

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

JÉSSICA DE SOUZA FREITAS

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA INFECÇÃO POR *Rickettsia* sp. EM
EQUÍDEOS NA MICRORREGIÃO ILHÉUS - ITABUNA**

ILHEUS – BAHIA

2018

JÉSSICA DE SOUZA FREITAS

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA INFECÇÃO POR *Rickettsia* sp. EM
EQUÍDEOS NA MICRORREGIÃO ILHÉUS - ITABUNA**

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Ciência Animal.

Área de concentração: Clínica e
Sanidade Animal

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Dias
Munhoz.

**ILHÉUS – BAHIA
2018**

F866

Freitas, Jéssica de Souza.

Diagnóstico sorológico da infecção por *Rickettsia* sp. em equídeos na microrregião Ilhéus – Itabuna / Jéssica de Souza Freitas. – Ilhéus, BA: UESC, 2018. xiii, 53 f. : il.

Orientador: Alexandre Dias Munhoz.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

Inclui referências e apêndice.

1. Carrapato. 2. Babesiose. 3. Cavalos – Doenças. 4. Epidemiologia. 5. Saúde pública I. Título.

CDD 595.42

JÉSSICA DE SOUZA FREITAS

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA INFECÇÃO POR *Rickettsia* sp. EM
EQUÍDEOS NA MICRORREGIÃO ILHÉUS - ITABUNA**

Ilhéus – BA, 27/02/2018

Alexandre Dias Munhoz – DCs
UESC/DCAA
(Orientador)

George Rego Albuquerque – DCs
UESC/DCAA

Hermes Ribeiro Luz – PhD
USP/VPS

**ILHÉUS – BAHIA
2018**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família por todo amor a mim oferecido, amigos, e equipe de trabalho pelo incentivo constante.

AGRADECIMENTOS

É chegado o encerramento de mais um ciclo em minha vida, não cheguei até aqui só, de forma que são necessários muitos agradecimentos. Inicialmente, agradeço à Deus pelo dom da vida, por ter me guiado até este momento. Agradeço à minha mãe que mesmo em sua falta de conhecimento sobre o conteúdo da minha dissertação, se mostrava disposta a contribuir com soluções. Agradeço à meu pai por acreditar em meu potencial. Ao meu irmão, que sempre se orgulhou em me ver fazendo pós-graduação, e incentivo constante nos estudos.

Agradeço ao professor Dr. Alexandre Munhoz, por me acompanhar enquanto aluna de Iniciação Científica desde o quinto semestre até a conclusão da graduação. E em seguida por me orientar durante o mestrado, sempre atento às melhores possibilidades, disponível a sanar inúmeras dúvidas que surgiam. Muito obrigada pela oportunidade, confiança e ensinamentos.

Agradeço imensamente à toda equipe de pesquisa que se fizeram mais que colegas, e sim amigos, sem os quais esse trabalho teria sido muito mais árduo, dentre eles estão: Ana Paula Calazans, Aisla Nascimento, Gabriela Mota, Graziela Deiró, Lilia Alves, Luciana Lacerda, Sônia Lopo, Uillians Volkart. Destaco dentro dessa equipe, ainda, a minha amiga Rebeca Dálety, companheira de graduação e em seguida de mestrado, sempre me ajudando, escutando, trabalhando lado a lado. Agradeço aos alunos de Iniciação Científica por ajudar sempre que possível: Ana Luiza Campos, Fabiana Barbosa e José Varjão.

Agradeço ao Dr. Matheus Dias Cordeiro, e a todos que constituem a equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias, por me acolher na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, mostrando-se sempre disponíveis à esclarecimentos de dúvidas, bem como ao professor Dr. Adivaldo Henrique da Fonseca, cedendo os antígenos utilizados nesse trabalho e a cepa *Rickettsia parkeri*, possibilitando assim, o cultivo da mesma na Universidade Estadual de Santa Cruz.

Agradeço a professora Dra. Nathalie Costa da Cunha, Universidade Federal Fluminense - UFF, por me receber em seu laboratório, me ajudando na familiarização com a leitura de lâminas de RIFI, e cedendo controles positivo e negativo para as reações, seguida de sua aluna de Iniciação Científica, Marcielli Almeida, me ajudando durante o período que estive na UFF.

Agradeço à aluna de doutorado em História da UFRRJ, Nara Tinoco, por dividir seu quarto comigo durante minha estadia nesta instituição. À residente de patologia clínica veterinária da UFF, Juliana Guerth, por me receber em sua casa durante o período que estive em Nitérois, me fazendo companhia sempre.

Agradeço ao PhD. Hermes Ribeiro Luz, por se mostrar disponível e me auxiliar na identificação dos carrapatos.

Aos parceiros de pesquisa da UESC, pertencentes aos Laboratórios de Genética Animal, Parasitologia Veterinária, Microbiologia e Virologia Animal, minha eterna gratidão por tornar o trabalho mais leve, sempre dispostos a ajudar e propor ideias.

Agradeço imensamente aos proprietários dos equídeos, bem como aos animais que à sua maneira contribuíram para o sucesso desta pesquisa.

“Consagre ao Senhor tudo o que você faz,
e os seus planos serão bem-sucedidos”

(Provérbios 16:3)

DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA INFECÇÃO POR *Rickettsia* sp. EM EQUÍDEOS NA MICRORREGIÃO ILHÉUS - ITABUNA

RESUMO

Objetivou-se com esse estudo verificar a ocorrência de equídeos reativos sorologicamente à antígenos de *Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia parkeri*, e fatores associados a infecção na microrregião Ilhéus - Itabuna, Bahia, avaliando, através destes animais, considerados sentinelas, um possível foco para ocorrência da Febre Maculosa. 569 equídeos fizeram parte do estudo. Destes, 516 foram provenientes de propriedades da zona rural e 53 de animais oriundas da zona urbana. Utilizou-se a reação de imunofluorescência indireta para sorologia. Os proprietários dos animais foram submetidos a uma entrevista semi-estruturada, para determinação dos fatores associados à infecção, realizada através de uma regressão logística não condicional. Realizou-se a PCR em carrapatos coletados nas propriedades na tentativa de identificação de DNA das bactérias. Como resultado sorológico, encontrou-se uma prevalência total de 33,4% (190/569) equídeos positivos para *Rickettsia* sp, sendo 14,6% (83/569) dos animais positivos apenas para antígenos de *R. rickettsii*, 15,1% (86/569) positivos apenas para antígenos de *R. parkeri*, e 3,7% (21/569) positivos para ambos os antígenos. Foram identificados como fatores de risco “ser equino” e “ter idade superior a três anos”. Todos os carrapatos foram negativos ao gene *gltA*, que identifica o gênero *Rickettsia*. Os resultados comprovam uma exposição dos equídeos as *Rickettsias* do grupo da febre maculosa (GFM) em toda a região, sendo necessário estudos futuros para determinar, quais *Rickettsias* e seus vetores estão presentes na mesma, por fim os resultados reforçam o papel dos equídeos como sentinelas para a infecção de agentes do GFM.

Palavras-chave: Carrapato. Febre Maculosa. Equídeos. Prevalência. Saúde Pública.

SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF INFECTION BY *Rickettsia* sp. IN EQUINES IN THE MICROREGION ILHÉUS - ITABUNA

ABSTRACT

The objective of this study was to verify the occurrence of serologically reactive equidae to the *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia parkeri* antigens, and factors associated with infection in the Ilhéus - Itabuna, Bahia microregion, evaluating, through these animals, sentinels, a possible focus for occurrence of Rocky Mountain spotted fever. 569 equidae were part of the study. Of these, 516 came from properties in the rural area and 53 from animals from the urban area. The indirect immunofluorescence reaction was used for serology. The owners of the animals were submitted to a semi-structured interview, to determine the factors associated with the infection, performed through a non-conditional logistic regression. PCR was performed on ticks collected on the properties in an attempt to identify DNA from the bacteria. As a serological result, a total prevalence of 33.4% (190/569) equids positive for *Rickettsia* sp was found, of which 14.6% (83/569) of the animals were positive only for *R. rickettsii* antigens, 15.1 (86/569) positive for *R. parkeri* antigens and 3.7% (21/569) positive for both antigens. "Equine" and "being over three years old" were identified as risk factors. All ticks were negative to the *gltA* gene, which identifies the genus *Rickettsia*. The results confirm the exposure of the equidae to the Rickettsiae of the spotted fever group (GFM) throughout the region, and future studies are necessary to determine which Rickettsiae and their vectors are present in the region. Finally, the results reinforce the role of equines as sentinels for the infection of GFM agents.

Keywords: Tick. Rocky Mountain spotted fever. Equines. Prevalence. Public health.

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pagina
1	Mapa da microrregião Ilhéus – Itabuna, Bahia, em destaque a localização dos municípios em que foram realizados as coletas.	27
2	Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,0%, corada com Syber safe. Os amplicons em questão referem-se à PCR para verificar a integridade do DNA dos carrapatos, de acordo com a sequência parcial do gene 16S. Canal 1: Marcador molecular numa escala de 100 pares de base ((Invitrogen®); Canal 2: Controle Positivo; Canal 3: Controle Negativo; Canais 4,5,6 e 7: Amostras positivas.	35

LISTA DE TABELAS

Tabela		Pagina
1	Espécies de Rickettsias patogênicas, seguidas da enfermidade que causam e distribuição mundial.	16
2	Lista dos primers utilizados em reações de PCR para verificação da integridade do DNA e verificação da presença de rickettsias nos carrapatos.	30
3	Distribuição dos títulos de anticorpos observados contra antígenos de <i>R. rickettsii</i> e <i>R. parkeri</i> em respostas isoladas e ou mista em equídeos da microrregião Ilhéus – Itabuna, Bahia.	32
4	Ocorrência de títulos de anticorpos observados anti- <i>Rickettsia rickettsii</i> e anti- <i>Rickettsia parkeri</i> em respostas isoladas em equídeos, por município, da microrregião Ilhéus – Itabuna, Bahia.	32
5	Distribuição dos equídeos positivos contra antígenos de <i>R. rickettsii</i> e <i>R.parkeri</i> , em respostas isoladas ou mistas, em equídeos da microrregião Ilhéus – Itabuna, Bahia	33
6	Fatores com plausibilidade biológica associados às infecções por <i>Rickettsia rickettsii</i> em equídeos da microrregião Ilhéus – Itabuna, Bahia.	34
7	Modelo preliminar da regressão logística não-condicional dos fatores associados à infecção pela <i>R. rickettsii</i> em equídeos da microrregião Ilhéus – Itabuna, Bahia.	34
8	Modelo final de regressão logística não condicional dos fatores associados à infecção por <i>R. rickettsii</i> em equídeos da microrregião Ilhéus – Itabuna, Bahia.	34

SUMÁRIO

RESUMO	XIII
ABSTRACT.....	IX
1.INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS	15
2.1 Geral.....	15
2.2 Específico.....	15
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3.1 Aspectos Gerais.....	16
3.2 Histórico na América do Sul e Brasil.....	18
3.3 Vetores.....	20
3.4 Hospedeiros.....	21
3.5 Transmissão.....	22
3.6 Patogenia.....	23
3.7 Aspectos clínicos.....	24
3.8 Diagnóstico.....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 Local do Estudo.....	27
4.2 Coleta e Processamento das amostras.....	28
4.3 Coleta dos Carrapatos.....	28
4.4 Sorologia para <i>Rickettsia rickettsii</i> e <i>Rickettsia parkeri</i>	29
4.5 Extração do DNA Genômico dos Carrapatos e Análise Molecular.....	29
4.6 Delineamento Estatístico.....	30
5. RESULTADOS.....	31
6. DISCUSSÃO.....	36
7. CONCLUSÕES.....	40
8. REFERENCIAS.....	41

9. APÊNDICE.....	50
Apendice I: Entrevista semi-estruturada aplicada nas fazendas durante as coletas dos sangues dos animais.....	50
10. ANEXOS.....	52
Anexo I: Técnica de Sorologia da RIFI para <i>Rickettsia rickettsii</i> e <i>Rickettsia parkeri</i>.....	52
Anexo II: Técnica de Sensibilização das lâminas de RIFI para os agentes <i>Rickettsia rickettsii</i> e <i>Rickettsia parkeri</i>.....	53

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Rickettsia*, família Rickettsiaceae, comporta diferentes espécies de bactérias gram-negativas, intracelulares obrigatórias, pleomórficas, possuindo curto tempo de vida fora de seus hospedeiros.

As riquetsias possuem ampla distribuição em regiões tropicais e subtropicais, porém já foram diagnosticadas em todos os continentes. A Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (Rocky Mountain Spotted Fever), é uma zoonose de caráter endêmico letal para os humanos e tem como agente infeccioso a bactéria *Rickettsia rickettsii*. A primeira descrição dessa enfermidade ocorreu nos Estados Unidos por Howard Taylor Ricketts em 1909, havendo o primeiro isolamento deste agente etiológico (RICKETTS, 1909).

No Brasil, a relata-se a primeira descrição na década de 20, levando o nome a princípio de “Tifo exantemático” no estado de São Paulo. Alguns anos mais tarde, essa doença passou a se chamar Febre Maculosa Brasileira (FMB), por conta da similaridade com a doença relatada nos Estados Unidos.

Considerada como uma doença de notificação obrigatória desde 2001 – portaria 2325/GM –, apresenta considerável impacto na saúde pública, devido a sua dificuldade em ser diagnosticada além de alta letalidade em casos humanos que não possuem tratamento precoce (GRECA; LANGONI; SOUZA, 2008). Verificou-se a ocorrência dessa bactéria em seres humanos nos estados da Bahia, Espírito Santo, Mato Grosso, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo (HORTA, 2002; MADEIRA, 2004; FREITAS et al., 2010).

A transmissão da maior parte dessas bactérias ocorre de artrópodes (carrapatos, piolhos e pulgas) à vertebrados (FOURNIER; RAOULT, 2009). Os mamíferos, por sua vez, são hospedeiros da maior parte das espécies de carrapatos (PADILHA, 2010).

Os principais vetores de *Rickettsia* sp., pertencem ao gênero *Amblyomma*. De acordo com análises biológicas (LABRUNA et al., 2011; MASTROPADO et al., 2011), moleculares (BEATI et al., 2013) e morfológicas (NAVA et al., 2014), dividiu-se a taxonomia *Amblyomma cajennense* em seis espécies dentre elas estão: *A. cajennense* (sensu stricto) – restrito à região Amazônica –, *A. mixtum* (Koch, 1844) – presente do Texas ao oeste do

Equador –, *A. sculptum* (Berlese, 1888) – norte da Argentina, Bolívia, Paraguai e Brasil –, *A. interandinum* (Beati, Nava & Cáceres, 2014) – Vale inter-andino do Peru –, *A. tonelliae* (Nava, Beati & Labruna, 2014) – Áreas secas do norte da Argentina, Bolívia e Paraguai –, e *A. patinoi* (Labruna, Nava & Beati, 2014) – Andes orientais da Colômbia.

Carrapatos do gênero *Amblyomma*, distribuem-se por todo território brasileiro, dentre eles estão: *A. aureolatum*, identificado em animais silvestres, *A. ovale*, e *A. sculptum*, popularmente conhecido como “carrapato estrela ou do cavalo”, sendo seu principal vetor (GUEDES et al., 2005; PINTER; LABRUNA, 2006; PINTER et al., 2016).

Informações de quais espécies de carrapatos existem nos estados do Nordeste, bem como as doenças que os mesmos causam em equídeos são escassas. A equideocultura, vem se constituindo uma importante atividade econômica no Nordeste, e no estado da Bahia, envolvendo desde animais utilizados para trabalho até animais com alto valor zootécnico, para realização de atividades esportivas.

Equídeos são apontados como principais hospedeiros para todos os estágios de desenvolvimento do *A. sculptum*, entretanto em situações de alta infestação, estes vetores podem ser encontrados parasitando inúmeras espécies de animais silvestres e domésticos, incluindo o homem (CORDEIRO, 2015). Apresentam-se como animais sentinelas na vigilância da Febre Maculosa, pois podem se infectar sem demonstrar sintomatologia clínica (LABRUNA et al., 2002).

Dessa forma, estudos sorológicos em áreas onde os seres humanos estão susceptíveis ao contato com essa espécie de carrapato se fazem necessários.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Verificar a ocorrência de equídeos reativos sorologicamente à antígenos de *Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia parkeri*, através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) na microrregião Ilhéus – Itabuna.

2.2 Específicos

- Determinar a frequência de animais positivos para *R. rickettsii* e *R. parkeri* na região do estudo;
- Determinar os possíveis fatores associados à infecção;
- Verificar a presença de vetores com a presença de Rickettsias.

3. REVISÃO DE LITERATURA:

3.1 Aspectos gerais

As Rickettsias são bactérias pertencentes ao filo das Proteobactérias, classe Alphaproteobactérias, ordem Rickettsiales, à família das *Rickettsiaceae*, gênero *Rickettsia* (GARRITY et al., 2004). São bactérias de forma cocobacilar, gram-negativas, intracelulares obrigatórias, possuindo pequenas dimensões em torno de 0,8 a 2 µm de comprimento e 0,3 a 0,5 µm de diâmetro (DUMLER et al., 2001). Devido a presença de peptidoglicanos e lipopolissacarídeos (LPS) em sua parede celular (MCDADE; NEWHOUSE, 1986), reações imunitárias cruzadas podem ocorrer entre as riquetsias do Grupo Febre Maculosa - GFM (BACELLAR, 1996).

Realizam sua multiplicação através de fissão binária simples, colonizam e possuem predileção por glândulas salivares e ovários de seus hospedeiros artrópodes, mas também infectam e conseguem se multiplicar em células dos intestinos, túbulos de malpighi e hemolinfa desses hospedeiros (GIMENEZ, 1964; BURGDORFER, 1975; WEISS; MOULDER, 1984; BILLINGS et al., 1998; YU; WALKER, 2003).

As riquetsias possuem a característica de invadir o citoplasma das células que infectam, com exceção das pertencentes ao GFM, que eventualmente podem ser encontradas também intranucleares (MELLES; COLOMBRO; LEMOS, 2012). A forma como ocorre a invasão celular por parte desse parasita ainda não foi completamente elucidada, sabe-se que envolve um complexo grupo proteico, juntamente com a ação de algumas células endoteliais, conferindo um papel importante durante a regulação da resposta imunológica de acordo com suas funções biológicas e localização (REED; SERIO; WELCH, 2012).

Capazes de causar doenças de caráter endêmico, as riquetsias estão largamente distribuídas pelo mundo. Essas zoonoses, são causadas principalmente pelos agentes pertencentes ao GFM, em sua maior parte associada ao vetor carrapato (PADDOCK; PAROLA; RAOULT, 2005), possuindo características variadas, não se corando pelo método de Gram, sendo coradas pelas técnicas de Gimenez ou Giemsa (WEISS; MOULDER, 1984).

Levando em consideração características morfológicas, moleculares, antigênicas e ecológicas Parola et al (2013), propuseram uma filogenia para o gênero *Rickettsia*, determinando os seguintes grupos: i) Grupo Tifo (GT) constituído pelas espécies *R. prowazekii* e *R. typhi*, associadas a piolhos e pulgas, respectivamente; ii) Grupo da Febre Maculosa, sendo este o maior grupo, composto por mais de vinte espécies; iii) Grupo *Canadensis*, composto pela espécie *R. canadensis*; iv) Grupo *Bellii*, possuindo como representante a espécie *R. bellii*.

Alguns autores, como Weinert et al (2009), consideram a uma filogenia para o gênero *Rickettsia* de forma distinta da anteriormente citada, considerando a seguinte divisão: i) Grupo Tifo; ii) Grupo da Febre Maculosa (Spotted Fever Group – SFG); iii) Grupo Ancestral, contendo *R. bellii* e *R. canadensis*, no entanto a posição desta última seria incerta; iv) Grupo Transição, contendo *R. felis*, *R. akari* e *R. australis*.

As espécies do GFM aparentemente estão associadas a distribuição de seus vetores. De acordo com Labruna (2009) e Parola et al (2013), as principais espécies que apresentam-se patogênicas ao homem na América do Sul estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1: Principais espécies de *Rickettsias* presentes na América do Sul.

<i>Rickettsia</i> sp.	Local de Ocorrência
<i>R. rickettsii</i> ¹	Argentina, Brasil e Colômbia
<i>R. parkeri</i> ¹	Argentina, Bolívia, Brasil e Uruguai
<i>R. massiliae</i> ¹	Argentina
<i>R. cepa Mata Atlântica</i> ¹	Brasil
<i>R. rhipicephali</i> ¹	Brasil
<i>R. bellii</i> ¹	Argentina, Brasil e Peru
<i>R. monteiroi</i> ¹	Brasil
<i>R. amblyommatis</i>	Argentina, Brasil e Guiana Francesa
“ <i>Candidatus R. andeanae</i> ” ¹	Argentina, Chile e Peru
<i>R. felis</i> ²	Argentina, Brasil, Chile, Peru e Uruguai

Fonte: ¹ Parola et al. (2013); ² Labruna (2009).

3.2 Histórico na América do Sul e Brasil

Antes do ano 2000, tinha-se conhecimento da ocorrência de apenas três espécies de riquetsias na América do Sul, sendo elas *R. prowazekii*, *R. typhi* e *R. rickettsii*, transmitidas por piolhos, pulgas e carrapatos, respectivamente (LABRUNA, 2009; KRAWCZAK et al., 2014). No século XXI, várias espécies de riquetsias foram descritas na América do Sul, dentre elas: *R. felis* infectando pulgas, ocorrendo na Argentina, Brasil, Chile, Peru e Uruguai; *R. parkeri* possuindo como vetor carrapatos, no Brasil e Argentina; *R. massiliae* infectando carrapatos, Argentina; *R. bellii*, infectando carrapatos, Argentina e Brasil; *R. rhipicephali* infectando carrapatos, Brasil; “Candidatus *R. andeanae*”, infectando carrapatos no Peru e Brasil (LABRUNA, 2009), *R. amblyommatis* infectando carrapatos, Argentina, Brasil e Guiana Francesa (KARPATY et al., 2016). Todas essas espécies estão incluídas como pertencentes ao GFM, com exceção da *R. bellii*.

As primeiras descrições da doença no Brasil ocorreram na década de 20, estado de São Paulo, onde foram relatados 88 casos, em seres humanos (MONTEIRO, 1933). O primeiro relato no estado da Bahia, foi realizado por Mancini et al., (1983), referente a um caso presuntivo de febre maculosa, possuindo como agente causal a *R. rickettsii*, na cidade de Salvador, ano de 1979.

Esta doença apresenta alta dificuldade em seu diagnóstico devido à diversidade de agentes etiológicos juntamente com a alta mortalidade em casos não tratados precocemente (GRECA; LANGONI ; SOUZA, 2009). Nota-se um aumento no número de casos registrados por parte dos indicadores epidemiológicos nacionais, podendo ser associado ao fato de ter se tornado uma doença de notificação obrigatória a partir do ano de 2001 (LABRUNA, 2009).

No GFM, a *R. rickettsii* se destaca como a mais patogênica e importante, sendo relatada com frequência no Brasil. De acordo com o Ministério da Saúde do Brasil, entre os anos de 2000 e 2017, houveram registros de 1.749 casos de Febre Maculosa, dentre as maiores ocorrências estão o estado de São Paulo (837 casos), Santa Catarina (402 casos), Minas gerais (235 casos), Rio de Janeiro (139 casos), Espírito Santo (68 casos), Paraná (35 casos), Rio Grande do Sul (11 casos) (SINAN, 2017). Considera-se que a FMB causada pelo

agente *R. rickettsii* seja umas das doenças com maior letalidade no estado de São Paulo (ANGERAMI et al., 2009). A região Sudeste registra a maioria das ocorrências, e conseqüentemente a maior ocorrência de óbitos, com 548 casos confirmados, de 2000 a 2017 (SINAN, 2017).

Nos últimos anos, a doença tem se disseminado à regiões anteriormente consideradas indenes para a FMB. No estado da Bahia, entre os anos de 2000 e 2016 foram registrados pela Secretaria de Saúde do Estado da Bahia (SESAB) 32 casos, destacando-se a capital Salvador detentora de 7 relatos ao longo desse período.

No Brasil, tem sido isoladas outras riquetsias do GFM, em carrapatos e pulgas, dentre elas estão *R. felis* (SANGIONI, 2003), *R. bellii* (HORTA et al., 2004), *R. parkeri* (SILVEIRA et al., 2007). Em inquéritos sorológicos, ainda assim, o antígeno mais empregado tem sido o da *R. rickettsii*. Porém pesquisas revelaram a presença de *R. parkeri* no Brasil (SILVEIRA et al., 2007, SPOLIDORIO et al., 2010), e esta espécie é comprovadamente causadora de FM nos Estados Unidos, e provavelmente no Uruguai (PADDOCK, 2005).

R. parkeri teve seu primeiro isolamento na Costa do Golfo, Estados Unidos, 1937, em *Amblyomma maculatum*, considerada a princípio não patogênica (PARKER et al., 1939). Somente no ano de 2004 teve sua patogenicidade comprovada, classificada como responsável pela FM em humanos na sua forma leve a moderada em muitos países do continente americano (PADDOCK et al., 2004).

No Sul do Brasil, estudos epidemiológicos auxiliados por técnicas moleculares constataram que um novo agente circulante na Mata Atlântica era uma riquetsia filogeneticamente próxima à *R. parkeri* (BARBIERI et al., 2014), Pouco tempo após, Krawczak et al (2016), reconheceu esse agente como causador de Febre Maculosa da Mata Atlântica, levando em consideração também os achados clínicos. Esse novo agente foi identificado em outros países tais como Colômbia, Argentina e América Central (PAROLA et al., 2013, LONDOÑO et al., 2014; LOPES et al., 2016).

3.3 Vetores

Carrapatos ixodídeos são os principais vetores da Febre Maculosa. Várias espécies do gênero *Rickettsia* tem sido consideradas simbiontes de artrópodes transmitidos verticalmente, sugerindo que esses vetores atuam como reservatórios ou amplificadores das riquetsias na natureza (PAROLA et al., 2013).

Os vetores da *R. rickettsii* variam de acordo com o país em questão. Nos Estados Unidos, os principais vetores são do gênero *Dermacentor*, destacando-se *D. andersoni* e *D. variabilis* (BEARD, 1998; NIEBILSKY et al., 1999). Porém, no Brasil, destaca-se o gênero *Amblyomma*, sendo apontado como principal vetor o *Amblyomma sculptum*, seguido pelo *A. aureolatum* – restrito por enquanto à cidade de São Paulo –, ambos conhecidos como “carrapato estrela” e “carrapato amarelo do cão”, respectivamente (LABRUNA, 2004). Podem ainda estar associadas à infecção por *R. rickettsii* o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* – conhecido popularmente como “carrapato marrom do cão” – (SZABÓ et al., 2006), *A. dubitatum* (DEL FIOLE et al., 2010) e *A. ovale* (SZABÓ et al., 2013)

Os carrapatos do gênero *Amblyomma* possuem um ciclo denominado trioxeno, apresentando baixa especificidade de hospedeiro, principalmente em suas fases imaturas (LABRUNA et al., 2009). As larvas ocorrem entre os meses de março a julho, sobrevivendo até 6 meses sem alimento, as ninfas octópodes ocorrem entre os meses de julho a novembro, atingindo a fase adulta de novembro a março, sobrevivendo de 1 a 2 anos, respectivamente, sem alimentar-se (DEL FIOLE et al., 2010).

As ninfas e larvas deste gênero utilizam para repasto sanguíneo preferencialmente pequenos roedores, marsupiais, aves silvestres e carnívoros (silvestres ou domésticos) (MARTINS et al., 2012).

Em território brasileiro as espécies circulantes descritas são *A. cajennense* (sensu lato), *A. cajennense* (sensu strictu) e *A. sculptum*, sendo possível diferenciação morfológica principalmente pela genital das fêmeas (NAVA et al., 2014; MARTINS et al., 2016). De acordo com Martins et al (2016), no estado da Bahia, relata-se a presença de *A. sculptum* e *A. cajennense* (s.l.).

– 3.4 Hospedeiros

As riquetsias são mantidas na natureza por meio de seus vetores artrópodes, porém frequentemente infectam vertebrados, estes últimos garantem que novas linhagens do artrópode adquiram a infecção através de repasto sanguíneo (AZAD; BEARD, 1998). Algumas bactérias apresentam-se altamente patogênicas aos carrapatos, impedindo dessa forma, que ocorra uma estabilidade enzoótica apenas por transmissão transovariana e longevidade transestadial, como por exemplo a *R. rickettsii* infectando *A. sculptum*.

Portanto, é necessário a presença de alguns animais que agem como amplificadores, desenvolvendo uma rickettsemia durante alguns dias, e permitindo a propagação da infecção tornando carrapatos não infectados em infectados, iniciando-se um novo ciclo riquetsial (LABRUNA, 2009).

Segundo Barros-Battesti (2006), um bom hospedeiro amplificador possui por característica ser frequentemente parasitado por estágios imaturos do vetor, e concomitantemente estar infectado pela bactéria, desenvolvendo uma bacteremia durante alguns dias, garantindo que novos vetores se infectem por repasto sanguíneo.

De acordo com Labruna (2009), para que um vertebrado seja classificado como hospedeiro amplificador de bactéria ele deve preencher cinco “requisitos” tais como: (i) ser abundante em áreas endêmicas para a FM; (ii) ser um bom hospedeiro natural do carrapato vetor; (iii) ser passível à infecção por *R. rickettsii*; (iv) manter níveis circulantes da bactéria na corrente sanguínea suficiente para gerar novas infecções à vetores que se alimentem nele; (v) possuir elevada taxa de renovação populacional, entrando dessa forma em ambientes que possuam animais passíveis de adquirir a doença.

Horta et al. (2007), descreveram a capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*.) e o gambá (*Didelphis* sp.) como amplificadores da espécie *R. rickettsii* em *A. cajennense* (s.l.) submetidos a condições experimentais, pois ambos foram capazes de servir como fonte de infecção para vários carrapatos presentes em território brasileiro. Além destes dois animais, o coelho do mato (*Sylvilagus brasiliensis*) e o cão doméstico (*Canis familiaris*) também são apontados como bons amplificadores (DIAS; MARTINS, 1939).

De acordo com Sangioni et al (2005), os equinos são capazes de ser parasitado pelo *A. sculptum* em todos os seus estágios de desenvolvimento, caracterizando-se como seu hospedeiro primário.

Equídeos apresentam-se abundantes em muitas áreas endêmicas para FM, relacionando-se constantemente com os seres humanos, podendo se infectar sem apresentar sintomas clínicos, apesar de apresentar altos títulos de anticorpos anti-*Rickettsia* (LEMOS et al., 1997). Dessa forma, possuem um importante papel para a vigilância epidemiológica, pois são considerados animais sentinelas, demonstrando boa resposta sorológica diante de infecções causadas por *Rickettsia* sp.

Estudos envolvendo inquéritos sorológicos comparando títulos de anticorpos entre equinos, cães e humanos, demonstram que os maiores valores de anticorpos são apresentados por equinos, apesar da ausência de sintomas, caracterizando-os como bons indicadores da circulação da bactéria, onde se tem a presença do vetor (UENO, 2014).

Em hospedeiros vertebrados, *R. rickettsii* causa apenas uma infecção que se apresenta de forma aguda, com período que varia entre alguns dias ou semanas, mas não há persistência do agente (BURGDÖFER, 1988).

A infecção de humanos é considerada acidental e dependente da infestação de carrapatos em animais como equídeos, cães e roedores que convivem no mesmo ambiente que o homem (LEMOS et al., 1997). Dessa forma, apresentam-se como hospedeiros ocasionais de carrapatos, e não desempenham papel algum na continuidade dessas bactérias na natureza (SOCOLOVSKY et al., 2009).

3.5 Transmissão

A *Rickettsia* pode ser transmitida pelo carrapato em qualquer uma de suas fases de crescimento – larva, ninfa e/ou adulto –, sendo necessário que permaneça aderido à pele do hospedeiro, realizando repasto sanguíneo (DEL FIOLE et al., 2010). Após repasto sanguíneo pelo vetor anteriormente citado, a bactéria dissemina-se por meio das vias linfática e hematogênica para diversos tecidos (cérebro, coração, pele, músculos, pulmões, rins, baço, fígado, trato gastrointestinal). As células do endotélio vascular desses órgãos passam a ser sítio de infecção e multiplicação (LEVIN, 2014).

Carrapatos transmitem a riquetsia através de secreções salivares, enquanto que pulgas e piolhos transmitem a bactérias aos humanos depositando fezes infectadas em pele não íntegra (AZAD ; BEARD, 1998).

Vale salientar que, o fato da picada de larvas e ninfas causarem uma sensação dolorosa menor e por muitas vezes imperceptível, são as que possuem a maior probabilidade de obter sucesso na transmissão do microrganismo (DEL FIOLE et al., 2010).

Há ainda, uma outra forma de contágio causada pelo arrancamento do vetor de forma brusca, levando à uma lesão na pele do hospedeiro e ruptura do vetor, havendo liberação de fluidos contaminados por parte deste último (RAOULT; PAROLA, 2009).

3.6 Patogenia

As relações entre hospedeiros e vetores caracterizam-se por multiplicação eficiente, mantendo-se a longo prazo, possuindo ampla distribuição geográfica e ecológica (AZAD; BEARD, 1998; GALVÃO et al., 2003). De acordo com Medeiros et al (2013), o fato do carrapato permanecer infectado ao longo de toda sua vida (perpetuação transestadial) e mantendo o parasita por várias gerações (transmissão transovariana), faz com que o mesmo atue como um vetor e reservatório desta bactéria na natureza. O fato de larvas e ninfas de *A. cajennense* (*s.l.*) possuírem baixa especificidade com relação ao hospedeiro, faz com que o ixodídeo tenha um papel importante como transmissor de agentes patogênicos (MEDEIROS et al., 2013).

No momento em que o carrapato infectado com riquetsias pica o hospedeiro, o parasita se dissemina por todo o organismo através de vasos linfáticos e sanguíneos, atingindo órgãos como pele, fígado, baço, pâncreas, trato gastrointestinal, pulmões, coração e cérebro (WALKER et al., 2003). A riquetsia invade o endotélio vascular de todos os tecidos atingidos, replicando-se a fim de atingir as células da musculatura lisa (DEL FIOLE et al., 2010).

Em seguida, as riquetsias se ligam aos receptores que contêm colesterol e fixam-se à células do endotélio por meio de proteínas específicas, ompA e ompB, interagindo com um receptor celular, proteína quinase Ku70 (WALKER et al., 2003). Por meio de fagocitose induzida, as células dos hospedeiros são invadidas pelas riquetsias. Logo após, o fagossoma se rompe,

consequentemente, o parasita alcança o citoplasma, onde por meio de fissão binária se multiplica, replicando-se em aproximadamente dez minutos (TRABULSI, 2004, *apud* DEL FIOLE et al., 2010).

3.7 Aspectos clínicos

O período de incubação da FM varia em torno de 2 a 14 dias, com uma média de 7 dias até que as primeiras sintomatologias apareçam, estando relacionado à quantidade do inóculo no momento da infecção (LEMOS, 2012).

A sintomatologia apresenta-se inicialmente inespecífica, envolvendo quadros de hipertermia, cefaleia, mialgias, artralgia, hiperemia de conjuntivas, disfunções gastrointestinais, incluindo vômitos, diarreias e dores abdominais (DEL FIOLE et al., 2010).

O principal sinal da doença é a presença do exantema maculopapular, que nem sempre aparece nos primeiros dias da doença, podendo acarretar em atraso no diagnóstico e piora do prognóstico por conta do tratamento tardio (SEXTON; WALKER, 2006; LEMOS, 2012).

As máculas possuem cor roseada, com bordos mal definidos, possuindo diâmetro de 2 a 6 mm, iniciando-se comumente ao redor dos punhos e tornozelos, podendo também ocorrer na região torácica (DEL FIOLE et al., 2010). As palmas das mãos e as plantas dos pés apresentam o exantema na maioria dos casos, sendo considerado um sinal bastante característico da febre maculosa.

Na ausência de tratamento a progressão da doença ocorre de forma rápida podendo ocasionar alteração renal e hepática, comprometimento pulmonar tais como pneumonia intersticial e derrame pleural (LEMOS, 2012), comprometimento do sistema nervoso central, apresentando-se com encefalite, confusão mental, delírios, ataxia, convulsões e até coma (DEL FIOLE et al., 2010). O conjunto desses fatores pioram bastante o prognóstico, aumentando as chances de letalidade.

Com relação à bactéria *R. parkeri*, a infecção em humanos apresenta-se de forma mais branda e sem letalidade, em comparação à *R. rickettsii*. Muito provável que casos de riquetsioses humanas possuindo como agente a *R. parkeri*, tenha sido atribuído a uma forma mais leve da infecção por *R. rickettsii* (PADDOCK, 2009).

3.8 Diagnóstico

Por conta da sintomatologia se apresentar de forma inespecífica, um diagnóstico ágil e preciso torna-se difícil, sendo a FMB confundida com algumas outras doenças tais como leptospirose, dengue, hepatite viral, salmonelose, encefalite, malária ou pneumonia por *Mycoplasma pneumoniae* (DEL FIOLE et al., 2010). Com a progressão do quadro infeccioso e o aparecimento do exantema, surge ainda um confundimento com a meningococemia, quadro de sepse, virose exantemática ou ainda com outras riquetsioses presentes no grupo tifo, como erliquiose e borreliose (DEL FIOLE et al., 2010).

A sorologia ainda se apresenta como o método de diagnóstico mais utilizado principalmente em estudos epidemiológicos, entretanto os anticorpos para aparecem após 7 a 10 dias após o início da doença (FREITAS; MARTINS, 2007).

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) é apontada pela OMS como teste padrão ouro para diagnóstico de riquetsioses, detectando anticorpos anti- *Rickettsia sp.* e utilizando antígenos espécie-específicos. (GALVÃO et al., 2005). De acordo com Chen e Sexton (2008) essa técnica possui sensibilidade superior a 94 %, porém podem ocorrer várias reações cruzadas entre as riquetsias pertencentes ao GFM, impossibilitando a distinção entre elas.

Outros métodos sorológicos que já foram empregados no diagnóstico de riquetsias foram: aglutinação em látex, Ensaio de Imunoadsorção Enzimático (ELISA), hemaglutinação indireta, Fixação do Complemento e Teste de aglutinação, porém todos apresentam reações cruzadas entre os componentes do GFM (CHEN; SEXTON, 2008).

Diante dessa inespecificidade dos testes sorológicos em diferenciar as espécies de *Rickettsia*, o uso de técnicas de biologia molecular tem sido utilizadas para diagnósticos. As técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e o sequenciamento genético possuem alta sensibilidade e são utilizadas para diagnosticar e identificar as riquetsias a partir de amostras sanguíneas, tecido, e até através dos carrapatos que parasitavam os hospedeiros (BRUSTOLIN, 2014). Os artrópodes passam a ser utilizados como

ferramentas para detecção de determinado patógeno, em determinada área, através da PCR (PAROLA; RAOULT, 2001).

A detecção molecular pela técnica de PCR do DNA de riquetsias ocorre por meio da amplificação de um fragmento exclusivo do gene citrato sintase (*gltA*), presente em todas as bactérias do gênero *Rickettsia* sp., e da posterior amplificação de fragmentos do gene que codificam proteínas externas de membranas, *ompA* e *ompB* (LABRUNA et al., 2004). A detecção das riquetsias é possível através do reconhecimento da sequência dos diferentes genes, possuindo pesos moleculares distintos (SOUSA et al., 2008).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local do estudo

A coleta de dados foi realizada, no período de agosto de 2013 a dezembro de 2014 na microrregião de Ilhéus-Itabuna, no Estado da Bahia. Esta região pertence à mesorregião Sul Baiano e possui população equídea estimada em 90.974 animais (IBGE, 2011). Desta microrregião, foram selecionados cinco municípios com características, predominantemente rurais: Itaju do Colônia (15°08'S 39°43'O), Itapé (14°52'S 39°25'O), Ibicaraí (14°51'S 39°35'O), Santa Cruz da Vitória (14°57'S 39°48'O), Floresta Azul (14°50'S 39°39'O) e o município de Itabuna (15°8'S 39°43'W) com predomínio de área urbana (Figura 1).



Figura 1: Mapa da microrregião Ilhéus – Itabuna, Bahia, em destaque a localização dos municípios em que foram realizadas as coletas.

Fonte: <http://www.massapeimoveis.com.br/mapas.php>

Os animais, propriedades e municípios foram selecionados por conveniência. O número de animais por município foi proporcional à sua população de equídeos. No total foram coletadas amostras de sangue de 569 equídeos (528 equinos, 8 muares e 33 asininos), sendo 516 equídeos, provenientes de 20 propriedades rurais e 53 equinos oriundos de área urbana utilizados pela polícia montada, carroceiros e praticantes de cavalgadas.

As informações referentes à resenha dos animais (espécie, idade, sexo), características da fazenda e manejo (animal mantido estabulado, presença de carrapatos, contato com outras espécies de animais) foram obtidas através de uma entrevista semiestruturada (Apêndice A) aplicada junto aos criadores ou proprietários, para avaliação dos possíveis fatores associados.

O estudo foi realizado dentro dos padrões estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Ética e Bem-Estar Animal, através de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Uso de Animais (protocolo 002/2013), da Universidade Estadual de Santa Cruz.

4.2 Coleta e Processamento das amostras

De cada animal avaliado, foram coletados 20mL de sangue mediante punção da veia jugular externa, utilizando-se agulhas descartáveis (25 X 8 mm) acopladas em tubos a vácuo sem anticoagulante.

Para obtenção dos soros, os tubos sem anticoagulante foram centrifugados a 699g por 10 minutos, sendo os soros, separados por aspiração, foram acondicionados em tubos plásticos com tampa e congelados a -20°C, até a realização dos testes sorológicos.

4.3 Coleta de carrapatos

Foram coletados, carrapatos de todas as propriedades na ocasião das visitas, de forma aleatória. A identificação taxonômica dos carrapatos foi realizada com auxílio de lupa estereoscópica e baseada na chave de Aragão e Fonseca (1961), Barros – Battesti (2006) e Martins et al. (2010).

Os carrapatos foram armazenados em microtubos ou tubos falcons, a depender da quantidade, contendo o nome das propriedades nas quais foram coletados. Posteriormente, foram submersos em álcool absoluto e armazenados a -20°C para futura identificação morfológica e extração de DNA.

4.4 Sorologia para *Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia parkeri*

Os soros foram testados para *R. rickettsii* cepa Taiaçu (PINTER; LABRUNA, 2006) e *R. parkeri* At24 (SILVEIRA et al., 2007), cedidos pelo Departamento de Doenças Parasitária (DDP), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. A RIFI procedeu-se segundo protocolo descrito por Labruna et al. (2007) – Anexo I.

Utilizou-se lâminas silcadas, contendo 10 orifícios cada, sensibilizadas com antígeno produzido via cultivo de *R. rickettsii* e *R. parkeri* em células Vero (Anexo II). O ponto de corte adotado por este estudo foi de 1:64, para ambos os agentes. Em cada lâmina, soros conhecidamente negativos e positivos, cedidos pela prof. Dra. Nathalie Costa da Cunha da Universidade Federal Fluminense (UFF), foram utilizados a fim de validar todas as reações.

Em caso de soros que apresentaram-se positivos à diluição 1:64, foram realizadas diluições seriadas na base de dois para verificar a titulação final de cada reação.

4.5 Extração do DNA genômico dos carrapatos e análise molecular

O DNA total foi extraído dos carrapatos de forma individual, utilizando o método fécol – clorofórmio relatado por Santolin et al. (2013).

Todas as amostras foram submetidas a uma reação utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene 16S (Tabela 2), a fim de verificar a integridade do DNA e a possível presença de inibidores da PCR. As condições termocíclicas utilizadas foram: uma desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos com desnaturação à 94°C por 30 segundos, anelamento à 55°C por 30 segundos, e extensão à 72°C por 45 segundos, sendo a extensão final realizada à 72°C por 7 minutos, como descrito por Mangold et al., 1998.

Para investigar a presença de *Rickettsia*, do gene citrato sintase, foi utilizado o par de primers CS-239 e CS-1069, que amplifica 834 pb, do gene *gltA* (Tabela 2). Este gene está presente em todas as espécies conhecidas de *Rickettsia*. As condições termocíclicas foram as descritas por McIntosh et al. (2015), compreendendo uma desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos com desnaturação de 95°C por 20 segundos, anelamento

à 52°C por 20 segundos, e extensão à 72°C por 40 segundos, com extensão final à 72 ° C por 5 minutos.

Tabela 2: Lista dos primers utilizados em reações de PCR para verificação da integridade do DNA e verificação da presença de *Rickettsias* nos carrapatos.

Gene	Par de Primers	Sequência do nucleotídeo (5'-3')	Tamanho do produto amplificado (pb)
16S	-	CCGGTCTGAACTCAGATCAAG GCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGT	464
<i>gltA</i>	CS 239 CS 1069	GCTCTTCTCATCCTATGGCTATTAT CAGGGTCTTCGTGCATTTCTT	834

4.6 Delineamento Estatístico

Para fins de modelagem estatística, as variáveis foram categorizadas da seguinte forma: equinos (sim/não), a idade foi transformada em faixa etária [≤ 3 anos/ >3 anos), sexo (macho/fêmea), animal mantido estabulado (sim/não), zona de habitat (rural/urbana). A variável presença de sorologia positiva para *Rickettsia* sp (sim/não) foi considerada como variável desfecho.

A colinearidade das variáveis foi determinada através da correlação de Spearman ($p \leq 0,2$), utilizando o Programa Biostat 5.0. A estratégia de modelagem utilizada foi a *backward*, na qual todas as variáveis inicialmente são incluídas no modelo, denominado inicial, e a cada passo as variáveis são selecionadas com base no teste de Wald até a obtenção do modelo mais parcimonioso que melhor explique o desfecho. O nível de significância para uma variável permanecer no modelo final foi estabelecido em 5%. Para construção dos modelos utilizou-se o programa EPIINFO versão 3.5.2.

4 RESULTADOS

Dos 569 equídeos avaliados neste estudo 33,39% (190/569) foram positivos para pelo menos uma das Rickettsias testadas. A frequência de animais que reagiram sorologicamente positivos apenas para *R. rickettsii* foi de 14,6% (83/569), dos quais 14,9% (77/516) pertencem à população rural e 11,3% (6/53) à população urbana ($p>0,05$). Os títulos de anticorpos variaram de 1:64 à 1:1024 (Tabela 1). Verificou-se a presença de equídeos sorologicamente reativos em todos municípios estudados, com a positividade variando de 6,6 à 44,7% (Tabela 2). Das 20 propriedades rurais do estudo, cinco não apresentaram animais positivos, nas demais a positividade variou de 4,0 à 50,0% (Tabela 3). Dentre os quatro locais de coleta em ambiente urbano dois apresentaram animais positivos, com positividade de 10,3% e 50,0%. A positividade entre os equídeos se distribuiu da seguinte forma: 15,3 % (81/528) foram equinos, 25,0% (2/8) muares e nenhum asinino se mostrou positivo para o agente.

Com relação a *R. parkeri*, 15,1% (86/569) dos animais apresentaram anticorpos apenas contra seus antígenos, sendo 15,5% (80/516) pertencentes à população rural e 11,3% (6/53) à população urbana ($p>0,05$). Os títulos de anticorpos variaram de 1:64 à 1:512 (Tabela 1). Verificou-se a presença de equídeos que reagiram sorologicamente de forma positiva em todos municípios estudados, com a positividade variando de 5,6 à 33,7% (Tabela 2). Dentre as 20 propriedades rurais, três não apresentaram animais positivos, com positividade de 3,3 à 31,5% (Tabela 3). Dos quatro locais de coleta em zona urbana, dois apresentaram animais positivos, com positividade de 13,8% e 25,0%. Entre as espécies avaliadas verificamos positividade de: 15,3% (81/528) em equinos, 25% (2/8) em muares, e por fim, 9,1% (3/33) em asininos.

Em 3,7 % (21/569) dos animais ocorreram respostas antigênicas tanto de *R. parkeri*, quanto de *R. rickettsii*. Esse fato ocorreu em 50 % (10/20) das propriedades rurais, não sendo observado no meio urbano, e todos os animais eram equinos. A esse grupo denominou-se de “dupla-reação”. Dentre os animais que apresentaram dupla-reação, 66,6% (14/21) possuíam títulos de 1:64 e, 9,5% (2/21) títulos de 1:128 para ambos os agentes, enquanto cinco animais apresentaram títulos divergentes entre as espécies. Dentre esses

cinco a distribuição dos títulos se apresentou da seguinte forma: Dois animais apresentaram títulos de 1:128 para *R. rickettsii* e 1:64 para *R. parkeri* e os outros três animais apresentaram o mesmo título (1:64) para *R. rickettsii* e títulos distintos (1:128, 1:256 e 1:512) para *R. parkeri*.

Em todos os locais de coleta relatou-se o controle aos carrapatos, no entanto foi verificada a presença dos mesmos em todas as propriedades amostradas. Foram coletados um total de 262 carrapatos, dos quais 202 eram *Dermacentor nitens*, 61 eram *Amblyomma sculptum*, e 23 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Apenas os carrapatos da espécie *A. sculptum* foram submetidos à PCR.

Tabela 3: Distribuição dos títulos de anticorpos observados contra antígenos de *R. rickettsii* e *R. parkeri* em respostas isoladas em equídeos da microrregião Ilhéus – Itabuna, Bahia.

Titulação	Animais reagentes apenas para <i>Rickettsia rickettsii</i>	Animais reagentes apenas para <i>Rickettsia parkeri</i>
1:64	57 (68,7%)	70 (81,4%)
1:128	19 (22,9%)	11 (12,8%)
1:256	4 (4,8%)	3 (3,5%)
1:516	1 (1,2%)	2 (2,3%)
1:1024	2 (2,4%)	-
TOTAL	83 (100 %)	86 (100%)

Tabela 4: Ocorrência de títulos de anticorpos observados anti-*Rickettsia rickettsii* e anti-*Rickettsia parkeri* em respostas isoladas e mistas em equídeos, por município, da microrregião Ilhéus – Itabuna, Bahia.

Município	Animais reagentes apenas para <i>R. rickettsii</i>	Animais reagentes apenas de <i>R. parkeri</i>	Animais reagentes para ambos antígenos
Floresta Azul	8 (9,6%)	23 (26,7%)	2 (9,5%)
Ibicaraí	14 (16,9%)	12 (14,0%)	3 (14,3%)
Itajú do Colônia	37 (44,6%)	29 (33,7%)	10 (47,6%)
Itapé	9 (10,8%)	5 (5,8%)	1 (2,1%)
Santa Cruz da Vitória	9 (10,8%)	11 (12,8%)	5 (23,8%)
Itabuna	6 (7,2%)	6 (7,0%)	0 (0,0%)
Total	83 (100%)	86 (100%)	21 (100%)

Tabela 5: Distribuição dos equídeos positivos contra antígenos de *R. rickettsii* e *R. parkeri*, em respostas isoladas ou mistas, em equídeos da microrregião Ilhéus – Itabuna, Bahia.

Propriedades	Total de animais coletados	Reagentes apenas para <i>Rickettsia rickettsii</i>	Reagentes apenas para <i>Rickettsia parkeri</i>	Animais reagentes para ambos antígenos
1	8	0 (0%)	1 (12,5%)*	0 (0%)
2	12	3 (25,0%)	1 (8,33%)	1 (8,3%)
3	30	3 (10,0%)	1 (3,3%)	0 (0%)
4	6	3 (50,0%)	0 (0%)	0 (0%)
5	60	8 (13,3%)	8 (13,3%)	0 (0%)
6	55	9 (16,4%)	5 (9,1%)	3 (5,4%)
7	23	4 (17,4%)	4 (17,4%)	1 (4,3%)
8	8	2 (25,0%)	2 (25,0%)	0 (0%)
9	60	17 (28,3%)	6 (10,0%)	6 (10,0%)
10	63	4 (6,3%)	15 (23,8%)	1 (1,6%)
11	32	6 (18,7%)	10 (31,5%)	1 (3,1%)
12	34	6 (17,6%)	5 (14,7%)	3 (8,8%)
13	25	1 (4,0%)	6 (24,0%)	0 (0%)
14	10	3 (30,0%)	2 (20,0%)	1 (10,0%)
15	30	0 (0,0%)	6 (20,0%)	2 (6,6%)
16	15	2 (13,3%)	4 (26,6%)	2 (13,3%)
17	11	4 (36,4%)	0 (0%)	0 (0%)
18	7	0 (0%)	1 (14,3%)	0 (0%)
19	16	2 (12,5%)	1 (6,2%)	0 (0%)
20	11	0(0%)	2 (18,2%)	0 (0%)

*Número de animais e sua respectiva porcentagem em relação à população da propriedade.

A Tabela 6 apresenta os valores de p encontrados para as variáveis com plausibilidade biológica abordadas neste estudo, frente à positividade para *Rickettsia* sp.

As tabelas 7 e 8, apresentam o modelo preliminar e o final, respectivamente, da regressão logística não condicional frente a positividade para *Rickettsia* sp. As variáveis “é equino” e “Tem mais de 3 anos” foram associadas ao risco de se ter a infecção.

Tabela 6: Fatores com plausibilidade biológica associados a positividade para *Rickettsia* sp em equídeos da microrregião Ilhéus – Itabuna, Bahia.

Variáveis	Positivos		Negativos		Odds Ratio IC 95%	p – valor
	N	%	N	%		
Sexo						
Macho	64	34,2	123	65,8	1,06	
Fêmea	126	33,0	256	67,0	(0,73 – 1,53)	0,84
É equino						
Sim	183	34,7	345	63,3	2,57	
Não	7	17,1	34	83,9	(1,12 – 5,92)	0,03
Habita a zona rural						
Sim	178	34,5	338	65,5	1,80	
Não	12	22,6	41	77,4	(0,92 – 3,51)	0,12
Tem mais de 3 anos						
Sim	40	46,5	46	53,5	1,93	0,01
Não	150	31,1	333	68,9	(1,21 - 3,07)	
Vive em baias						
Sim	22	27,5	58	72,5	0,72	0,28
Não	16	34,4	321	65,6	(0,43 – 1,22)	
Contato com bovinos						
Sim	158	32,2	332	66,8	0,70	0,19
Não	32	40,5	47	59,4	(0,43 – 1,14)	

Tabela 7: Modelo preliminar da regressão logística não-condicional dos fatores associados à infecção pela *R. rickettsii* em equídeos da microrregião Ilhéus – Itabuna, Bahia.

Variáveis	Odds ratio	IC – 95%	Valor de p
Tem mais de 3 anos	1,83	1,13 – 2,98	0,15
É equino	2,51	1,08 – 5,84	0,32
É macho	1,20	0,79 – 1,83	0,39
Vive em baias	0,70	0,38 – 1,26	0,23
Vive em meio rural	1,54	0,71 – 3,33	0,26
Possui contato com bovinos	0,73	0,43 – 1,22	0,23

$p < 0,02$ likelihood = 18,68

Tabela 8: Modelo final de regressão logística não condicional dos fatores associados à infecção por *Rickettsia* sp. em equídeos da microrregião Ilhéus – Itabuna, Bahia.

Variáveis	Odds ratio	IC – 95%	Valor de p
É equino	2,45	1,06 – 5,65	0,01
Tem mais de 3 anos	1,87	1,06 – 2,99	0,03

$p < 0,0001$, likelihood=12,71

Foram analisados, de forma individual, 61 carrapatos do espécie *Amblyomma sculptum*., pela técnica de PCR. Realizou-se em todas as amostras o gene 16 S, a fim de identificar a integridade do DNA dos carrapatos (Figura 2). Em seguida foi feita a PCR para o gene *gltA*, não havendo nenhuma amplificação para o mesmo que identifica a *Rickettsia* sp..



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 2: Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,0%, corada com Syber safe. Os amplicons em questão referem-se à PCR para verificar a integridade do DNA dos carrapatos, de acordo com a sequência parcial do gene 16S. Canal 1: Marcador molecular numa escala de 100 pares de base ((Invitrogen®); Canal 2: Controle Positivo; Canal 3: Controle Negativo; Canais 4,5,6 e 7: Amostras amplificadas.

5. DISCUSSÃO

Este estudo envolveu o maior número de eqüídeos amostrados para determinação da positividade à antígenos de *Rickettsias* no Brasil até o presente momento. O mesmo foi conduzido em uma região, onde há predominância de clima tropical úmido favorecendo o ciclo biológico dos carrapatos durante todo o ano e está inserida no bioma Mata Atlântica, onde há ocorrência de vários roedores da fauna brasileira, tais como a capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*), que é apontada como principal amplificadora no ciclo da *Rickettsia rickettsii* (KRAWCZAK et al., 2014). Observou-se a presença de carrapatos em todas as propriedades amostradas, justificando sua ampla disseminação.

A prevalência de animais reativos antigenicamente apenas para *R. rickettsii* diverge de Oliveira (2017) que encontrou na zona rural do município de Ilhéus 5,8% de eqüídeos positivos, fato este que pode ser explicado pela restrição da zona de coleta em relação ao presente estudo que abrangeu cinco cidades consideradas pertencentes à zona rural, e uma em ambiente urbano.

Áreas consideradas não endêmicas para febre maculosa comumente apresentam baixa soroprevalência, como em estudo na região centro-norte do Piauí por Lemos (2012), com positividade de 21,3%, assemelhando-se aos achados de Medeiros et al (2013), em Santa Catarina, 25%.e aos próprios valores encontrados pelo presente estudo.

Em áreas consideradas endêmicas para a Febre Maculosa, geralmente são detentoras de altas prevalências. Horta et al (2004), realizando estudo sorológico em áreas endêmicas do estado de São Paulo, obteve uma prevalência de 77,3%, para *R. rickettsii*, com títulos variando entre 64 e 4096. Sangioni et al (2005) encontrou alta positividade em fazendas, do mesmo estado, variando de 57,1 a 90%. Outro estudo realizado no Vale da Pedreira, São Paulo, por Lemos et al (1997) constatou soroprevalência para este agente de 77,8%, com titulação superior a 1024. Pacheco et al (2011), em estudo na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais, estado pertencente à região Sudeste assim como São Paulo, registrou uma prevalência de 41% de positividade apenas para *R. rickettsii*.

Em outras regiões do Brasil, há uma discrepância com relação à prevalência encontrada. Dentre elas estão na região Sul do país:

5,3%(OTOMURA et al., 2010) à 5,5% (LABRUNA et al., 2010) na região Norte, estado do Paraná, confrontando com os achados de 51,6%, no Rio Grande do Sul, por SANGIONI et al. (2011). Dentre as prevalências encontradas na região Centro-Oeste do Brasil estão: 17,2% no Distrito Federal (MARTINS, 2014), 42,8 à 80,5 % no Mato Grosso do Sul (AMORIM et al., 2013). O que remonta a necessidade de cautela ao se tentar extrapolar encontrados em um região para uma outra.

Dessa forma, pode-se inferir que estados ou regiões com maiores prevalências sorológicas em estudos realizados com equinos para *R. rickettsii* acabam por ser consideradas endêmicas, reiterando a importância desses animais como sentinelas para FMB, e sua importância na vigilância da mesma.

A positividade apenas para *R. parkeri* encontrada por Oliveira (2017), foi inferior aos animais que apresentaram-se sorologicamente reativos em nosso estudo. No entanto, a diferença entre as prevalências para *R. rickettsii* e *R. parkeri* foi proporcionalmente igual. Onde Oliveira (2017) encontrou 5,8% de positivos para *R. rickettsii* e 8,7% para

R. parkeri, e em nosso estudo encontramos 14,6 e 15,1%, para *R. rickettsii* e *R. parkeri*, respectivamente.

Lopes (2012), em seu estudo, encontrou uma prevalência de 13,4% apenas para *R. parkeri*. No Norte do Paraná, houve uma semelhança com relação à positividade encontrada na região, Otomura et al. (2010) relataram uma positividade de 1,7% corroborando com a encontrada por Labruna et al. (2010) de 1,8%. Amorim et al.(2013), não encontraram nenhum animal positivo para este agente, em seu estudo realizado no Mato Grosso do Sul.

Neste estudo não encontramos nenhum asinino positivo para antígenos de *R. rickettsii*, corroborando com os achados de Horta (2004) e Otomura et al. (2010). Porém para antígenos de *R. parkeri*, houve uma positividade de 9,1% (3/33), mostrando-se inferior à positividade encontrada por Lopes (2012), o qual encontrou asininos positivos (26,4%), e em número maior à quantidade de equinos (17,1%). Castagnolli et al. (2003), sugeriram que asininos possuem maior resistência à infestação por *Amblyomma* sp quando comparado aos equinos, o que justifica a ausência de positivos para *R. rickettsii*, e a baixa positividade para *R. parkeri*. Lopes (2012), justifica a soroprevalência em asininos relativamente alta com o fato dos mesmos não viverem estabulados e

possuir livre acesso à mata, o que evidencia que mesmo resistentes à infestação por vetores, um elevado desafio pode influenciar na positividade.

De acordo com Martins et al (2016), em casos de animais positivos para mais de um agente em questão, configurando uma reação cruzada, não se pode concluir qual a espécie de *Rickettsia* que predominante na infecção. Como alternativa, Horta et al (2004) e Labruna (2009), propõem que espécies possuindo titulação quatro vezes superior as demais seria a soroprevalente., Não temos como utilizar esta estratégia em nosso estudo e por conseguinte afirmar por qual *Rickettsia* os equídeos se encontravam infectados, uma vez que não houve condições de se realizar a sorologia para outras espécies. Outro fator limitante é que os estudos envolvendo *Rickettsias* na região ainda são incipientes, havendo pouco conhecimento das cepas circulantes.

Neste contexto Pinter et al. (2008) afirmaram que um teste sorológico frente as possíveis espécies de *Rickettsia*, que sabidamente ocorrem em uma determinada região se faz necessário, porque, geralmente, títulos de anticorpos homólogos se mostram superiores aos títulos de anticorpos heterólogos. Alguns autores relatam que as diferenças nos títulos podem ser suficientemente altas para se diferenciar as espécies riquetsiais que estejam estimulando a resposta imune (LA SCOLA; RAOULT, 1997; PAROLA; PADDOCK; RAOULT, 2005).

A ausência de detecção molecular para o gene *gltA* corrobora com os achados de Martins et al. (2015), no estado de Goiás, onde foram coletados 509 *Dermacentor nitens*, 72 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, e 6 *Amblyomma sculptum*, não encontrando nenhum carrapato positivo ao gene *gltA*.

A variável “Tem mais de 3 anos” ($p=0,01$), apresentou-se, na regressão logística final, como fator de risco para a aquisição da infecção para *Rickettsia* sp. por parte dos equídeos, neste estudo. Uma provável explicação seria, o fato dos animais adultos, possuírem maior contato com os vetores da FM, respectivamente, ao longo de suas vidas, corroborando com os achados de Lemos (2012).

A variável “ser equino ($p=0,03$)” também se apresentou como fator de risco para a positividade sorológica. Esse evento pode ser explicado, pelo fato

do número de equinos no presente estudo e na região em questão ser bastante superior às outras espécies amostradas.

Entre os anos de 2005 à 2016 houveram no mínimo uma notificação, ao ano, de infecções causadas por *Rickettsia* sp., em seres humanos, no estado da Bahia, não sendo registrado nenhum óbito (SINAN, 2017). A importância dos animais domésticos como hospedeiros amplificadores de *Rickettsia* sp., ainda não foi completamente elucidada (OTOMURA et al., 2010), Esses relatos, juntamente com a prevalência obtida por nosso estudo, demonstra que a *Rickettsia* sp. do Grupo da Febre Maculosa, apresenta-se circulante no estado, já que os equídeos são apontados por estudos epidemiológicos como animais sentinelas, podendo se infectar sem apresentar sintomatologia clínica (PADDOCK et al., 2002, SANGIONI, 2003, PINTER et al., 2008).

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados encontrados neste estudo podemos concluir que:

A ocorrência de equídeos positivos contra antígenos de *Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia parkeri* indicam a circulação de Rickettsias do grupo da febre maculosa na região estudada.

Amblyomma sculptum apresenta-se como o principal vetor da Febre Maculosa Brasileira causada pelo agente *R. rickettsii*. A presença deste vetor nos animais alvo deste estudo é de suma importância epidemiológica para saúde animal e humana na microrregião Ilhéus – Itabuna, Bahia.

7. Referências

AMORIM, M.V., *et al.* Detecção de anticorpos anti – *Rickettsia* spp. em cães equinos no estado do Mato Grosso, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, suplemento 2, p. 3755 – 3766, 2013.

ANGERAMI, R.N.; RESENDE, M.R.; FELTRIN, A.F.; KATZ, G.; NASCIMENTO, E.M.; STUCCHI, R.S.; SILVA, L.J. *et al.* Brazilian Spotted Fever: two faces some a disease? A comparative stud of clinical aspects between and old and new endemic area in Brazil. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. v. 15, n. 2, p. 207 – 208. 2009.

ARAGÃO, H.; FONSECA, F. D.A.; Notas de Ixodologia. VIII. Lista e chave para representantes da Fauna Ixodológica Brasileira. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Tomo 59, Fascículo 2, Julho, 1961.

AZAD, A.F.; BEARD, C.B. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. *Emerging Infectious and Diseases*. v. 4, n. 2, p. 179 – 186. 1998.

BACELLAR F.C. **Rickettsias isoladas em Portugal- contribuição para identificação e classificação das estirpes**. Dissertação de doutoramento em Biologia. Universidade de Évora, Évora,1996.

BARROS-BATTESTI, D.M.; MORAES,D. ARZUA,M.; BECHARA, G.H., *et al.* **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. Vox/ICTTD-3/Butantan ed.Butantan, São Paulo, 223p, 2006.

BEATI, L.; NAVA, S.; BURKMAN, E.J.; BARROS-BATTESTI, D.M.; LABRUNA, M.B.; GUGLIELMONE, A.A.; CÁCERES, A.G.; GUSMÁN-CORNEJO, C.M.; LÉON, M.B.; DURDEN, L.A.; FACCINI, J.L.H. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. **BMC Evolutionary Biology**. v. 13, n.267, p 2-20. 2013.

BILLINGS, A.N.; YU,X.J.; TEEL,P.D.; WALKER,D.H. Detectionn of a spotted fever group *Rickettsia* in *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in South Texas. **Journal of Medical Entomology**. vn. 35, n.4, p. 474 – 478, 1998.

BRUSTOLIN, J. M. **Infecção Experimental de *Rickettsia parkeri* (cepa Mata Atlântica) em *Cavia porcellus***. Dissertação (Medicina Veterinária Preventiva). Universidade Federal de Santa Maria – Rio Grande do sul. 2014.

BURGDORFER, W. Ecological and epidemiological considerations of Rocky Mountain spotted fever and scrubs typhus. In: Walker D. H. (Ed.) **Biology of Rickettsial Diseases**, Boca Raton: Inc., p. 33-50, 1988.

BURGDORFER, W.; SEXTON, D.J.; GERLOFF, R.K.; ANACKER, R.L.; PHILIP, R.N.; THOMAS, L.A et al. *Rhipicephalus sanguineus*: Vector of a New Spotted Fever Group Rickettsia in the United States. **Infection and Immunity**, v. 12, n. 1, p. 205–210, 1975.

CASTAGNOLLI, K.C.; FIGUEIREDO, L.B.; SANTANA, D.A.; CASTRO, M.B.; ROMANO, M.A.; SZABÓ, M.P.J., et al. Acquired resistance of horses to *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1987) ticks. **Veterinary Parasitology**. v. 117, n.4,. p. 271 – 283. 2003.

CHEN, L. F.; SEXTON, D. What's new in Rock Mountain spotted fever? **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 22, n. 3, p. 415-432, 2008.

CORDEIRO, M. D.; RAI, V.D.A.; VALIM, J.R.A.; CASTRO, G.N.S.; SOUZA, C.E.; FONSECA, A.H., J.R. Frequency of antibodies class IgG anti-*Rickettsia rickettsii* in horses of Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica campus. Frequência de anticorpos da classe IgG anti- *Rickettsia rickettsii* em equinos na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Campus Seropédica, **Revista Brasileira de Medicina Veterinária Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 37, n. 1, p. 78-82, 2015.

DANTAS-TORRES, F., et al. Ticks and tick-borne diseases : a One Health perspective. **Trends in Parasitology**, v.28, n.10, p 437–446. 2006.

DEL FIORE, F. S.; JUNQUEIRA, F.M.; ROCHA, M.C.P.; TOLEDO, M.I.; FILHO, S.B et al. A febre maculosa no Brasil. **Revista Panam Salud Publica**, vol. 27, n.6, p. 461- 466, 2010.

DIAS, E.; MARTINS, A. V. Spotted fever in Brazil: a summary. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 19, n. 2, p. 103-108, 1939.

DUMLER, J.S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C.; DASCH, G.A.; RAY, S.C.; RIKIHISA, Y.; Rurangirwa, R. et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmaceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Coxiella* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, description of six new species combinations and designations of *Ehrlichia equi* and HGE agent as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocitophya*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 51, n. 6, p. 2145- 2165, 2001.

FOURNIER, P.E.; RAOULT, D. Bacteriology, taxonomy and phylogeny of *Rickettsia*. p. 379. In: Raoult D., & Parola P. **Rickettsial Diseases**. New York: Healthcare. 2009.

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

GALVÃO, M.A.M.; DUMLER, J.S.; MAFRA, C.L.; CALIC, S.B.; CHAMONE, C.B.; FILHO, G.C.; OLANO, J.P.; WALKER, D.H. DUMLER J.S.; WALKER, W.S. Fatal spotted fever rickettsiosis, Minas Gerais, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**. v.9, n.11, p.1402-1405, 2003..

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

GARRITY, G. M.; BELL, J.A.; LILBURN, T.G. et al. **Taxonomic outline of the prokaryotes bergey's manual of systematic of bacteriology**. 2. Ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 2004.

GRECA, H.; LANGONI, H.; SOUZA, L.C. Brazilian Spotted Fever: a reemergent zoonosis. **Journal Of Venomous. And Toxins Including Tropical Diseases** v. 14, n 1. 2008.

GUEDES, E.; LEITE, R.C.; PRATA, M.C.A; PACHECO, R.C.; WALKER, D.H.; LABRIUNA, 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**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 8, p. 841-845, 2005.

HORTA, M. C.; LABRUNA, M.B.; PINTER, A.; LINARDI, P.M.; SCHUMAKER, T.T.S. et al. *Rickettsia* infection in five areas of the state of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 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. et al. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian spotted fever-

endemic area in the state of São Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsia* and 40 another spotted fever group Rickettsia. **The American Journal of tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 1, p. 93-97, 2004.

HORTA, M.C. **Pesquisa de infecção por Riquetsias do Grupo da Febre Maculosa em humanos, equídeos, caninos e em diferentes estádios da vida de *Amblyomma cajennense*, provenientes de uma área endêmica do Estado de São Paulo**. 2002. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo, São Paulo.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Unidades da federação, estados, Bahia. Rio de Janeiro: IBGE, 2010. Disponível em: <www.ibge.gov.br> . Acesso em: 10 dezembro 2016.

KRAWCZAK, F.S.; NIERI-BASTOS, F.A.; NUNES, F.P.; SOARES, J.F.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M.B., et al. Rickettsial infection in *Amblyomma cajennense* ticks and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in a Brazilian spotted fever – endemic area. **Ticks and Tick Borne Diseases Parasites & Vectors**. v. 715, n.72. 2014.

LABRUNA, M. B. Ecology of Rickettsia in South America. **Annals of the New York Academy of Sciences, New York**, v. 1166, n. 1, p. 156-166, 2009.

LABRUNA, M. B. et al. Ticks (Acari: Ixodidae) from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. **Systematic and Applied acarology**, v. 10, p. 17-32, 2005.

LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L.M.A.; SCHUMAKER, T.T.S.; CAMARGO, E.P. et al. Parasitism of Domestic Swine (*Sus scrofa*) by *Amblyomma* Ticks (Acari: Ixodidae) on a Farm at Monte Negro, Western Amazon, Brazil. **J. Med. Entomology Journal of Medical Entomology**, v. 39, n. 1, p. 241-243, 2002.

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, p. 249-256, 2007.

LABRUNA, M. B.; MATTAR, S.; NAVA, S.; BERMUDEZ, S.; VENZAL, J.M.; DOLZ, G.; ABARCA, K.; ROMERO, L.; SOUSA, R.; OTEO, J.; ZAVALA-CASTRO, J. et al. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. **Revista. MVZ Cordoba**, v. 16, n.2, p. 2435–2457, 2011.

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

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

LEMOS, E.R.S. Rickettsioses: breve considerações. **SIERJ**. p. 2 – 3. 2012.

LOPES, M.G. **Infecção por Rickettsia spp., em equídeos do centro-norte do Piauí**. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental aplicada à Zoonoses). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo. 2012.

LOPES, M.G.; JUNIOR, J.M.; FOSTER, R.J.; HARMSSEN, B.J.; SANCHEZ, E.; MARTINS, T.F.; QUIGLEY, H.; MARRILI, A.; LABRUNA, M.B. et al. Ticks and rickettsiae from wildlife in Belize Central America. **Parasites & Vectors**. v. 9, n. 62, p.1 – 7. 2016.

MADEIRA, A. Surto de febre maculosa no Estado de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** v. 13, n. 364, 2004.

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

MANGOLD, A.J.; BARGUES, M.D.; MAS-COMA, S. et al. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of Rhipicephalus and other tick genera among Metastriata (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**. v. 84, n. 6, p. 478 – 484, 1998.

MARTINS, M. E. P.; BRITO, W.M.E.D.; LABRUNA, M.B.; FILHO, J.M.; SOUSA-MARTINS, K.C.; VIEIRA, R.P. et al. Inquérito epidemiológico de suposto foco de Febre Maculosa., **Revista Ciencia. Animal. Brasileira**., Goiânia, v.17, n.3, p. 459-471, 2016.

MARTINS, T. F. ; MOURA, M.M.; LABRUNA, M.B.et al. Life-cycle and host preference of *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Experimental and Applied Acarology.**, v. 56, n. 2, p. 151–158, 2012.

MARTINS, T. F.; ONOFRIO, V.C.; BARROS-BATTESTI, D.M.; LABRUNA, M.B. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: Descriptions, redescriptions, and identification key. **Ticks and Tick-borne Diseases.** v. 1, n. 2, p. 75–99. 2010.

MCDADE, J. E.; NEWHOUSE, V. F. Natural history of *Rickettsia rickettsii*. **Annual review of microbiology.**, v. 40, n. 1, p. 287–309, 1986.

MCINTOSH, D.; BEZERRA, R.A.; LUZ, H.R.; FACCINI, J.H.L.; GAIOTTO, F.A.; GINÉ, G.A.F.; ALBUQUERQUE, G.R., et al. Detection of *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma loginrostre* (Acari: Ixodidae) from Bahia state, Northeast Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology.** v. 46, n. 3, p. 879 – 883. 2015.

MEDEIROS, A. P. et al. Spotted fever group *Rickettsia* infecting ticks (Acari: Ixodidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 8, p. 926–930, 2011.

MEDEIROS, A.P.; MOURA, A.B.; SOUZA, A.P.; BELLATO, V.; SARTOR, A.A.; VIEIRA-NETO, A.; MORAES-FILHO, J. et al. Antibodies against rickettsiae from spotted fever groups in horses from two mesoregions in the state of Santa Catarina , Brazil. **Revista Arquivo Brasileiroa Medicina Veterinária e Zootecnia.** vV. 65, n.6, p. 1713–1719. 2013.

MELLES, H. H. B.; COLOMBO, S.; LEMOS, E.R.S. et al. Isolamento de *Rickettsia* em Cultura de Células Vero. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 32, p. 469-473., 1999.

MONTEIRO, J. L.; FONSECA, F. Typho exantemático de São Paulo: novas experiências sobre a transmissão experimental por carrapatos – (*Boophilus microplus* e *Amblyomma cajennense*). **Brasil Medico**, v. 16, n. 48, p. 993 – 995, 1933.

NAVA, S.; BEATI, L.; LABRUNA, M.B.; CÁCERES, A.G.; MANGOLD, A.J.; GUGLIELMONE, A.A. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new

species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844, and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). **Ticks and Tick-Borne Diseases**. v. 5, n. 3, p. 252-276. 2014.

OLIVEIRA, P.B. **Ocorrência de anticorpos anti-Rickettsia spp. em cães e equídeos da zona rural do município de Ilhéus, Bahia**. Dissertação (Ciência Animal). Universidade Estadual de Santa Cruz – Bahia. 2017.

OTOMURA, F.H.; SANGIONI, L.A.; PACHECO, R.C.; LABRUNA, M.B.; GALHARDO, J.A.; RIBEIRO, M.G.; TEODORO, U. Anticorpos asnti-rickettsias do grupo febre maculosa em equídeos e caninos no norte do Estado do Paraná, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 62, n. 3, p. 761 – 764, 2010.

PADDOCK C.D. The science and fiction of emerging rickettsioses. **Annals of the New York Academy of Sciences**., v. 1166, n. 1, p. 133-143., 2009.

PADDOCK C.D.; SUMMER, J.W.; COMER, J.A.; ZAKI, S.R.; GOLDSMITH, C.S.; GODDART, J.; MCLELLAN, S.L.F.; TAMMINGA, C.L.; OHL, C.A. et al. *Rickettsia parkeri*: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. **Clinical infectious diseases. : an official publication of the InfectiousDiseases Society of America**., v.ol. 38, n. 6, p. 805- 811., 2004.

PADILHA, A.F. **Detecção sorológica e molecular de espécies de genero Rickettsia em pequenos roedores de três municípios de Minas Gerais com diferentes perfis de endemicidade**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais.

PARKER, R. R.; KHOLS, G.M.; COX, G.W.; DAVIS, G.E. et al. Observations on an infectious agent from *Amblyomma maculatum*. **Public Health Reports**., v. 54, p. 1482–1484. 1939.

PAROLA, P. ; PADDOCK, C.D.; SOCOLOVSCHI, C.; LABRUNA, M.B.; MEDIANNIKOV, O.; KERNIF, T.; ABDAD, M.Y.; STELOS, J.; BITAM, I.; FOURNIER, P.E.; RAOULT, D. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. **Clinical microbiology Reviews**., v. 26, n. 4, p. 657-702, 2013.

PAROLA, P. RAOULT, D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. **Clinical Infectious Diseases .Chicago Journals**. v.33, n. 6, p.897-928.749, 2001.

PINTER, A.; LABRUNA, M.B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **The New York Academy of Sciences. N. Y. Acad. Sci.**, v.1078, n.1, p.523-529, 2006.

RICKETTS, H. T. Some aspects of Rocky Mountain spotted fever as shown by recent investigations. **Reviews of infectious Diseases. Medicine Rec.**, v. 1376, n. 6, p. 1227843–1231845., 1909.

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

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

SOCOLOVSCHI, C.; MEDIANNIKOV, O.; RAOULT, D.; PAROLA, P. Update on tick-borne bacterial diseases in Europe. Update on Tick-Borne Rickettsioses around the World : a Geographic Approach, **Parasites.** v. 26, n. 4, p. 657–702. 2009.

SOUZA, C. E.; MORAES-FILHO, J.; OGRZEWALSKA, M.; UCHOA, F.; HORTA, M.C.; SOUSA, S.S.; BORBA, R.C.; LABRUNA, M.B. Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. **Veterinary Parasitology.**, v. 161, n. 1-2, p. 116–121., 2009.

SPOLIDORIO, M. G.; LABRUNA, M.B.; MACHADO, R.Z.; MORAES-FILHO, J.; ZAGO, A.M.; DONATELE, D.M.; PINHEIRO, S.R.; SILVEIRA, I.; CALIARI, K.M.; YOSHINARI, N.H. Survey for tick-borne zoonoses in the state of Espírito Santo, Southeastern Brazil. **The American Journal of tropical Medicine and Hygiene.**, v. 83, n. 1, p. 201-206, 2010.

SZABÓ, M.; LABRUNA, M.B.; CASTAGNOLLI, K.C.; GARCIA, M.V.; PINTER, A.; VERONEZ, V.A.; MAGALHÃES, G.M.; CASTRO, M.B.; VOGLIOTTI, A. Ticks (Acari: Ixodidae) parasitizing humans in an Atlantic rainforest reserve of Southeastern Brazil with notes on host suitability. **Experimental and Applied Acarology.**, v. 39, p. 339 – 346, 2006.

SZABÓO, M.; PINTER, A.; LABRUNA, M.B. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. **Frontiers in Cellular Infection Microbiology**, v. 3, p. 1–9, 2013.

UENO, T.,E.,G. **Infecção experimental de equinos por *Rickettsia rickettsii* e avaliação da transmissão para carrapatos *Amblyomma cajennense***. Tese (Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2014.

WEINERT, L. A.; WERREN, J.H.; AEBI, A.; STONE, G.N.; JIGGINS, F.M. Evolution and diversity of Rickettsia bacteria. **BMC Biology**, v. 7, n. 6, p. 1-15. 2009.

WEISS, E.; MOULDER, J.W. The Rickettsias and Clamydias. In: KREIG N.R.; HOULT J.G. **Manual of systematic Bacteriology**. Baltimore: Bengey. v.1. 1984.

YU, X.J.; WALKER, D.H. The order of Rickettsiales. In: DWORKIN, M. (Ed.) **The prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiology community**, 3 ed. New York: Springer, Velag, 2003. 5237 p.

APÊNDICE

Apêndice – A: Entrevista semi-estruturada aplicada nas fazendas durante as coletas dos sangues dos equídeos.

Propriedade: _____ Data _____

Município: _____

Proprietário: _____

Endereço: _____

Contato: _____

Histórico de doenças: _____

Sinais clínicos: _____

Tratamento: _____

Acompanhamento de veterinário Sim () Não ()

Histórico de Aborto: _____

Tipo de alimentação:

Capim () Feno () Ração () Outros (): _____

Instalações: _____

Manejo: _____

Vermifugação: () Não () Sim. Frequência: ____ Produto: _____

Alternância de produtos: () Não () Sim. Periodicidade: _____

Controle de Carrapatos: () Não () Sim.

Frequência: _____ Produto: _____

Alternância de produtos: () Não () Sim. Periodicidade: _____

VACINAS UTILIZADAS NOS EQUÍDEOS

Doença	Frequência	Doença	Frequência

Presença de outros animais na propriedade:

Bovinos () Caprinos () Ovinos () Suínos () Aves ()
 Felinos/Gatos () Cães () Roedores () Outros (),
 Quais: _____

Na propriedade existe alguma instalação utilizada para estocar alimentos dos equídeos? Não Sim.

Plantas tóxicas e abortivas existentes na região: _____

A água oferecida aos equídeos é proveniente de: Cacimba
Açude Lagoa Poço profundo Cisterna Poço artesiano

A água é oferecida em: Vasilhames dentro das instalações
Vasilhames fora das instalações

Os animais bebem direto na fonte (açude, barragem, etc.)

Histórico de aborto nos outros animais? Quais: _____

Quantos: _____ Período: _____

Observações: _____

Mortalidade/ano: _____

ANEXOS

ANEXO I: Técnica de sorologia da RIFI para *Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia parkeri*

1. No momento do exame sorológico, utilizou-se placa previamente esterilizada, própria para RIFI. Os soros testes e controles foram diluídos em tampão PBS (0,1M, ph 7,5, estéril) a partir da diluição 1:64. Homogeneizar suavemente.
2. A cada poço da lâmina previamente sensibilizada, acrescentou-se 10 µl do soro teste diluído como descrito no item 1;
3. As lâminas foram incubadas à 37°C, durante 30 minutos, em câmara úmida;
4. Passado esse tempo, foram lavadas em PBS, durante dois tempos de cinco minutos;
5. O conjugado anti-equino foi diluído na proporção de 1:80, – 1 µl conjugado, 8 µl do Azul de Evans, 71 µl de PBS.
6. Cada poço recebeu 10 µl do conjugado, sempre protegido da luz;
7. As lâminas foram incubadas à 37°C, durante 30 minutos, em câmara úmida;
8. Ao final, lavou-se as lâminas duas vezes, com PBS, em dois tempos de cinco minutos. Deixou secar em local protegido de qualquer fonte de luz, temperatura ambiente.
9. Quando secas, foi acrescentado 3 a 4 gotas de glicerina nas interseções dos poços, acoplado uma lamínula e procedeu-se leitura em microscópio adequado.

ANEXO II: Técnica de sensibilização das lâminas de RIFI para os agentes *Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia parkeri*.

1. Cada cepa foi cultivada em células vero e colhidas quando notou-se a destruição celular quase que por completo, restando apenas parasitas livres ao meio.
2. Procedeu-se então uma centrifugação a 2500g por 10 minutos. Ao final, resultou na formação de um pelete que foi ressuscitado em um meio previamente preparado composto por 0,1M de tampão salino fosfato (PBS), ph em torno de 7,5, e formol a 2%, nos volumes de 47 e 3 ml, respectivamente.
3. Repetiu-se esse processo de lavagem durante duas vezes.
4. Ao final, obteve-se o antígeno de uso para sensibilização das lâminas.
5. Cada lâmina, contendo 10 poços, recebeu 10 µl do antígeno.
6. Passada a sensibilização foram acondicionadas em estufa a 37°C para que pudessem secar, e posterior a secagem fixadas com metanol, embaladas em grupos de 10 lâminas, devidamente identificadas, e armazenadas à -20°C.