este carrapato, o principal transmissor de Borreliose à humanos e animais (FONSECA et al, 2005; YOSHINARI et al, 2010). Porém, apenas sete animais domiciliados estavam sendo parasitados por *A. cajennense* no momento da coleta, e quatro destes foram positivos ao ELISA indireto. Estudando aspectos soroepidemiológicos para *Borrelia* spp. em equinos no Estado do Rio de Janeiro, Salles et al (2002) observaram diferenças estatísticas entre a infestação por carrapatos e sorologia positiva. Estes equinos eram parasitados por carrapatos das espécies *Dermacentor (Anocentor) nitens*, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e principalmente *A. cajennense*.

**Tabela 2:** Frequência sorológica de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* em cães domiciliados no município de Seropédica-RJ, determinado pelo ELISA indireto, em relação à frequentar pastos e/ou currais.

	Frequenta	Não Frequenta	Total
<b>Positivo</b>	51 (19,84%)	81 (31,52%)	132 (51,36%)
<b>Negativo</b>	41 (15,95%)	84 (32,69%)	125 (48,64%)
<b>Total</b>	92 (35,79%)	165 (64,21%)	257 (100%)

p>0,05 RP = 1,13

Dentre os 257 proprietários que responderam à entrevista, 49 disseram ainda que seus animais adentram na mata para caçar, no entanto não houve diferença estatística.

Grande parte dos proprietários (76,65%) relataram fazer o tratamento contra carrapatos. Porém, no momento da coleta 64,5% dos cães (domiciliados e errantes) estavam parasitados por carrapatos (Tabela 3).



**Tabela 3:** Frequência sorológica de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* em caninos do município de Seropédica-RJ, determinado pelo ELISA indireto, em relação à observação de parasitismo por carrapato.

	<b>Parasitados</b>	<b>Não Parasitado</b>	<b>Total</b>
<b>Positivo</b>	96 (32,76%)	58 (19,8%)	154 (52,56%)
<b>Negativo</b>	93 (31,74%)	46 (15,7%)	139 (47,44%)
<b>Total</b>	189 (64,5%)	104 (35,5%)	<b>293 (100%)</b>

p>0,05 RP = 0,91

As únicas espécies encontradas foram *Rhipicephalus sanguineus* e *A. cajennense*, sendo a primeira espécie mais abundante. Segundo O'Dwyer et al. (2001), cães criados em áreas urbanas de Paracambi, município vizinho de Seropédica, estavam parasitados, principalmente, por *R. sanguineus*, enquanto cães de áreas rurais apresentaram, preponderantemente, as espécies *A. ovale*, *A. tigrinum*, *A. aureolatum* e *A. cajennense*. A análise estatística revelou que não há nível de significância entre as variáveis parasitismo por carrapatos no momento da coleta e soropositividade. Porém, uma infestação natural por populações elevadas de carrapatos, pode ser considerada um indicador de altos títulos sorológicos (SALLES et al., 2002).

A análise estatística em relação ao sexo mostrou que, apesar de existir um maior número de positividade entre as fêmeas, não houve diferença estatística (Tabela 4).

**Tabela 4:** Frequência sorológica de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* em caninos do município de Seropédica-RJ, determinado pelo ELISA indireto, em relação ao sexo do animal.

	<b>Fêmea</b>	<b>Macho</b>	<b>Total</b>
<b>Positivo</b>	92 (31,4%)	62 (21,16%)	154 (52,56%)
<b>Negativo</b>	70 (23,89%)	69 (23,55%)	139 (47,44%)
<b>Total</b>	162 (55,29%)	131 (44,71%)	293 (100%)

p>0,05 RP = 1,20

Em relação à idade, não houve diferença estatística entre animais acima como mostra a Tabela 6. Salgado (2006) e Alves et al. (2004) relataram diferenças estatísticas em cães a partir de três e um ano de idade, respectivamente. Este fato ocorre devido a um maior tempo de exposição a carrapatos e por possuir maturidade suficiente para o desenvolvimento da imunidade ativa com níveis de anticorpos suficientes para serem detectados no teste ELISA (MERINO et al. 2000). Por outro lado, O'dwyer et al. (2004) e Joppert et al. (2001) não encontraram significância nos dados em relação à idade.

**Tabela 6:** Frequência sorológica de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* em caninos do município de Seropédica-RJ, determinado pelo ELISA indireto, em relação idade do animal (menores ou iguais a dois anos, faixa entre maiores que dois e menores ou iguais a 5 anos e acima de cinco anos).

<b>Idade</b>	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	<b>Total</b>
<b>≤ 2 anos</b>	35 (36,46%)	61 (63,54%)	96 (100%)
<b>2 ≤ 5 anos</b>	54 (63,53%)	31 (36,47%)	85 (100%)
<b>&gt; 5 anos</b>	39 (60,00%)	26 (40,00%)	65 (100%)
<b>Não informada</b>	4 (40,00%)	6 (60,00%)	10 (100%)
<b>Total</b>	132 (51,36%)	125 (48,64%)	257 (100%)

p>0,05

No Brasil, a prevalência de anticorpos contra *B. burgdorferi* em cães, através do ELISA indireto, foi inicialmente pesquisada por Soares et al. (1999) que observaram uma prevalência de 20% no município de Itaguaí. Utilizando a mesma técnica, Joppert et al. (2001) encontraram 9,7% de positividade em cães da cidade de Cotia, no Estado de São Paulo. Nessa mesma região foi relatada uma soroprevalência de 7,5% em humanos, também através do ELISA indireto (YOSHINARI et al, 1997).

A prevalência total encontrada no presente estudo (52,56%) é superior ao resultados de O'dwyer et al. (2004), que observou uma prevalência de 15,58% em cães de área rural de sete cidades do Estado do Rio de Janeiro, dentre elas, Seropédica-RJ.

O resultado encontrado neste trabalho corrobora com o achado de Alves et al. (2004), que observou uma frequência de anticorpos de 48,25% em cães da Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, sendo que no município de Seropédica foi obtida uma prevalência de 51,28%.

Salgado (2006) na cidade de Campo Grande-MS e Santos (2008) na cidade do Rio de Janeiro-RJ pesquisaram anticorpos da classe IgG anti-*B. burgdorferi* em cães acautelados no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de seus respectivos municípios, encontrando resultados superiores que o presente estudo, 73,3% e 86,8% de positividade, respectivamente.

Os valores encontrados em nosso estudo corroboram com pesquisas sorológicas realizadas em cães de áreas endêmicas para borreliose de Lyme nos EUA (BURGESS, 1986; MAGNARELLI et al, 1985).

A existência de reação cruzada entre *Borrelia* sp. e *Leptospira* sp. tem sido relatada, embora não sendo significativa (WELLS et al. 1993). Soares et al. (1999) e Joppert et al. (2001) não observaram reações cruzadas significativas entre anticorpos de *B. burgdorferi* e variantes sorológicas de *Leptospira* sp.

Das 154 amostras positivas no ELISA indireto, 102 foram submetidas ao WB como teste confirmatório. A análise dos resultados mostrou que as amostras de soro dos cães, ao exame, formação de bandas compatíveis com os resultados observados no teste ELISA. Com isso, 87 (85,29%) amostras apresentaram pelo menos cinco das dez bandas específicas para infecção crônica (Anticorpos da Classe IgG) de acordo com Wang et al. (2010) (Anexo 4). Joppert et al. (2001) confirmou, através do WB, 20 (86,96%) exames de 23 animais positivos no ELISA indireto. A resposta imune do hospedeiro varia dentro e entre espécies de animais, e há diferentes cepas de *B. burgdorferi* na natureza. Anticorpos para um ou mais desses antígenos podem não sempre ser produzido em infecções naturais (MAGNARELLI et al., 1987).

## 7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados observados, pode-se concluir que:

- A UFRRJ teve uma maior prevalência de animais positivos para *Borrelia* spp. em relação as áreas urbanas, devido às características de área rural.
- A alta frequência de anticorpos para *B. burgdorferi* no município de Seropédica-RJ, indica a presença de *Borrelia* sp. na região, e reforça a importância dos cães como sentinelas da SBY.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, I. S. **Estudo de *Borrelia* sp. em *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae) naturalmente infectados.** 1996. 40p. Trabalho de Monografia- Bacharel em Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, UFRRJ, Rio de Janeiro.
- ALVES, A.L.; MADUREIRA, R.C.; SILVA, R.A.; CORRÊA, F.N.; BOTTEON, R.C.C.M. Freqüência de anticorpos contra *Borrelia burgdorferi* em cães na região metropolitana do Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 4, p. 204-205, 2004.
- ALVIM, N.C.; BENTO, M.A.F.; MARTINS, L.A. Borreliose de Lyme – A Doença da década. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**. v.1, n.4, 2005.
- ANDERSON, J. F. Mammalian and avian reservoirs for *Borrelia burgdorferi*. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 25, n. 8, p. 1495-1497, 1988.
- AUSTIN, F. E. Maintenance of infective *Borrelia burgdorferi* Sh-2-82 in 4% oxygen- 5% carbon dioxide in vitro. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 1103-1110, 1993.
- BARBOUR, A.G.; HAYES, S.F. Biology of *Borrelia* species. **Clinical Microbiology Reviews**. v.50, n. 4, p. 381-400, 1986.
- BENNETT, C E. Ticks and Lyme disease. *Advances in Parasitology*, v. 36, p. 343-405, 1995.
- BURGDORFER, W.; HAYES, S.F.; CORWIN, D. Pathophysiology of the Lyme Disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in ixodes ticks. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 11, n. 6, p. 51442-51449, 1989.
- BURGESS, E.C. Natural exposure of Wisconsin dogs to the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. **Laboratory Animal Sciences**. v.36, n.3, p.288-290, 1986.
- CAPUTA, A. C.; MURTAUGH, M. P.; BEY, R. F.; LOKEN, K. I. 110-Kilodalton recombinant protein which is immunoreactive with sera from humans, dogs, and horses with Lyme borreliosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 11, p. 2418-2423, 1991.
- CDC – CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2008). Surveillance for Lyme Disease - United States, 1992-2006. Disponível em <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss5710a1.htm#top>> Acesso em 04 de janeiro de 2012.
- CHOMEL, B. Tick-borne infections in dogs - An emerging infectious threat. **Veterinary Parasitology**. v.179, p.294– 301, 2011.
- CORRADI, D.A.; CARVALHO, V.M.; COUTINHO, S.D. Anticorpos para *Borrelia burgdorferi* em indivíduos que trabalham com animais silvestres. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.5, p.966-968, 2006.
- CORRÊA, F.N. **Estudo epidemiológico de *Borrelia burgdorferi*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em Búfalos (*Bubalus bubalis*) do Estado de Rio de**

**Janeiro**. 2011, 98p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

CORRÊA, F.N. **Pesquisa de Anticorpos Homólogos anti-*Borrelia burgdorferi* em Búfalos (*Bubalus bubalis*) do Estado do Pará**. 36p. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

DICKINSON, F. O.; BATTLE, M. C. Lyme borreliosis. **The Infections Diseases Review**, v. 2, n. 1, p. 23-26, 2000.

EWING, C.; SCORPIO, A.; NELSON, D. R.; MOTHER, T. N. Isolation of *Borrelia burgdorferi* from saliva of the tick vector, *Ixodes scapularis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 755-758, 1994.

FERREIRA, I; VENTURA, P. E. C.; LUZ, H. R. 2010. **Aves no campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**. Editora EDUR. 255p.

FONSECA, A.H.; ISHIKAWA, M.M.; SOARES, C.O.; MASSARD, C.L.; YOSHINARI, N.H. Lyme borreliose serology in cattle in Brazil. **Revista da Universidade Rural, Série Ciência da Vida**, v. 18, n. 1/2, p.85-89, 1996.

FONSECA, A.H.; SALLES, R.S.; SALLES, S.A. N.; MADUREIRA, R.C.; YOSHINARI, N.H. Borreliose de Lyme *simile*: uma doença emergente e relevante para a dermatologia no Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 2, p. 171-178, 2005.

FONSECA, A.H.; SOARES, C.O.; ISHIKAWA, M.M.; MASSARD, C.L.; YOSHINARI, N.H. Detection of *Borrelia* sp. in opossum (Marsupialia: Didelphidae) in Brazil. In: XX CONGRESS OF WORLD SMALL ANIMAL OF VETERINARY ASSOCIATION, 1990. **Annals of XXV Congress Of World Veterinary Association**, Yokohama, Japão. 1995. p. 283.

FREY A.; CANZIO J.D.; ZURAKOWSKI D.A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. **Journal of Immunological Methods**. v.221, n.1/2, p.35-41, 1998.

GREENE, R.T. An update on the serodiagnosis of canine Lyme borreliosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.4, p.167-171, 1990.

GREENE, R. T.; WALKER, R. L.; NICHOLSON, W. L.; HEIDNER, H. W.; LEVINE, J. F.; BURGESS, E. C.; WYAND, M.; BREITSCHWERDT, E. B.; BERKHOFF, H. A. Immunoblot analysis of immunoglobulin G response to the Lyme disease agent (*Borrelia burgdorferi*) in experimental and naturally exposed dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 4, p. 648-653, 1988.

GRODZICKI, R.L.; STEERE, A.C. Comparison of immunoblotting and indirect enzymelinked immunosorbent assay using different antigen preparations for diagnosing early Lyme Disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 157, n. 4, p. 790-797, 1988.

HADANI, A.; GUGLIELMONE, A. A.; BERMÚDEZ, A. C. Detección de espiroquetas Del genero *Borrelia* en bovinos de la provincia de Salta, Argentina. **Revista de Medicina**

**Veterinaria** Argentina, v. 66, n. 5, p. 292-294, 1985.

ISHIKAWA, M. M. **Epidemiologia da borreliose de Lyme em bovinos na região sudeste do Brasil e padronização do diagnóstico sorológico**. Tese de Mestrado, (Mestrado em Medicina Veterinária, Parasitologia Veterinária) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 1996. 51p.

JOPPERT A.M.; HAGIWARA M.K.; YOSHINARI N.H. Antibodies in dogs from Cotia county, São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v.43, n.5, p.251-255, 2001.

KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Sitematic Bacteriology**. v. 1, 8th Edition, Williams; Wilkins, London. p. 57-62, 1984.

LANE, R. S.; BROWN, R. N.; PIESMAN, J.; PEAVEY, C. A. Vector competence of *Ixodes pacificus* and *Dermacentor occidentalis* (Acari: Ixodidae) for various isolates of Lyme disease spirochetes. **Journal of Medical Entomology**, v. 31, n. 3, p. 417-424, 1994.

LIENBLING, M. R.; NISHIO, M. J.; RODRIGUEZ, A.; SIGAL, L. H.; JIN, T.; LOUIE, J. S. The polymerase Caín reaction for the detection of *Borrelia burgdorferi* in human body fluids. **The Arthritis Rheumatology**, v. 36, n. 5, p. 665-675, 1993.

LISSMAN, B. A.; BOSLER, E. M.; CAMAY, H.; ORMISTON, B. G.; BENACH, J. L. Spirochete-associated arthritis (Lyme Disease) in a dog. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 185, n. 2, p. 219-220, 1984.

MADUREIRA, R. C. **Frequência de anticorpos homólogos anti-Borrelia burgdorferi em eqüinos dos municípios de Três Rios, Vassouras e Valença, estado do Rio de Janeiro**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro. 40p., 2004.

MADRUGA, C.R.; SOARES, C.O.; ARAÚJO, F.R. **Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária**. 1ed. Campo Grande – MS: Embrapa Gado de Corte, 2001. v. 1. 360 p.

MADUREIRA, R.C. **Sorologia para Borrelia burgdorferi em eqüinos do Estado do Pará e caracterização genotípica de isolados de Borrelia spp.** 2007. 73p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

MAGNARELLI, L.A.; JACOBSON, R.H.; LAUDERDALE, T.L.; CHANG, Y.F.; SHIN, S.J.; THOMFORD, J.W.; TODHUNTER, R.J.; SUMMERS, B.A. Borreliosis in dogs from southern Connecticut. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v.189, p.955-959, 1985.

MAGNARELLI, L. A.; MEEGAN, J. M.; ANDERSON, J. F.; CHAPPELL, W. A. Comparison of an indirect fluorescent-antibody test with an enzyme-linked immunosorbent assay for serological studies of Lyme disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 20, n. 2, p. 181-184, 1984.

MAGNARELLI, L. A.; FLAVELL, R. A.; PADULA, S. J.; ANDERSON, J. F.; FIRKRIG, E.

Serologic diagnosis of canine and equine borrelioses: use of recombinant antigens in enzymelinked immunosorbent assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 169-173, 1997.

MAGNARELLI, L. A.; ANDERSON, J. F.; JOHNSON, R. C. Cross-reactivity in Serological Tests for Lyme Disease and Other Spirochaetal Infections. **The Journal of Infectious Disease**, v. 156, n. 1, p. 183-187, 1987.

MAGNARELLI, L. A.; BUSHMICH, S. L.; SHERMAN, B. A.; FIKRIG, E. A comparison of serologic tests for the detection of serum antibodies to whole-cell and recombinant *Borrelia burgdorferi* antigens in cattle. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 45, n. 8, p. 667-674, 2004.

MEDRONHO, R.A. **Epidemiologia**. São Paulo: Atheneu, 2004.493 p.

MERINO, F.J.; SERRANO, J.L.; SAZ, J.V.; NEBREDA, T.; GEGUNDEZ, M.; BELTRAN, M. Epidemiological characteristics of dogs with Lyme borrelioses in the province of Soria. **European Journal Epidemiology**. v.16, n.2, p.97-100, 2000.

O'DWYER, L.H.; MASSARD, C.L.; SOUZA, J.C.P. *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.94, p.143-150, 2001.

O'DWYER, L.H.; SOARES, C.O.; MASSARD, C.L.; SOUZA, J.C.P.; FLAUSINO, W.; FONSECA, A.H. Soroprevalência de *Borrelia burgdorferi latu sensu* associada à presença de carrapatos em cães de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p.201-205, 2004.

OLIVEIRA, A.; FONSECA, A. H.; ISHIKAWA, M. M.; YOSHINARI, N. H. Cinética do crescimento de *Borrelia burgdorferi* (Spirochaetaceae) em diferentes meios de cultivo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 61-64, 2004.

PFISTER, H. W.; WILSKE, B.; WEBER, K. Lyme borreliosis:basic science and clinical aspects. **The Lancet**, v.343, p. 1013-1016, 1994.

QUINN P. J.; MARKEY, B. K.;CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. Espiroquetas. In: **Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas**. 1ºed. Blackwell Science Publishing Oxford: Art Médica, 2002. p. 179-188.

SALGADO, F. P. Dissertação de Mestrado. 2006. **Identificação de hemoparasitos e carrapatos de cães procedentes do centro de controle de zoonoses de Campo Grande Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil**. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 55p.

SALLES, R.S.; FONSECA, A.H.; SCOFIELD, A.; MADUREIRA, R.C., YOSHINARI, N.H. **Sorologia para *Borrelia burgdorferi latu sensu* em equinos no estado do Rio de Janeiro**. A Hora Veterinária, v. 127, p. 46-49, 2002.

SANTOS, M.; JÚNIOR, V.H.; RIBEIRO-RODRIGUES, R.; TALHARI, S. Borreliose de Lyme. **Anais Brasileiro de Dermatologia**. v.85, n.6: p.930-938, 2010.

SANTOS, V.G. Aspectos clínicos e laboratoriais da Cinomose, Ehrlichiose e Borreliose em cães (*Canis familiaris, linnaeus, 1758*) naturalmente infectados. Dissertação de mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 58p, 2008.

SCOFIELD, A.; MARQUES, C. C.; BARBOSA, J. D.; FONSECA, A. H. Ocorrência de *Borrelia* sp. em búfalo (*Bubalus bubalis*) no município de Castanhal, Estado do Pará. In: **Anais do V Congresso Brasileiro de Buiatria**. In CD-ROM, 2005.

SMITH, R. D.; ROGERS, A. B. *Borrelia theileri*: A review. **Journal of Spirochetel and Tickborne Diseases**, v. 5, n. 4, p. 63-68, 1998.

SOARES, C.O.; ISHIKAWA, M.M.; FONSECA, A.H.; YOSHINARI, N.H. *Borrelioses*, agentes e vetores. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 1-19, 2000.

SOARES, C. O. Estudo da Borreliose canina: imunodiagnóstico soropidemiologia e análise interativa com a babesiose canina. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro. 80p, 1998.

SOARES, C.O.; FONSECA, A.H.; ISHIKAWA, M.M.; MANERA, G.B.; SCOFIELD, A.; YOSHINARI, N.H. Sorologia para borreliose em cães procedentes da Baixada Fluminense, estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 21, n. 3, p. 111-114. 1999.

STEERE, A. C.; MALAWISTA S.E.; SNYDMAN, D. R.; SHOPE, R. E.; ANDIMAN, W. A.; ROSS, M. R. STEERE, R. M. Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. **The Arthritis Rheumatology**, p. 20-27, 1977.

THRUSFIELD, M. V. **Veterinary epidemiology**. 2nd. ed. Oxford: Blackwell, 479 p. 1995.

TORRENCE, M.E.; SUZANNE, R.J.; JAY, F.L.; WILLIAM, L.N.; KEVIN D.P. Serosurvey of shelter dogs in Virginia for antibodies to *Borrelia burgdorferi*. **Preventive Veterinary Medicine**, v.10, n.1-2, p.41-46, 1990.

WALKER, R. L.; READ, D. H.; HAYES, D. C.; Nordhausen, R. W. Equine abortion associated with the *Borrelia parkeri-B. turicatae* tick-borne relapsing fever spirochete group. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1558-1562, 2002.

WANG, G.; AGUERO-ROSENFELD, M.E.; WORMSER, G.P.; SCHWARTZ, I. Detection of *Borrelia burgdorferi*. In: SAMUELS, D.S.; RADOLF, J.D. **Borrelia**: Molecular Biology, Host Interaction and Pathogenesis. 1<sup>st</sup>. ed., Norfolk, United Kingdom: Caister Academic Press, 2010. p.443-466.

WELLS, S. J.; TRENT, A. M.; ROBINSON, R. A.; KNUTSON, K. S.; BE, R. F. Association between clinical lameness and *Borrelia burgdorferi* antibody in dairy cows. **The American Journal Veterinary Research**, v. 54, n. 3, p. 398-405, 1993.

YOSHINARI, N.H.; MANTOVANI, E.; BONOLDI, V.L.N.; MARANGONI, R.G.; GAUDITANO, G. Doença de Lyme-símile Brasileira ou Síndrome Baggio-Yoshinari:



Zoonose exótica e emergente transmitida por carrapatos. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v.56, n.3: p.363-369, 2010.

YOSHINARI, N.H.; ABRÃO, M.G.; BONOLDI, V.L.M.; SOARES, C.O.; MADRUGA, C.R., SCOFIELD, A.; MASSARD, C.L.; FONSECA, A.H. Coexistence of Antibodies to Tick-borne Agents of Babesiosis and Lyme Borreliosis in Patients from Cotia County, State of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.98, n.3, p.311-318, 2003.

YOSHINARI, N.H.; BARROS, P.J.L.; BONOLDI, V.L.N.; ISHIKAWA, M.; BARROS-BATTESTI, D.M.; PIRANA, S.; FONSECA, A.H.; SCHUMAKER, T.T. Perfil da Borreliose de Lyme no Brasil. **Revista do Hospital das Clínicas Faculdade de Medicina**, São Paulo, v.52, n.2, p.111-117, 1997.

## CONCLUSÕES GERAIS

Considerando-se os objetivos propostos pelo presente estudo, a metodologia empregada e os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Os caninos do município de Seropédica são potenciais sentinelas para *Rickettsia* spp. e *Borrelia* spp.
- O hábito de caninos frequentarem matas e pastos não influenciaram na presença de anticorpos séricos anti-rickettsia do grupo da febre maculosa e *Borrelia* spp.
- As únicas espécies de carrapatos encontradas foram, *R. sanguineus*, um carrapato típico de área urbana, e *A. cajennense*, um carrapato comum em cavalos e capivaras, que estão presentes em Seropédica.
- A vigilância para essas zoonoses deve ser aumentada em função da presença de anticorpos circulantes, e pelo fato de já ter ocorrido caso de FMB no município.

## ANEXOS

## ANEXO I

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

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Com o objetivo de avaliar a circulação de rickettsia do grupo da febre maculosa no município de Seropédica - RJ, eu \_\_\_\_\_ fui convidado a participar de um estudo que irá avaliar a presença de anticorpos específicos contra a bactéria *Rickettsia rickettsii* que pode causar doenças em animais domésticos e silvestres como também no homem.

A febre maculosa brasileira é uma doença causada pela *Rickettsia rickettsii*, transmitida através de picada de carrapato. A espécie mais importante de carrapato aqui no Brasil, é *Amblyomma cajennense*. Sua forma adulta é conhecida como carrapato estrela, carrapato redoleiro ou carrapato do cavalo. Suas formas mais jovens (larvas e ninfas) são conhecidas como micuins.

Esta doença pode causar diversas manifestações clínicas que vão desde febre, dor de cabeça, mal-estar, dores no corpo, cansaço, lesão de pele semelhante a picadas de mosquito, e lesões que podem levar o indivíduo à morte.

Felizmente, o reconhecimento clínico e diagnóstico precoce permitem que o indivíduo seja tratado e curado com facilidade e sucesso.

Para isso, eu preciso consentir que se retire sangue do(s) meu(s) animal(s) para que seja investigada a possibilidade de ter sido infectado(s) recentemente pela *Rickettsia rickettsii* ou já ter tido infecção passada. A coleta será realizada através de punção venosa por médicos veterinários e o material será levado ao Laboratório de Doenças Parasitárias da UFRRJ e para o Laboratório de Carrapatos da SUSCEN - Mogi Guaçu-SP, para pesquisar a presença de infecção causada pela bactéria acima descrita.

Pelos resultados fornecidos nos próximos meses, eu ficarei sabendo se meu(s) animal(s) teve(ram) contato com a bactéria *R. rickettsii* recentemente ou no passado. Autorizo, portanto, aos profissionais da UFRRJ a utilizar uma amostra do sangue de meu(s) animal(s) para realização dos exames. Os resultados desta pesquisa poderão ser utilizados para publicação e notificação destes às Instituições de Saúde Pública em nível do Ministério da Saúde e Secretarias de Saúde Estadual e Municipal.

Caso tenha alguma dúvida ou necessidade de qualquer esclarecimento sobre o estudo, você pode entrar em contato com os pesquisadores relacionados abaixo:

**Laboratório de Bacteriologia**  
**Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária**  
**BR 465 Km 7 Seropédica/RJ**  
**Telefone: (21) 2682-2940 Ramal 323**

Miliane Moreira Soares de Souza  
Adivaldo Henrique da Fonseca  
Matheus Dias Cordeiro

Assinatura: \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone para contato: \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador responsável: \_\_\_\_\_

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

ANEXO 2

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

Questionário para os proprietários de caninos: Número da coleta: \_\_\_\_\_

Nome \_\_\_\_\_ do \_\_\_\_\_ animal: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_  
Raça: \_\_\_\_\_ Pelagem: \_\_\_\_\_

Nome do proprietário: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Você tem seu cão há aproximadamente quanto tempo? \_\_\_\_\_

Se o pegou já em idade adulta, onde ele vivia antes? \_\_\_\_\_

Já teve alguma doença? \_\_\_\_\_ Leva ao veterinário com que frequência? \_\_\_\_\_

Como ele vive:

Preso em corrente  Solto  Preso em corrente, às vezes solto

Se ele fica solto, mesmo que de vez em quando, quais são os locais que ele frequenta? \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Ele frequenta pastos onde têm cavalos?

Sim  Não  Às vezes

Frequenta currais?

Sim  Não  Às vezes

Tem visto carrapatos no seu cão?

Sim, em grande quantidade  Sim, apenas de vez em quando  Não

Tem visto pulgas no seu cão?

Sim, em grande quantidade  Sim, apenas de vez em quando  Não

Faz tratamento contra vermes?  
carrapatos?

Sim  Não

Frequência: \_\_\_\_\_

Faz tratamento contra

Sim  Não

Frequência: \_\_\_\_\_

Seu cão frequenta matas?  
hábitos de caça?

Sim  Não  Às vezes

Se frequenta matas, ele tem

Sim  Não

Quais são os animais silvestres já vistos ao redor da propriedade?

Não tem  Capivaras  Antas  Pequenos roedores

Outros. Cite quais: \_\_\_\_\_

Comentários: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

## ANEXO 3



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
DECANATO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NA PESQUISA DA UFRRJ / COMEP

Protocolo N° 093/2010

### PARECER

O Projeto de Pesquisa intitulado "*Diagnóstico de riquetsias do grupo da febre maculosa em animais e carrapatos na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro no município de Seropédica no Estado do Rio de Janeiro*" sob a responsabilidade da Profa. Dra. Miliane Moreira Soares de Souza do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária do Instituto de Veterinária, processo 23083.008239/2010-31, atende aos princípios básicos para pesquisa envolvendo o uso de animais e está de acordo com os princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação.

UFRRJ, 15/02/2011.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Aurea Echevarria Neves Lima'.

Prof. Dra. Aurea Echevarria Neves Lima

Decana de Pesquisa e Pós-graduação

## ANEXO 4

### ELISA INDIRETO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI-*Borrelia* spp.

1. Sensibilizar a placa (Corning® Costar® 3590, USA) com o antígeno na concentração de **15 µg/mL**, diluindo-o em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6. Colocar **100 µL/well**, exceto no branco da placa;
2. Incubar “overnight” em câmara úmida (4°C – geladeira);
3. Lavar bem 3x com PBS Tween 20;
4. Bloquear com solução PBS Tween 20+ 5% leite em pó (Molico), colocando **200 µL/well**;
5. Incubar em câmara úmida, a 37°C, durante 1h 30min;
6. Lavar bem 3x com PBS Tween 20;
7. Diluir os soros em PBS Tween 20, na diluição de **1:800**. Colocar **100 µL /well**;
8. Incubar em câmara úmida à 37°C, durante 1h30min;
9. Lavar bem 3x com PBS Tween 20;
10. Adicionar o conjugado anti-canino diluído em PBS Tween 20, colocando **100 µL/well**.  
**Conjugado utilizado:** Sigma anti-dog IgG Alkaline Phosphatase Conjugate – diluição 1:5000
11. Incubar em câmara úmida, a 37°C, durante 1h30min
12. Lavar bem 3x com PBS Tween 20;
13. Adicionar o substrato para fosfatase alcalina, o P-nitrofenilfosfato, colocando **100 µL/well**. Diluir 2 comprimidos do substrato (5mg cada comprimido) em 10 mL de Tampão dietanolamina. Usar frasco escuro ou enrolar em papel alumínio. Se o comprimido for de 20mg diluir 1 em 20mL de Tampão dietanolamina.  
Cuidado ao usar a multicanal, pois poderá faltar substrato para os últimos pocinhos;
14. Fazer a leitura da placa em filtro de 405nm, após incubação à temperatura ambiente durante 45 minutos.