

Manoel Eduardo da Silva

**FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*Rickettsia* spp. EM CÃES DA
CIDADE DE BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS, BRASIL, 2005**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: José Oswaldo Costa

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2007

S586f Silva, Manoel Eduardo da, 1969-
Frequência de anticorpos anti-*Rickettsia* spp. em cães da cidade
de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2005 / Manoel Eduardo da
Silva. – 2007.
35 p. :il.

Orientador: José Oswaldo Costa
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Cão – Doenças – Teses. 2. *Rickettsia* – Teses. 3. Rickettsioses
em animais – Teses. 4. Febre maculosa das montanhas rochosas –
Teses. I. Costa, José Oswaldo. II. Universidade Federal de Minas
Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.708 96

Folhas de assinaturas

Compromissos assumidos com minha formação e desenvolvimento de hábitos sem os quais me perderia e me anularia diante da vida:

- 1. Hábito de ser consciente, crítico, reflexivo (não “visual-auditivo”);*
- 2. Hábito de ser verdadeiro, sincero, autêntico;*
- 3. Hábito de ser justo, participante, solidário;*
- 4. Hábito de ser responsável, nunca me omitindo da autoria de meus atos;*
- 5. Hábito de ser pessoa capaz de decidir e construir – com os dons que DEUS me deu – a vida em comunhão com outros. Pois os outros ajudam-me a ser, compartilham minha existência.*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor José Oswaldo Costa pela acolhida, apoio e estímulo durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Marcelo Bahia Labruna pelo auxílio na realização das análises laboratoriais e orientações na execução da dissertação.

Ao Professor Romário Cerqueira Leite pelo inestimável apoio, colaboração, participação e direcionamento no trabalho realizado.

Ao Professor Walter dos Santos Lima por todo apoio e ensinamentos.

Ao Professor José Ailton da Silva, pela revisão no projeto e cálculo amostral.

Ao amigo Raul Rio Ribeiro, parceiro, pelo brilhantismo nas idéias, exemplo de organização, e pela confiança em mim depositados.

Aos amigos do departamento de parasitologia do ICB que muito contribuíram para coleta dos soros.

A Priscilla pelo auxílio na confecção das figuras deste trabalho.

Aos futuros colegas de profissão, UNIPAC/Conselheiro Lafaiete, pelo auxílio no dia D.

Aos funcionários do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, pela atenção e colaboração na execução do projeto.

À Nádia, do laboratório de computação do DMVP, pelo auxílio na execução e revisão na formatação da dissertação.

Aos colegas da EPAMIG, que apoiaram, ajudaram e incentivaram a persistir no caminho escolhido.

A todos aqueles que de alguma forma colaboraram na realização deste trabalho.

E um agradecimento especial a DEUS revelado em Jesus Cristo, por tantas bênçãos concedidas.

DEDICATÓRIA

À minha esposa, Jesiane, que acreditou sempre na minha capacidade, pelo carinho, amor, compreensão e dedicação que motivaram o cumprimento de mais esta etapa em nossas vidas.

A meus filhos, Victor e Gabriel, razão pela qual, não desisto nunca.

A minha mãe, Dona Hilda, que sempre teve uma palavra amiga e encorajadora, mesmo em momentos de tristeza e perplexidade.

A memória de meu pai, Sr. Manoel, exemplo de luta e dignidade, por mostrar-me o caminho a ser seguido.

SUMÁRIO

	RESUMO	9
	ABSTRACT.....	9
1	INTRODUÇÃO	10
2	LITERATURA CONSULTADA	10
2.1	CARACTERIZAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DOS AGENTES ETIOLÓGICOS DA FEBRE MACULOSA NO BRASIL	10
2.2	<i>Rickettsia</i> spp DESCRITAS NO BRASIL E AVALIADAS NESTE ESTUDO	11
2.2.1	<i>Rickettsia rickettsii</i>	11
2.2.2	<i>Rickettsia parkeri</i>	11
2.2.3	<i>Rickettsia felis</i>	12
2.2.4	<i>Rickettsia belli</i>	12
2.2.5	<i>Rickettsia amblyommii</i>	12
2.3	BIOLOGIA DOS AGENTES EM CÃES, HOSPEDEIROS AMPLIFICADORES, VETORES E NA NATUREZA.....	12
2.4	ASPECTOS CLÍNICOS DA FMB EM CÃES.....	14
2.5	TRATAMENTO DA FMB EM CÃES.....	15
2.6	ASPECTOS CLÍNICOS DA FMB EM HUMANOS	15
2.7	TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO	15
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1	CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO	17
3.2	DEFINIÇÃO DA AMOSTRA.....	18
3.3	REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA – RIFI.....	19
4	RESULTADOS.....	20
4.1	PREVALÊNCIA GERAL PARA <i>Rickettsia spp</i> ENCONTRADA NOS CÃES	20
4.2	ANÁLISE DESCRITIVA DOS ANIMAIS CONSIDERADOS POSITIVOS À REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA – RIFI.....	21
5	DISCUSSÃO	22
6	CONCLUSÕES	24
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
8	ANEXOS.....	32
	Anexo 1 – Questionário	32
	Anexo 2 – Reação de Imunofluorescência Indireta – RIFI	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Participação percentual da população canina de acordo com as regionais administrativas, na população total do município de Belo Horizonte – 2005.	18
Tabela 2	Número de cães submetidos a venopunção para composição da amostra a ser analisada, distribuídos por regionais da Prefeitura de Belo Horizonte, 2005.	18
Tabela 3	Distribuição de cães positivos à RIFI para <i>Rickettsia</i> spp de acordo com a regional administrativa da Prefeitura de Belo Horizonte, 2005.	20

Tabela 4	Títulos apresentados à RIFI para antígenos brutos de <i>Rickettsia</i> spp em soros caninos de diferentes regionais administrativas da Prefeitura de Belo Horizonte, 2005.	21
----------	---	-----------

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Localização do município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.	29
Figura 2	Regionais administrativas de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.....	30
Figura 3	Distribuição dos cães positivos à RIFI para <i>Rickettsia</i> spp nas regionais administrativas de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.	31

RESUMO

A febre maculosa brasileira (FMB), causada por *Rickettsia rickettsii*, doença altamente letal para humanos é endêmica em algumas áreas da Região Sudeste brasileira. O presente trabalho objetivou avaliar a infecção por riquetsias na população canina da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, considerada não endêmica para esta doença. Para representar a população canina do município, 453 soros foram coletados e testados frente a cinco antígenos riquetsiais (*Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia amblyommii*, *Rickettsia felis* e *Rickettsia bellii*) através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Soros reagentes a uma diluição ≥ 64 para pelo menos uma espécie de *Rickettsia* foram considerados positivos. Três dos 453 soros reagiram com *Rickettsia* spp dando uma prevalência geral de 0,66% de infecção por *Rickettsia* na população canina desta cidade. Somente um desses três soros foi considerado homólogo a *Rickettsia 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. Conclui-se que a FMB não é endêmica em Belo Horizonte, muito embora novos trabalhos soropidemiológicos devam ser feitos para monitoramento do status endêmico da doença no município.

Palavras-chave: cão, *Rickettsia*, FMB , prevalência.

ABSTRACT

Brazilian Spotted Fever (BSF), caused by *Rickettsia rickettsii*, is endemic and highly lethal for humans in some areas of Southeastern Brazil. However, in the city of Belo Horizonte, capital of the state of Minas Gerais, BSF is not endemic. The present study aimed to evaluate rickettsial infection among the canine population of Belo Horizonte. For this purpose, 453 dog sera, representing the entire canine population of the city, were tested against five rickettsial antigens (*Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia amblyommii*, *Rickettsia felis* and *Rickettsia bellii*) using the indirect immunofluorescence assay (IFA). Sera were considered positive if reacted with titers ≥ 64 . Only 3 out of 453 sera were reactive to *Rickettsia* spp, giving an overall prevalence of 0.66% of rickettsial infection among the canine population of Belo Horizonte. At least one of these 3 sera was considered homologous to *Rickettsia rickettsii* because it displayed a titer to this species four-fold higher than those elicited for the remaining *Rickettsia* species. We conclude that BSF is not endemic in Belo Horizonte, although new serosurveys must be conducted to verify the endemic status of this area in the near future.

Keywords: dog, *Rickettsia*, RMSF, prevalence.

1 – INTRODUÇÃO

A Febre Maculosa Brasileira (FMB) é uma riquetsiose altamente letal para humanos e endêmica em algumas regiões brasileiras. Embora a bactéria *Rickettsia rickettsii* seja o principal agente etiológico da Febre Maculosa, a doença já foi descrita no Brasil tendo também como agentes a *Rickettsia parkeri* e *Rickettsia felis*. Esses agentes já foram descritos no país em animais e no homem, sendo, no entanto confirmados casos letais para humanos por somente *Rickettsia rickettsii*.

Laboratorialmente, já foi provado que o cão doméstico (*Canis familiaris*) pode se comportar como hospedeiro amplificador para *Rickettsia* spp (Burgdorfer, 1988). Em áreas urbanas o cão mantém uma estreita relação com os seres humanos e pode ter importante papel na cadeia epidemiológica da FMB. Independente de serem ou não hospedeiros amplificadores, os cães são importantes sentinelas para Febre Maculosa Brasileira (Sangioni, 2003).

Embora na América Latina o carrapato *Amblyomma cajennense* seja considerado o principal vetor da *Rickettsia rickettsii* para humanos (Bustamante e Varela, 1947; Rodaniche, 1953; Patino-Camargo, 1941; Guedes et al., 2005; Pinter e Labruna, 2006), no Brasil o *Rhipicephalus sanguineus* é o principal carrapato dos cães, estando presente principalmente nas áreas urbanas (Labruna, 2004a). E mesmo não tendo sido confirmado como vetor da Febre Maculosa para humanos no país, este ixodídeo já foi confirmado nos EUA por Demma et al. (2005), no México por Bustamante e Varela (1947) e como possível vetor na Colômbia por Labruna et al. (no prelo).

Segundo Sangioni (2003) o conhecimento da epidemiologia em regiões com potencial biótico para o desenvolvimento da doença consiste em determinar as condições socioeconômicas da população, a distribuição e densidade dos vetores já incriminados como transmissores, as

condições ecológicas das localidades e as espécies relacionadas com vetores.

A cidade de Belo Horizonte, capital do estado de Minas Gerais, Brasil, é considerada como não endêmica para Febre Maculosa Brasileira e pela primeira vez, como forma inicial de avaliação do status epidemiológico das *Rickettsia* spp e de monitoramento da Febre Maculosa no município se objetivou um estudo para determinar pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), a presença de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii*, anti-*Rickettsia parkeri*, anti-*Rickettsia felis*, anti-*Rickettsia bellii* e anti-*Rickettsia amblyommii* em soro sanguíneo de cães desta cidade. E também estabelecer a soroprevalência de infecção por riquetsias do Grupo da Febre Maculosa e do Grupo Ancestral em cães, assim como associar fatores de risco à ocorrência de anticorpos anti-riquetsiais.

2 - LITERATURA CONSULTADA

2.1 – CARACTERIZAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DOS AGENTES ETIOLÓGICOS DA FEBRE MACULOSA NO BRASIL

As riquetsioses são doenças causadas por bactérias da família *Rickettsiaceae*, constituída pelos gêneros *Rickettsia*, *Orientia*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia* e *Anaplasma* (Silva, 2006).

O gênero *Rickettsia* compreende bactérias da subdivisão alfa (α) da classe Proteobacteria, as quais são coco-bacilos gram-negativos, em associação obrigatória com células endoteliais eucariotas (Weiss e Moulder, 1984; Yu e Walker, 2003).

As riquetsias patogênicas são responsáveis por várias doenças conhecidas como riquetsioses, que são transmitidas pela picada de artrópodes hematófagos como os carrapatos, pulgas e piolhos (hospedeiros invertebrados) ao homem e animais (Weiss e Moulder, 1984).

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 *Rickettsia belli* e *Rickettsia canadensis*, associadas a carrapatos, e poucas outras espécies associadas com anelídeos (sangue-suga); o **Grupo do Tifo** (GT) compreende as espécies *Rickettsia prowazekii* e *Rickettsia 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, sendo as únicas exceções deste grupo *Rickettsia felis* e *Rickettsia akari*, que estão associadas com pulgas e ácaros gamasida, respectivamente (Labruna, 2006a).

Febre Maculosa é o nome genérico para doenças causadas pelas riquetsias do Grupo da Febre Maculosa (GFM). Nas Américas, as espécies de riquetsias causadoras de febre maculosa em humanos são *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia africae*, *Rickettsia akari* e *Rickettsia felis*. Várias outras espécies do **GFM** têm sido descritas em carrapatos nas Américas, porém sem qualquer associação com casos de febre maculosa em humanos (Labruna et al., 2004b).

No Brasil, a febre maculosa por *Rickettsia rickettsii* têm sido relatada em São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo e na Bahia (Silva e Galvão, 2004; Plank et al., 1979). Mais recentemente (2002 a 2006) foram diagnosticados os primeiros casos de febre maculosa nos estados de Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul (Labruna, 2006a). No entanto, a confirmação da espécie de *Rickettsia* envolvida nos casos fora da região sudeste, associado a fatores clínicos e epidemiológicos, sugere que pelo menos parte deles, não tenha sido causados pela espécie *Rickettsia rickettsii* (Labruna, 2006a).

2.2 – *Rickettsia* spp DESCRITAS NO BRASIL E AVALIADAS NESTE ESTUDO

2.2.1 - *Rickettsia rickettsii*

Rickettsia rickettsii é o agente etiológico da mais grave riquetsiose das Américas, chamada no Brasil de Febre Maculosa Brasileira (FMB) ou febre do carrapato. Na Colômbia, Panamá, México e Costa Rica esta mesma doença recebe o nome de “Fiebre Manchada”, e nos Estados Unidos é conhecida como “Rocky Mountain Spotted Fever” (Guedes et al., 2005).

Nos vertebrados, incluindo os humanos, *Rickettsia rickettsii* se multiplica nas células endoteliais. Nos carrapatos vetores da doença, a bactéria causa infecção disseminada, multiplicando em células dos intestinos, ovários, glândulas salivares, túbulos de malpighi e hemolinfa (Weiss e Moulder, 1984; Yu e Walker, 2003).

Os carrapatos vetores de *Rickettsia rickettsii* para humanos, conhecidos até o momento, são *Dermacentor andersoni*, *Dermacentor variabilis* e *Rhipicephalus sanguineus* nos EUA (Demma et al., 2005); *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma cajennense* no México (Bustamante e Varela, 1947); *Amblyomma cajennense* no Panamá (Rodaniche, 1953); *Amblyomma cajennense* (Patino-Camargo, 1941) e possivelmente *Rhipicephalus sanguineus* na Colômbia (Labruna, 2006a); e no Brasil *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma aureolatum* (Guedes et al., 2005; Pinter e Labruna, 2006).

2.2.2 - *Rickettsia parkeri*

Esta bactéria foi isolada em 1939 por R. R. Parker do carrapato *Amblyomma maculatum* coletado em vacas dos EUA (Parola et al., 2005), sendo inicialmente tratada como uma bactéria não patogênica. Na década de 90, vários casos de febre maculosa foram reportados no Uruguai, os quais não tiveram a espécie de *Rickettsia* definida, embora estivessem associados ao parasitismo pelo carrapato *Amblyomma triste* (Conti-Diaz et al., 1990; Conti-Diaz, 2001). Paddock et al.

(2004) comprovou o primeiro caso de febre maculosa em humano, causado por *Rickettsia parkeri*, nos EUA. Recentemente, no Uruguai, a bactéria *Rickettsia parkeri* foi detectada em carrapatos *Amblyomma triste* e em pacientes que sofreram a doença (Venzal et al., 2004). Atualmente a febre maculosa causada por *Rickettsia parkeri* é reconhecida nos EUA e Uruguai, com suspeita de ocorrência no Brasil, onde já foi detectada e isolada em carrapatos *Amblyomma triste* e *Amblyomma dubitatum* (Labruna et al. 2004; Silveira et al. 2005).

A febre maculosa causada por *Rickettsia parkeri* se caracteriza por um curso não grave, não havendo letalidade registrada. Tal fato tende a dificultar o diagnóstico clínico, passando despercebida em locais onde nunca fora relatada. Esta doença tende a diferenciar-se clinicamente da febre maculosa causada por *Rickettsia rickettsii*, por apresentar linfadenopatia e uma lesão papular típica (“tache noir”) no sítio de fixação do carrapato (Conti-Diaz, 2001; Paddock et al., 2004).

2.2.3 - *Rickettsia felis*

Rickettsia felis é uma espécie relativamente nova, descrita na década de 90 nos EUA, sendo considerada o agente etiológico da febre maculosa transmitida por pulgas. Desde então, ela já foi relatada em diferentes países de todos os continentes do mundo, indicando uma distribuição cosmopolita (La Scola et al. 2002, Horta et al. 2006). A imensa maioria desses relatos foi em pulgas do gênero *Ctenocephalides*, principalmente *Ctenocephalides felis felis*. Nas Américas, *Rickettsia felis* já foi detectada em pulgas dos EUA, México, Brasil, Peru e Uruguai, com casos humanos da doença apenas nos primeiros três países (Galvão et al., 2004). Não há registro de casos letais causados por *Rickettsia felis*. É extremamente baixo o número de casos relatados desta doença no mundo, contrastando com a distribuição disseminada do agente e dos principais hospedeiros invertebrados. Além disso, a transmissão do agente pela pulga, e o próprio mecanismo de transmissão,

continuam obscuros, sem comprovação científica (Labruna, 2006a).

2.2.4 - *Rickettsia bellii*

Rickettsia bellii foi inicialmente relatada em carrapatos nos EUA (Weiss e Moulder 1984). Atualmente, é a riquetsia mais prevalente em carrapatos no Brasil, tendo sido detectada e/ou isolada em *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma dubitatum*, *Amblyomma humerale*, *Amblyomma scalpturatum*, *Amblyomma rotundatum*, *Amblyomma oblongoguttatum*, *Amblyomma ovale*, *Ixodes loricatus* e *Haemaphysalis juxtakochi* (Labruna et al., 2004; Pinter e Labruna, 2006). Muito embora seja altamente prevalente nas populações de carrapatos, com frequências de infecção variando de 5 a 100%, não há evidências de infecção humana ou animal por *Rickettsia bellii* (Labruna et al., no prelo).

2.2.5 - *Rickettsia amblyommii*

Rickettsia amblyommii foi isolada em 1974 do carrapato *Amblyomma americanum* nos EUA e mais recentemente detectada em *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma coelebs* na floresta amazônica brasileira e também em *Amblyomma longirostre* no Brasil. Esta bactéria pode ser relativamente frequente em algumas áreas americanas, pois aproximadamente 40% dos carrapatos *Amblyomma americanum* podem estar infectados e, todos os três estágios deste carrapato parasitam humanos (Parola et al., 2005).

2.3 - BIOLOGIA DOS AGENTES EM CÃES, HOSPEDEIROS AMPLIFICADORES, VETORES E NA NATUREZA

Embora ainda não haja comprovação de qualquer espécie animal, incriminada como hospedeiro amplificador de *Rickettsia rickettsii* para *Amblyomma cajennense* no Brasil, diferentes trabalhos realizados desde 1930 têm levado a suspeitar das capivaras, gambás e coelhos silvestres (Labruna, 2006a).

Segundo Labruna (2006a) para que uma espécie de vertebrado seja considerada como um bom hospedeiro amplificador de *Rickettsia rickettsii* na natureza, ela deve preencher basicamente, 05 (cinco) quesitos:

1. Ser abundante na área endêmica para a febre maculosa;
2. Ser um bom hospedeiro do carrapato vetor em condições naturais;
3. Ser susceptível à infecção por *Rickettsia rickettsii*;
4. Manter a *Rickettsia rickettsii* circulante em níveis plasmáticos suficientes para infectar carrapatos que nele se alimentam;
5. Ter uma alta taxa de renovação populacional (quanto maior a renovação, maior será a introdução de animais susceptíveis na população).

Os cães parecem preencher muito bem todos esses quesitos. Quando se refere a cães domiciliados, muitas vezes sua reprodução é manipulada pelo homem, apresentando taxas de natalidade extremamente baixas; não apresentando portanto, taxa de renovação populacional suficiente para garantir a presença de animais riquetsêmicos que infectarão novas linhagens de carrapatos (Labruna, 2006a).

Embora Norment e Burgdorfer (1984) relatassem que cães domésticos experimentalmente infectados com *Rickettsia rickettsii* não desenvolvam riquetsemia para infectar mais que 1% de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*, o papel do cão permanece controverso na literatura (Weiss e Moulder, 1984). Piranda et al. (2006) constataram que 20% dos carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* se infectaram quando alimentados em cães riquetsêmicos, sugerindo um papel amplificador deste animal em áreas endêmicas.

Casos humanos de febre maculosa (*Rickettsia rickettsii*) transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* no Arizona (EUA) reergueram a hipótese de cães desempenharem o papel de

hospedeiros amplificadores de *Rickettsia rickettsii*, uma vez que todos os estágios parasitários de *Rhipicephalus sanguineus* parasitam primariamente o cão doméstico, o qual foi possivelmente a fonte de infecção para os carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* no foco endêmico do Arizona (Demma et al., 2005).

Algumas populações de carrapatos apresentam 14,3 a 100% dos indivíduos infectados por espécies de *Rickettsia* spp sendo que elas nunca foram encontradas infectando hospedeiros vertebrados (Parola et al., 2005).

Considera-se que a *Rickettsia rickettsii* mantém seu ciclo vital na natureza, entre o carrapato vetor (*Dermacentor andersoni* e *Dermacentor variabilis*) e algumas espécies de pequenos roedores, chamadas de hospedeiro amplificador (*Microtus pensilvanicus*, *Pitymus pinetorum*, *Peromyscus leucopus* e *Sigmodon hispidus*) (Burgdorfer, 1988). Embora a bactéria também seja transmitida hereditariamente entre gerações sucessivas de uma população de carrapatos, apenas este mecanismo não seria suficiente para mantê-la ativa ao longo do tempo, uma vez que há evidências laboratoriais de que *Rickettsia rickettsii* é patogênica para o carrapato vetor (Burgdorfer, 1988). Desta forma, o efeito amplificador que alguns animais silvestres desempenham deve existir para garantir a manutenção da bactéria na natureza. Nesse caso, o hospedeiro amplificador mantém a bactéria em níveis altos em sua corrente sanguínea por alguns dias ou semanas, garantindo que novos carrapatos se infectem, amplificando a infecção na população de carrapatos (Burgdorfer, 1988).

Magnarelli et al. (1981) observaram que a prevalência de carrapatos infectados, detectados por imunofluorescência direta é a mesma tanto em áreas endêmicas como em áreas não-endêmicas, fato este que reduz aparentemente a importância do carrapato como indicador de atividade riquetsial em uma determinada área, isto é, embora a presença do ixodídeo infectado seja necessária, ela em geral não seria suficiente para produzir casos humanos.

Entretanto devem ser considerados os casos de alta infestação por carrapatos que podem alterar essa relação. Dessa forma, para que haja atividade riquetsial poderia ser necessária a coexistência de uma relação de positividade entre vetores, hospedeiros e reservatórios, incluindo animais silvestres (Cardoso et al., 2006).

Nos vertebrados, a riquetsemia geralmente é breve, e conseqüentemente seu papel na infecção de novas linhagens de carrapatos é limitado. Na natureza, a manutenção do ciclo das riquetsias é garantida pela capacidade dos carrapatos atuarem como vetores reservatórios e/ou amplificadores (Parola et al., 2005).

Nos carrapatos, existe transmissão riquetsial transovariana e sobrevivência transestadial. Estes mecanismos são formas importantes de manutenção das *Rickettsia* spp nas populações de carrapatos. Ovos e larvas de *Dermacentor andersoni* originadas de teleóginas infectadas na fase larval se apresentam 100% infectados por *Rickettsia rickettsii*. Quando porém, a teleóquina se infecta, menos de 100% de seus ovos e larvas apresentam-se infectados por *Rickettsia* spp (Burgdorfer et al., 1975).

Para *Rickettsia bellii* e *Rickettsia amblyommii*, a transmissão transovariana é provavelmente, a principal via de manutenção dessas riquetsias na natureza (Parola et al., 2005).

Em condições laboratoriais, carrapatos infectados por uma espécie tornam-se incapazes de manter e transmitir outras espécies de *Rickettsia* spp (Burgdorfer et al., 1988). Nenhum carrapato foi encontrado na natureza infectado por mais de uma espécie de *Rickettsia* (Labruna, 2004).

O *Amblyomma cajennense* é encontrado em abundância em todos os estados das regiões Sudeste e Centro-Oeste no Brasil, porém com distribuição limitada nas demais regiões, sendo a principal espécie de carrapato encontrada parasitando seres humanos no centro-sul brasileiro e considerado o principal vetor da febre maculosa (Cardoso, 2006).

O cão doméstico é um dos hospedeiros primários do estágio adulto do carrapato *Amblyomma aureolatum*, vetor de febre maculosa brasileira na região da Grande São Paulo, estado de São Paulo (Pinter et al., 2004; Pinter e Labruna, 2006).

2.4 - ASPECTOS CLINICOS DA FMB EM CÃES

Os achados clínicos iniciais são febre (39,2 a 40,5°C), ocorrendo de 4 a 5 dias após a picada do carrapato (Warner, 2002), anorexia, depressão, petéquias e equimoses, epistaxe, injeções esclerais e conjuntivite são vistas nas mucosas oral, ocular e genital (Breitschwerdt, 1988), tosse, dispnéia e aumento de sons broncovesiculares, linfadenite, perda de peso e desidratação são também sinais clínicos comuns (Lissman, 1980).

Edema de extremidades é freqüentemente encontrado envolvendo lábios, orelhas, mucosa peniana e escroto. No estágio final da doença ou na convalescença são encontradas necroses de extremidades. Outros achados podem incluir dor abdominal, anorexia, status mental alterado (sinais de depressão e esturpor), mialgia, poliartrite, alterações vestibulares (andar em círculo e nistagmo). Alguns sinais como lesões disseminadas e edemas substanciais indicam prognóstico ruim (Warner, 2002).

Anemia e leucocitose também podem estar presentes, além de injúrias no endotélio vascular que resulta em alterações da permeabilidade vascular.

Cães infectados experimentalmente têm aumentado a atividade sorológica da fosfatase alcalina, dos níveis de colesterol, hiponatremia e hipocloremia (Lissman, 1980).

Cães recém chegados a áreas endêmicas ou que tiveram a primeira exposição a carrapatos após perda da atividade dos anticorpos maternos podem ter um curso mais severo da infecção (Lissman, 1980). Anticorpos maternos podem diminuir a severidade clínica na exposição inicial ao

agente. O período de incubação varia de 2 a 14 dias após a transmissão pelo carrapato (Weiss e Moulder, 1984).

2.5 - TRATAMENTO DA FMB EM CÃES

Os antibióticos de escolha para o tratamento da FMB são as tetraciclina (25 a 30 mg/kg), doxiciclina (10 a 20 mg/kg) ou cloranfenicol (15 a 30 mg/kg). A antibioticoterapia apropriada, dada antes da necrose tecidual ou desenvolvimento das desordens da coagulação, reduz a severidade da doença. Tratamento de suporte deve ser dado em cães desidratados, com falhas renais, choque ou diátese hemorrágica. A mortalidade está diretamente relacionada com tratamentos incorretos ou falhas no diagnóstico. A imunidade naturalmente adquirida é um fator de proteção importante contra a manifestação da doença clínica. Cães saudáveis de áreas endêmicas, freqüentemente apresentam anticorpos anti-*Rickettsia spp*, possivelmente como resultado de uma infecção prévia a *Rickettsia rickettsii* ou outra *Rickettsia spp* não patogênica (Warner, 2002).

2.6 - ASPECTOS CLINICOS DA FMB EM HUMANOS

A doença manifesta-se no homem subitamente com febre contínua, calafrios, prostração, mal estar, mialgia, artralgia principalmente nos tornozelos, punhos e cefaléia após um período de incubação de 2 a 14 dias. Erupções cutâneas maculopapulares aparecem nas extremidades, entre o 2º e 6º dia pós-infecção, estendendo-se para o resto do corpo, face e região palmar e plantar. Ao se replicar no endotélio vascular, uma vasculite se instala conduzindo a ativação de plaquetas, ativação do sistema de coagulação, trombose e aumento da permeabilidade vascular. Distúrbios hemostáticos, incluindo trombocitopenia e tempo prolongado de coagulação, estão relacionados com efeitos citopáticos celulares e atividades de endotoxinas da *Rickettsia rickettsii* (Angerami et al., 2006; Melles et al., 1992).

Os sintomas clássicos são: febre alta, cefaléia, mialgia, dor abdominal e aparecimento de manchas hemorrágicas (petéquias, máculas) na pele. A letalidade em casos não tratados com antibióticos específicos (principalmente do grupo das tetraciclina e cloranfenicol) pode chegar a mais de 80% (Galvão, 1996).

2.7 - TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Embora o diagnóstico da Febre Maculosa baseie-se em sinais e sintomas clínicos característicos, o mesmo requer confirmação laboratorial, necessária para distinção de outras doenças. A confirmação laboratorial pode ser feita através da pesquisa de anticorpos específicos, presentes alguns dias após o aparecimento da doença; através do isolamento do agente em amostras de sangue ou biópsia de pele; e ainda de amostras de carrapatos coletados de pacientes ou de animais reservatórios e de vida livre no meio ambiente (Sangioni, 2003).

O diagnóstico laboratorial das riquetsioses consiste em provas específicas, dentre as quais, os métodos sorológicos são os mais usuais, como *Weil-Felix*, baseado em aglutinação do soro de antígenos *Proteus* com anticorpos anti-riquetsiais; Fixação do Complemento; Microaglutinação; Hemaglutinação Indireta; Aglutinação de Látex; Ensaio Imunoenzimático (Elisa), com anticorpos policlonais ou monoclonais; Imunofluorescência Indireta (RIFI); teste de proteção por vacinas em cobaias; testes de neutralização de toxinas riquetsiais em ratos com anti-soros preparados em cobaias; Western Blotting, técnica mais específica, constituindo-se uma poderosa ferramenta diagnóstica para estudos soropidemiológicos e confirmação dos resultados obtidos por testes sorológicos convencionais e tipificação sorológica pela microimunofluorescência (TMS) (Horta, 2002).

Na escolha do teste sorológico a ser utilizado no diagnóstico de infecções agudas, devem ser consideradas a sensibilidade, o tempo necessário para o aparecimento de títulos de anticorpos

detectáveis, as quantidades e custos dos antígenos necessários e o material mínimo requerido. Para os estudos soro-epidemiológicos, recomendam-se testes com alta especificidade para evitar resultados falso-positivos (Parola et al., 2005).

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) apresenta uma sensibilidade de 94 a 100% e especificidade de 100% (Melles et al., 1999). Ainda que os resultados não revelem confiabilidade com o agente etiológico, podendo apresentar reações cruzadas com outras riquetsias não patogênicas, esse teste tem sido preconizado como método padrão para o diagnóstico laboratorial.

A RIFI é a técnica de referência utilizada pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC) e por muitos laboratórios de Saúde Pública, podendo ser usada para detectar anticorpos IgM e IgG em amostras pareadas de soro, na fase aguda e de convalescença da doença. É um teste simples e econômico para o diagnóstico precoce de riquetsioses, estudos soro-epidemiológicos e para a diferenciação de isolados de riquetsias (La Scola e Raoult, 1997).

O teste de microimunofluorescência, uma adaptação da RIFI, tem sido utilizado para a tipificação de riquetsias, principalmente nos estudos sobre determinação das relações taxonômicas e epidemiológicas entre riquetsias do Grupo da Febre Maculosa (GFM). Este teste é simples, bastante aplicável, possibilita com uma única gota de soro diluído a reação simultânea com 9 a 16 antígenos diferentes, aumentando a capacidade de diferenciação entre as cepas do GFM e Grupo Tifo.

Com o objetivo de reduzir a demora dos diagnósticos, vários métodos laboratoriais foram desenvolvidos para a detecção direta de riquetsias nos materiais clínicos de pacientes em fase de infecção aguda. Como a imunodeteção de riquetsias em tecidos (imunohistoquímica) ou em células endoteliais circulantes extraídas de sangue total além do isolamento em cultura de

células, técnica de "shell vial", e a amplificação de DNA riquetsial pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (La Scola e Raoult, 1997).

A imunohistoquímica é a metodologia utilizada para o diagnóstico em biópsia de pele de pacientes infectados (antes da antibioticoterapia ou dentro das primeiras 48 horas pós-antibiótico) ou em tecidos de autópsia, frescos ou preservados em formalina, embebidos em parafina e, então, submetidos a imunofluorescência ou imunoperoxidase.

O isolamento do agente, a partir de amostras humanas ou de artrópodes, é realizado através de cultivo, principalmente de células Vero, associada ou não a técnica de "shell vial", que permite a penetração das bactérias dentro da célula (Labruna, 2006b).

O isolamento pela técnica de "shell vial" possibilita a obtenção de resultados positivos antes da soroconversão sendo portanto utilizado no diagnóstico de casos agudos, pois na fase de riquetsemia anticorpos não são detectáveis no sangue. Quando isolado do carrapato, aliado aos dados epidemiológicos, também permite estabelecer em pesquisas, as delimitações de áreas endêmicas (Sangioni, 2003). Pode ser realizado a partir de materiais como triturado de coágulo, plasma, biópsia de pele, tecido de necropsia e amostras de artrópodes. Tais materiais podem ser inoculados em animais experimentais, culturas primárias de embrião de galinha ou em linhagens de células VERO, HeLa, WI-38, LLC-MK2, BSC-1 ou Hep-2 entre outras (Cox, 1941; Cory et al. 1974; Johnson e Pederson, 1978). A multiplicação riquetsial pode ser acompanhada através do efeito citopático (ECP) e a confirmação do grupo de riquetsias é feita através da RIFI (La Scola e Raoult, 1997).

O isolamento seguido de caracterização molecular é fundamental para a descoberta de novas riquetsioses, especialmente em regiões onde as riquetsias ainda não tenham sido identificadas, pois diferentes riquetsioses podem apresentar as mesmas manifestações clínicas e, os testes

sorológicos, frente a determinados antígenos, podem resultar positivos em função da existência de reações cruzadas (Walker e Cain, 1980).

As técnicas de biologia molecular para a detecção e identificação de riquetsias podem ser baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR), PCR associada à análise de polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (PCR/RFLP) ou, ainda, PCR/Sequenciamento. A reação em cadeia pela polimerase (PCR), que usa oligonucleotídeos iniciadores e Taq DNA polimerase para sintetizar cópias quantitativas de uma simples amostra, tem se mostrado como uma técnica de valor para detecção e identificação de *Rickettsia* spp patogênicas em vetores infectados, em amostras de tecidos ou sangue de indivíduos infectados. Com o desenvolvimento de seqüenciadores automáticos de nucleotídeos, a análise das seqüências de bases dos produtos amplificados pela PCR tornou-se rápida e sensível possibilitando a determinação do gênero e espécie do agente (Sangioni, 2003). A PCR/RFLP, primeira técnica molecular utilizada na identificação de riquetsias, apresenta resultados reprodutíveis, porém, muitos isolados apresentam o mesmo perfil eletroforético, não sendo possível a identificação de todas as espécies do GFM. Os diagnósticos baseados na PCR podem ser realizados em laboratórios ou centros de referência, fornecendo resultados rápidos (24 horas) e positivos mesmo em pacientes previamente submetidos à terapia com antibióticos. Esta é a técnica de escolha para diagnóstico precoce, especialmente antes da soroc conversão (La Scola e Raoult, 1997).

O diagnóstico direto do agente pode ser feito através de reação de

imunofluorescência direta (RIFD); da morfologia do agente, determinada por microscópio eletrônico; citopatogenicidade em cultura de células Vero; patogenicidade em cobaias e em ovos embrionados; composição protéica por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida; e composição de DNA.

As *Rickettsia* spp também podem ser visualizadas pelo teste de hemolinfa promovendo uma rápida detecção do agente em carrapatos infectados. Essa prova é especialmente usada quando a prevalência de carrapatos infectados é baixa ou desconhecida e se deseja selecionar o maior número possível de carrapatos possivelmente infectados.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

Belo Horizonte, capital de Minas Gerais, está situada na região sudeste do Brasil (Fig. 1). Possui uma extensão geográfica de 335,5 Km², onde predomina o clima tropical, com temperatura média anual de 20,5°C. O índice de precipitação pluvial é relativamente alto, 1200 mm anuais, com a concentração (80-85%) de chuvas no período de novembro a março (INMET, 2001).

A população canina no ano de 2005, conforme censo realizado pelo Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte (CCZ BH), foi de 315.824 animais, divididos em nove distritos sanitários, coincidentes com as regionais administrativas, segundo a prefeitura: Barreiro, Centro-Sul, Leste, Nordeste, Noroeste, Norte, Oeste, Pampulha, e Venda Nova (Fig. 2 e Tab. 1).

Tabela 1 – Participação percentual da população canina de acordo com as regionais administrativas, na população total do município de Belo Horizonte – 2005.

Regionais	População canina	
	Número	Percentual
Barreiro	42.334	13,40
Venda Nova	41.184	13,04
Noroeste	40.614	12,86
Leste	40.405	12,79
Nordeste	38.307	12,13
Centro Sul	31.027	9,82
Norte	28.921	9,16
Oeste	28.909	9,16
Pampulha	24.123	7,64
TOTAL	315.824	100,00%

Fonte: SVCZoonoses/Distritos sanitários SMSA/PBH, 2005.

3.2 - DEFINIÇÃO DA AMOSTRA

O cálculo da amostra foi realizado com auxílio do programa computacional EpiInfo version 6.0, considerando nível de confiança de 95%, prevalência estimada de 4% e erro esperado de 2% (Thrusfield, 1995), o que resultou em amostra de 369 cães.

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 avaliação da prevalência de outras doenças, foi estabelecida uma amostra de 453 cães.

Para se obter uma amostra proporcional de cada distrito sanitário, foi utilizado como base o censo canino do ano de 2005 por regional realizado pelo Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte (Tab. 2). Para cada cão amostrado, foi preenchido um questionário contendo informações que pudessem ser usados numa análise estatística posterior (Anexo 1). Os cães selecionados foram aqueles apresentados aos postos de vacinação na campanha de combate à raiva urbana organizada pelo CCZ-BH, durante o mês de setembro do ano de 2005.

Tabela 2 - Número de cães submetidos a venopunção para composição da amostra a ser analisada, distribuídos por regionais da Prefeitura de Belo Horizonte, 2005.

Regionais	População canina	Amostra	Porcentagem da população
Barreiro	42.334	67	0,16
Venda Nova	41.184	63	0,15
Noroeste	40.614	47	0,12
Leste	40.405	67	0,17
Nordeste	38.307	60	0,16
Centro Sul	31.027	42	0,14
Norte	28.921	32	0,11
Oeste	28.909	38	0,13
Pampulha	24.123	37	0,15
TOTAL	315.824	453	0,14

A amostra foi formada por cães apresentados aos postos de vacinação na campanha de combate à raiva urbana organizada pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ-BH), no mês de novembro do ano de 2005. Para proceder a coleta sanguínea em cada regional administrativa, foi formada uma equipe de coleta composta por 03 estudantes dos cursos de Medicina Veterinária da UNIPAC/Conselheiro Lafaiete e da UFMG. Além das equipes de coletas que percorreram as respectivas regionais administrativas, mais duas equipes de apoio foram formadas para fazer o trabalho de logística.

Os cães foram submetidos a venopunção para coleta de aproximadamente 5 mL de sangue que foi transferido para um tubo de ensaio e mantido em repouso por aproximadamente 60 minutos para se obter o soro. Após centrifugação, o soro foi transferido para um ependorf já etiquetado e conservado em freezer com temperatura a -20°C para posterior análise. Para este trabalho, as amostras foram levadas para o Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Universidade de São Paulo para realização da pesquisa de anticorpos anti-*Rickettsia* spp através da técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI).

3.3 – REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA – RIFI (ANEXO 2)

Os 453 soros foram testados pela RIFI frente aos antígenos brutos de *Rickettsia rickettsii* (cepa Taiacu), *Rickettsia parkeri* (cepa At24), *Rickettsia felis* (cepa Pedreira), *Rickettsia amblyommii* (cepa Ac37) e *Rickettsia bellii* (cepa Mogi), gentilmente cedidos pelo Professor Dr. Marcelo Bahia Labruna. Essas cepas foram isoladas de carrapatos do Brasil, conforme trabalhos de Horta et al. 2005, Labruna et al. 2004b e Pinter e Labruna 2006. Para obtenção dos antígenos foram utilizados cultivos de células Vero (ou células C6/36 para *Rickettsia felis*) que foram infectadas com *Rickettsia* spp. Quando as células atingiram 100% de infecção, os antígenos foram

concentrados e fixados em lâminas de vidro contendo 12 pocinhos (Horta et al., 2004) e armazenadas em freezer com temperatura de -80°C até o momento de uso.

Para realização da RIFI, procedeu-se o protocolo apresentado no anexo 2, modificado por Horta et al. (2004), descrito a seguir:

- Retirada das lâminas sensibilizadas com antígeno do freezer a -80°C;
- As lâminas foram colocadas em cubas e adicionado PBS (pH 7,4) durante 10 minutos;
- Retirou-se as lâminas da cuba e deixou-as secar sobre papel toalha, até ficarem completamente secas;
- Depois de serem homogeneizadas no vórtex as amostras a serem testadas (soros) foram diluídas em placa de Elisa (cada soro foi inicialmente testado na diluição 1:64 - diluição de triagem).
- Foi aplicado 15µl dos soros teste em cada pocinho das lâminas para RIFI. E também soros controle positivo e negativo;
- As lâminas foram colocadas em câmara úmida e encubadas em estufa a 37°C por 30 minutos;
- Após o tempo de incubação as lâminas foram lavadas com tampão de lavagem, usando pipeta de Pasteur como auxiliar para não jogarmos o tampão diretamente sobre as amostras;
- As lâminas foram colocadas em cubas com o tampão de lavagem por 15 minutos; em seguida foram transferidas para outra cuba com o mesmo tampão e aguardados mais 15 minutos;
- Retirou-se as lâminas da cuba e deixou-as secar em temperatura ambiente sobre papel toalha;
- IgG anti-cão (Sigma Diagnostics, St. Luis, Mo) conjugada com isotiocianato de fluoresceína foi diluída (1:400) em tubo descartável recoberto com papel alumínio (para proteção contra a luz);

- As lâminas foram acondicionadas em câmara úmida e 15 µl da IgG anti-cão diluída, foi aplicada sobre cada amostra a ser testada;
- As lâminas foram incubadas em estufa a 37°C por 30 minutos ao abrigo da luz;
- As lâminas foram retiradas da estufa e lavadas com tampão de lavagem (conforme descrito anteriormente) e colocadas em cubas durante 15 minutos com tampão de lavagem mais oito gotas de uma solução de azul de Evans a 0,2%, cobertas durante todo o tempo com papel alumínio;
- As lâminas foram transferidas para outra cuba com tampão de lavagem e azul de Evans, cobertas com papel alumínio e aguardados mais 15 minutos;
- As lâminas foram secas em temperatura ambiente (sempre protegidas da luz);
- As lâminas foram cobertas com glicerina tamponada sob lamínula.

- A leitura foi feita em microscópio para imunofluorescência.

Os soros reativos na diluição 1:64 para qualquer espécie de *Rickettsia* foram testados em diluições seriadas (64, 128, 256, 512, 1024, 2048...) para determinação do título final de reatividade. O soro que demonstrou uma determinada espécie de *Rickettsia* com título quatro vezes maior que para as demais espécies testadas, foi considerado homólogo para a primeira espécie de *Rickettsia*, conforme padrões previamente definidos (Horta et al., 2004, Labruna et al., no prelo).

4 – RESULTADOS

4.1 – PREVALÊNCIA GERAL PARA *Rickettsia* spp ENCONTRADA NOS CÃES

Dos 453 soros testados, três reagiram positivamente (título \geq 64) para *Rickettsia* spp. Desta forma, diante da amostragem do presente trabalho, a prevalência de títulos de anticorpos anti-*Rickettsia* spp em cães da cidade de Belo Horizonte foi de 0,66% (Tab. 3).

Tabela 3 - Distribuição de cães positivos à RIFI para *Rickettsia* spp de acordo com a regional administrativa da Prefeitura de Belo Horizonte, 2005.

Regionais	Amostra	Número de positivos	Porcentagem da população
Barreiro	67	1	1,49
Venda Nova	63	2	3,17
Noroeste	47	0	0
Leste	67	0	0
Nordeste	60	0	0
Centro Sul	42	0	0
Norte	32	0	0
Oeste	38	0	0
Pampulha	37	0	0
TOTAL	453	3	0,66

Em função da baixa prevalência de cães soropositivos encontrada, não foram realizadas análises estatísticas para determinação dos fatores de risco associados à ocorrência da doença. E também dos resultados encontrados na sorologia e os dados obtidos pelo questionário descrito no Anexo 1.

4.2 - ANÁLISE DESCRITIVA DOS ANIMAIS CONSIDERADOS POSITIVOS À REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA - RIFI

O cão identificado como BAR 19, domiciliado na Regional Barreiro, era um macho, SRD, com idade aproximada de 10 anos e de pelagem curta (< 3 cm). Segundo o proprietário, o cão tinha acesso diário à rua, embora passasse a maior parte do tempo no quintal da residência onde coexistiam roedores e gatos. Esporadicamente ele recebia tratamentos parasiticidas (vermífugo e/ou repelentes).

Para o animal identificado como BAR 19, foi possível determinar que este cão esteve infectado por *Rickettsia rickettsii* ou por uma espécie muito próxima desta, uma vez que o título de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii* (1024) foi pelo menos quatro vezes maior que aquele demonstrado frente as outras espécies de *Rickettsia* (256 para *Rickettsia parkeri* e 128 para *Rickettsia Amblyommii*, sendo considerado negativo para *Rickettsia felis* e para *Rickettsia bellii*) (Tab. 4).

O cão identificado como VN 09, domiciliado na Regional Venda Nova, era um macho, da raça Pinscher, com idade aproximada de três anos e de pelagem curta (< 3cm). Segundo o proprietário, o cão permanecia a maior parte do tempo no quintal, onde coexistiam roedores e esporadicamente o animal tinha acesso à rua, recebendo anualmente tratamentos parasiticidas (vermífugo e/ou repelentes).

O cão identificado como VN 12, domiciliado na Regional Venda Nova, era um macho, SRD, com idade aproximada de quatro meses e de pelagem curta (<3cm); e de acordo com o proprietário, o animal permanecia a maior parte do tempo no quintal, onde co-habitavam outros cães e roedores. E que o mesmo não tinha acesso à rua. Esporadicamente ele recebia tratamento anti-parasitário (vermífugo e/ou repelentes).

Para os animais identificados como VN 09 e VN 12, não foi possível determinar a espécie de *Rickettsia* responsável pela infecção, uma vez que ambos apresentaram diferenças de títulos menor que quatro vezes para *Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia parkeri*. De qualquer forma, pode-se afirmar que os cães identificados como VN 09 e VN 12 se infectaram por uma riquetsia do grupo da febre maculosa (GFM) (Tab. 4).

Tabela 4 – Títulos apresentados a RIFI para antígenos brutos de *Rickettsia* spp em soros caninos de diferentes regionais administrativas da Prefeitura de Belo Horizonte, 2005.

Soro canino	Títulos apresentados a RIFI de diferentes antígenos riquetisiais					PAIHR*
	<i>Rickettsia rickettsii</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	<i>Rickettsia amblyommii</i>	<i>Rickettsia felis</i>	<i>Rickettsia bellii</i>	
BAR 19	1024	256	128	NR**	NR**	<i>R. rickettsii</i>
VN 09	128	64	NR**	NR**	NR**	
VN 12	256	128	NR**	NR**	NR**	

*PAIHR: antígeno possivelmente envolvido em reação homóloga (soro mostrando título quatro vezes maior para uma espécie de *Rickettsia* que para uma outra espécie, foi considerado homólogo para a primeira espécie de *Rickettsia*).

**NR: soro não reagente a um título ≥ 64 .

5 – DISCUSSÃO

A maioria dos estudos sorológicos sobre prevalência de anticorpos anti-*Rickettsia* spp em humanos e hospedeiros amplificadores têm se concentrado em áreas endêmicas, onde a ocorrência de casos fatais se manifesta constantemente, portanto, a bibliografia existente sobre a Febre Maculosa Brasileira refere-se a essas áreas (Sangioni, 2003).

Galvão et al. (2002) encontrou 4,11% (3/73) dos animais positivos.

Galvão (1996) estudou o comportamento da Febre Maculosa Brasileira no município de Caratinga, e por meio de inquérito sorológico registrou uma soro-prevalência de 2% em humanos, 25% em cães e 53% em eqüinos, utilizando a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) realizada com antígeno específico de *Rickettsia rickettsii* (Cardoso, 2006).

Cardoso et al. (2004) objetivando avaliar o nível de transmissão de riquetsioses na população animal do domicílio e peridomicílio do município de Caratinga (MG), avaliaram através da técnica de imunofluorescência indireta (RIFI) 73 amostras de sangue de cães e 18 de eqüinos. O título 64 foi utilizado como ponto de corte na discriminação de amostras positivas e, dos 73 soros caninos nenhum apresentou-se positivo. Dos 18 soros eqüinos analisados três (16%) mostraram-se positivos nos títulos 64 (n = 1) e 128 (n = 2) (Cardoso, 2006).

Rozental et al. (2004) em estudo no município de Barra do Piraí (RJ), evidenciaram alta prevalência de cães positivos (25%) pelo teste de Imunofluorescência indireta (RIFI), com títulos de 128 a 4096, na localidade de Ipiabas. Em uma segunda fase encontrou-se em soros caninos títulos de até 512 pelo teste de Imunofluorescência Indireta. Foi realizado teste de hemolinfa em carrapatos coletados nesta localidade e um exemplar de *Amblyomma cajennense*, três de

Amblyomma sp. e seis de *Rhipicephalus sanguineus* apresentaram microorganismos semelhantes a *Rickettsia* spp. Cinco carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* foram positivos pela reação de imunofluorescência direta para *Rickettsia* do grupo da febre maculosa.

Horta et al. (2006) em pesquisa de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii*, anti-*Rickettsia parkeri*, anti-*Rickettsia felis* e anti-*Rickettsia bellii* através da reação de imunofluorescência indireta no soro de 94 gambás, 55 cães, 25 gatos, 85 eqüinos e 238 humanos dos municípios de Mogi das Cruzes, Pedreira, Piracicaba e São Paulo encontraram como reagentes para pelo menos um dos antígenos (título \geq 64) 64 gambás (68,1%), 33 cães (60%), 21 gatos (84%), 62 eqüinos (72,9%) e 34 humanos (14,3%).

Horta et al. (2004) encontraram 31,25% (5/16) dos animais positivos.

Pinter et al. (2006) pesquisando anticorpos em 35 humanos e 25 cães residentes em área endêmica, distrito de Taiaçupeba (SP), através da reação de imunofluorescência indireta contra os antígenos das bactérias *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia bellii*, *Rickettsia felis* e *Rickettsia parkeri* encontrou 16 cães reagentes com títulos maiores ou iguais a 64 para o antígeno de *Rickettsia rickettsii*, entre estes positivos, 14 (56%) também reagiram para *Rickettsia parkeri*, 6 (24%) para *Rickettsia felis* e 3 (12%) para *Rickettsia bellii*. A variação no título de anticorpos foi de 64 a 8192 para *Rickettsia rickettsii*, 64 a 2048 para *Rickettsia parkeri*, 64 a 1024 para *Rickettsia felis* e 256 a 1024 para *Rickettsia bellii*. Para os humanos, um indivíduo (2,8%) foi positivo para *Rickettsia rickettsii* (título de 256), sendo que ele havia sofrido da doença cinco anos antes deste estudo.

Oliveira (2006) encontrou prevalência de 15% (2/15) em caninos.

Souza et al. (2006) pesquisando a prevalência de anticorpos contra *Rickettsia*

rickettsii em área considerada endêmica da região de Campinas (SP), no município de Monte Alegre do Sul, identificaram com predominância de imaturos *Amblyomma* spp. e adultos de *Amblyomma cajenense* em todas as espécies animais. *Rhipicephalus sanguineus* estavam presentes em cães, *Amblyomma dubitatum* em capivaras e *Ixodes loricatus* em gambás. Foram considerados reagentes animais com títulos de anticorpos ≥ 64 . As prevalências encontradas foram de 36% para cães, 37,5% para eqüinos, 50% para gambás e 57% para capivaras.

Pinto et al. (2004) verificando a prevalência pontual e avaliação de risco das espécies envolvidas na transmissão e manutenção dos bioagentes no município de Pedreira, região de Campinas (SP), encontrou uma prevalência pontual de 50% e valores para risco atribuível a exposição (RA) de 50,05% para eqüinos e 23,46% para caninos. O risco atribuível populacional (RAP) para eqüinos foi de 0,99 e caninos 0,98. O risco relativo encontrado para eqüino foi de 2,85 e para caninos de 2,81, sugerindo que estes animais também seriam reservatórios, favorecendo a circulação de riquetsias na região.

Oliveira et al (2006) estudando a epidemiologia da FMB em uma área considerada endêmica (Petrópolis/RJ) utilizando a imunofluorescência indireta e considerado positivos humanos ou animais com título ≥ 64 encontraram uma prevalência de 28% (22/78) para humanos, 18% (2/11) para eqüinos, 15% (2/15) em caninos e 2% (1/48) em bovinos.

Embora a febre maculosa seja de caráter endêmico, diferentes níveis de infectividade em seres humanos e animais podem ocorrer em área não endêmica. No Brasil, poucas pesquisas sorológicas foram realizadas em áreas não endêmicas (Sangioni, 2003).

A prevalência encontrada no presente trabalho foi de 0,66% (3/453) de anticorpos anti-*Rickettsia* spp em cães da cidade de Belo Horizonte, área considerada não endêmica para Febre Maculosa Brasileira (Tab. 3). Os resultados sorológicos

encontrados corroboram com a literatura: Horta et al. (2005) não encontrou nenhum (0/5) soro reagente em áreas rurais; Labruna et al. (prelo) encontraram uma prevalência em área rural de 3,9% (6/153) e em área urbana 11,6% (19/64) em cães; esses autores conduziram seus trabalhos em áreas consideradas não endêmicas, adotaram a RIFI como teste sorológico e o ponto de corte, os soros reagentes à uma diluição $\geq 1/64$.

Diante da baixa prevalência encontrada e considerando a existência de um único caso de Febre Maculosa notificado na cidade de Belo Horizonte nos últimos 05 anos; caso autóctone ocorrido na Regional Barreiro (comunicação verbal pela Dra. Simone Calic); e também pela impossibilidade de localização dos animais positivos, sugere-se que possivelmente os cães reagentes tenham sido introduzidos a partir de localidades endêmicas para Febre Maculosa. Este fato associado a não notificação de casos na área estudada gera uma tranquilidade para as autoridades de saúde e também para equipes médicas. No entanto, diante de possíveis riscos de introdução de riquetsias patogênicas na região metropolitana de Belo Horizonte, seja via migração de animais riquetsêmicos ou animais contendo carrapatos infectados, é importante novos trabalhos de soroinvestigação para manter a vigilância epidemiológica da doença.

Desta forma, os dados do presente trabalho (0,66% de prevalência de infecção canina por *Rickettsia* spp) indicam que os riscos de ocorrência de febre maculosa no Município de Belo Horizonte eram mínimos, pelo menos no momento em que as amostras de soro foram obtidas dos cães.

6 - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos confirmam a condição da cidade de Belo Horizonte como não endêmica para Febre Maculosa Brasileira, com baixa prevalência de anticorpos anti-*Rickettsia* spp em cães, pelo menos no momento em que este estudo foi realizado.

A presença de *Rickettsia rickettsii* em um cão da Regional Barreiro sugere a circulação de *Rickettsias* patogênicas neste local, devendo ser melhor estudada.

Apesar da baixa prevalência encontrada, a circulação de *Rickettsia* spp na Regional Venda Nova, onde não houve notificações, deve ser um alerta para as autoridades sanitárias.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGERAMI, R.N.; RESENDE, M.R.; FELTRIN, A.F. et al. Brazilian spotted fever: a case series from na endemic area in southeastern Brazil: epidemiological aspects. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.1078, p.170-2, 2006.
- BREITSCHWERDT, E.B.; LEVY, M.G.; DAVIDSON, M.G. et al. Kinetics of IgM and IgG responses to experimental and naturally acquired *Rickettsia rickettsii* infection in dogs. **Am. J. Vet. Res.**, v.51, n.8, 1990.
- BREITSCHWERDT, E.B.; WALKER, D.H.; LEVY, M.G. et al. Clinical, hematologic, and humoral immune response in female dogs inoculated with *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia montana*. **Am. J. Vet. Res.**, v.49, n.1, 1988.
- BURGDORFER, W.; SEXTON, D.J.; GERLOFF, R.K. 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.
- BURGDORFER, W. Ecological and epidemiological considerations of Rocky Mountain spotted fever and scrubs typhus. **Biology of Rickettsial Diseases**, v.1, p.33-50, 1988.
- BUSTAMANTE, M.E.; VARELA, G. Distribucion de las rickettsias en Mexico. **Inst. Salub. y Enf. Trop.**, v.8, p.3-14, 1947.
- CARDOSO, L.D.; FREITAS, R.N.; MAFRA, C.L. et al. Caracterização de *Rickettsia* spp circulante em foco silencioso de febre maculosa brasileira no município de Caratinga, Minas Gerais, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v.22, n.3, p.495-01, 2006.
- CARDOSO, L.D.; GALVÃO, M.A.M.; FREITAS, R.N. et al. Detecção e caracterização de *Rickettsia* spp circulante em foco inativo peri-urbano através da reação em cadeia da polimerase (PCR). **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.13, supl.1, p.358, 2004.
- CARDOSO, L.D.; GALVÃO, M.A.M.; MAFRA, C.L. et al. Pesquisa de infecção por *Rickettsia* spp grupo da Febre Maculosa Brasileira na população animal do domicílio e peri-domicílio do bairro da Cadeia, município de Caratinga, Minas Gerais. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.13, supl.1, p.358, 2004.
- CONTI-DIAZ, I.A.; RUBIO, I.; SOMA MOREIRA, R.E. et al. Rickettsiosis cutaneo ganglionar por *Rickettsia conorii* en el Uruguay. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v.32, p.313-8, 1990.
- CONTI-DIAZ, I.A. Rickettsiosis por *Rickettsia conorii* (fiebre botonosa del Mediterráneo o fiebre de Marsella). Estado actual en Uruguay. **Rev. Med. Uruguay**, v.17, p.119-24, 2001.
- DEMMA, L.J.; TRAEGER, M.S.; NICHOLSON, C.D. et al. Rocky Mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. **N. Engl. J. Med.**, v.353, p.587-94, 2005.

- DEMMA, L.J.; EREMEEVA, M.; NICHOLSON, W.L. et al. An Outbreak of Rocky Mountain Spotted Fever associated with a novel tick vector, *Rhipicephalus sanguineus*, in Arizona, **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.1078, p.342-3, 2006.
- DIAS, E.; MARTINS A.V. Spotted fever in Brazil: a summary. **Am. J. Trop. Med.** v.19, p.103-8, 1939.
- GALVÃO, M.A.M. *Febre maculosa em Minas Gerais: um estudo sobre a distribuição da doença no estado e seu comportamento em foco peri-urbano.*, 1996. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Minas Gerais.
- GALVÃO, M.A.M.; BOUYER, D.H.; OLANO, J.P. et al. *Rickettsia felis* in *Amblyomma cajennense* ticks, Brazil. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON RICKETTSIAE AND RICKETTSIAL DISEASES, 2002, Ljubljana, ANAIS... Ljubljana:2002a. p.103.
- GALVÃO, M.A.M.; LAMOUNIER, J.A.; BONOMO, E. et al. Rickettsioses emergentes e reemergentes numa região endêmica do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v.18, n. 6, p. 1593-97, 2002b.
- GALVÃO, M.A.M.; MAFRA, C.; CHAMONE, C.B. et al. Clinical and laboratorial evidence of *Rickettsia felis* infections in Latin America. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.37, p.238-40, 2004.
- GUEDES, E.; LEITE, R.C.; PRATA, M.C.A. et al. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.100, p.841-45. 2005.
- HORTA, M.C.; CHIEBAO, D.P.; LABRUNA, M.B. et al. Infecção por *Rickettsia* spp em animais e humanos em área endêmicas e não endêmicas para Febre Maculosa no estado de São Paulo. In: XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA E II SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 2006b, Ribeirão Preto-SP. ANAIS... Ribeirão Preto:2006b, pág.365.
- HORTA, M.C. *Estudo epidemiológico de Rickettsia felis em áreas endêmicas e não endêmicas para febre maculosa no Estado de São Paulo.* 2006a. 106p. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo.
- HORTA, M.C.; LABRUNA, M.B.; DURIGON, E.D. et al. Isolation of *Rickettsia felis* in the mosquito Cell Line C6/36. **Applied and Environmental Microbiol.**, v.72, n.2, p.1705-7, 2006c.
- HORTA, M.C.; LABRUNA, M.A.; SANGIONI, L.A. 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 rickettsii* and another spotted fever group Rickettsia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.71, p.93-7, 2004a.
- HORTA, M.C.; PINTER, A.; SCHUMAKER, T.T.S. Natural infection, transovarial transmission, and transstadial survival of *Rickettsia bellii* in the tick *Ixodes loricatus* (Acari: Ixodidae) from Brazil. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.1078, p.285-90, 2006.
- HORTA, M.C.; PINTER, A.; SOUZA, C.E. et al. *Rickettsia* infection in opossums (*Didelphis* spp) in São Paulo State, Brazil. In: 4TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON RICKETTSIAE AND RICKETTSIAL DISEASES, 2005, Logroño, ANAIS... Logroño, 2005, p.166.

INMET – Instituto Nacional de Meteorologia. 2001. Disponível em <http://www.inmet.gov.br/html/agro.html>. acesso em: 20 de julho de 2001.

LA SCOLA, B.; RAOULT, D. Laboratory diagnosis of Rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new Rickettsial diseases. **J. Clin. Microbiol.**, v.35, p.2715-27, 1997.

LA SCOLA, B.S.; MECONI, S.; FENOLLAR, F. et al. Emended description of *Rickettsia felis* (Boyer et al., 2001), a temperature-dependent cultured bacterium. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.52, p.2035-41, 2002.

LABRUNA, M.B. Carta acarológica. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.13, supl.1, p.199-202, 2004a.

LABRUNA, M.B. Cultivo celular de Riquetsias no Brasil. In: XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA E II SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSE, 2006b, Ribeirão Preto-SP. ANAIS... Ribeirão Preto:2006, pág.132-3.

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. Biologia-ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.13, supl.1, 123-4, 2004b.

LABRUNA, M.B.; HORTA, M.; AGUIAR, D. et al. Prevalence of Rickettsia infection in dogs from the urban and rural areas of Monte Negro municipality, western Amazon, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Dis.** (prelo).

LABRUNA, M.B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M.C. et al. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the State of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. **J. Clin. Microbiol.**, v.42, p.90-8, 2004a.

LABRUNA, M.B.; WHITWORTH, T.; BOUYER, D.H. et al. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the state of Rondonia, Western Amazon, Brazil. **J. Med. Entomol.**, v.41, p.1073-81, 2004b.

LEMOS, E.R.S.; MACHADO, R.D.; COURA, J.R. et al. Epidemiological aspects of the Brazilian Spotted Fever: seasonal activity of ticks collected in an endemic area in São Paulo, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.30, n.3, 1997.

LISSMAN, B.A.; BENACH, J.L. Rocky Mountain Spotted Fever in dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.176, n.15, 1980.

MAFRA, C.L.; ALMADA, G.L.; ZAGO, A.M. et al. Capivara como agente dispersor da Febre Maculosa (?). Considerações em um surto na cidade de Nova Venécia, estado do Espírito Santo, Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.13, supl.1, p.360, 2004.

MAGNARELLI, L.A.; ANDERSON, J.F.; PHILIP, R.N. et al. Endemicity of spotted fever group rickettsiae in Connecticut. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.30, p.239-52, 1981.

MELLES, H.H.B.; COLOMBO, S.; LEMOS, E.R.S. Isolation of *Rickettsia* in vero cell culture. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 32, n. 5, 1999.

NORMENT, B.R.; BURGDORFER, W. Susceptibility and reservoir potential of the dog to spotted fever group rickettsiae. **Am. J. Vet. Res.**, v.45, p.1706-10, 1984.

OLIVEIRA, K.A.; OLIVEIRA, L.S.; ALMEIDA, M.R. et al. Investigação molecular de organismos da ordem Rickettsiales em ectoparasitos de animais de área endêmica para a Febre Maculosa Brasileira In: XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA E II SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 2006, Ribeirão Preto-SP. ANAIS... Ribeirão Preto:2006, pág.371.

- OLIVEIRA, S.S.; DE KNEGT, L.V.; WILDEBERGER, E.C. et al. Rickettsiose do grupo da Febre Maculosa Brasileira: resultado de estudos epidemiológicos durante um surto no município de Petrópolis, estado do Rio de Janeiro, 2005. In: XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA E II SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 2006, Ribeirão Preto-SP. ANAIS... Ribeirão Preto:2006, pág.372.
- PADDOCK, C.D.; SUMMER, J.W.; COMER, J.A. et al. *Rickettsia parkeri*: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. **Clin. Infect. Dis.**, v.38, p.805-11, 2004.
- PAROLA, P.; PADDOCK, C.D.; RAOULT, D. Tick-born rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. **Clin. Microbiol. Rev.** v.18, p.719-56, 2005.
- PATINO-CAMARGO, L. Nuevas observaciones sobre un tercer foco de fiebre petequial (maculosa) en el hemisferio americano. **Bol. De la Ofic. Sanit. Panamericana.** v.20, p.1112-24, 1941.
- PINTER, A.; DIAS, R.A.; GENNARI, S.M. et al. Study of the seasonal dynamics, life cycle, and host specificity of *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae). **J. Med. Entomol.**, v.41, p.324-32, 2004.
- PINTER, A.; LABRUNA, M.B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.1078, p.523-9, 2006.
- PINTER, A.; HORTA, M.C.; PACHECO, R.C. et al. Pesquisa de anticorpos anti-*Rickettsia* spp em humanos e cães em uma área endêmica para Febre Maculosa Brasileira no município de Mogi das Cruzes/SP In: XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA E II SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 2006, Ribeirão Preto-SP. ANAIS... Ribeirão Preto:2006, pág.368.
- PINTO, C.; AMORIM, M.; GAZÊTA, G.S. et al. Avaliação de risco e prevalência de vetores do agente da Febre Maculosa Brasileira na região metropolitana de Campinas, São Paulo, Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.13, supl.1, p.363, 2004.
- PIRANDA, E.M.; PINTER, A.; PACHECO, R.C. et al. Avaliação preliminar do cão doméstico como fonte de infecção por *Rickettsia rickettsii* para carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* LATRIELLE, 1806 (Acari: Ixodidae). In: XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA E II SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 2006, Ribeirão Preto-SP. ANAIS... Ribeirão Preto:2006, pág.366.
- PLANK, S.J. TEIXEIRA, R.S.; MILANESI, M.L. Febre maculosa em Salvador: descrição de um caso. **Rev. Med. Bahia.** v.25, p.330-4, 1979.
- RODANICHE, E.C. Natural infection of the tick *Amblyomma cajennense* with *Rickettsia rickettsii* in Panama. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.2, p.696-9, 1953.
- ROZENTAL, T.; BRITO, L.G.; OLIVEIRA, R.C. et al. Febre Maculosa Brasileira no município de Barra do Pirai/RJ. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.13, supl.1, p.362, 2004.
- SANGIONI, L.A. *Pesquisa de infecção por riquetsias do grupo da febre maculosa em humanos, cães, eqüídeos e em adultos de Amblyomma cajennense, em região endêmica e não endêmica do estado de São Paulo.* 2003. 86p. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.
- SANGIONI, L.A.; HORTA, M.C.; VIANA, M.C.B. et al. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. **Emerg. Infect. Dis.**, v.11, p.265-70, 2005.

- SCHUMAKER, T.T.S. Epidemiologia molecular das riquetsioses no Brasil. In: XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA E II SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 2006, Ribeirão Preto-SP. ANAIS... Ribeirão Preto:2006, pág.94-5.
- SILVA, L.J. Riquetsioses no Brasil. In: XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA E II SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 2006, Ribeirão Preto-SP. ANAIS ... Ribeirão Preto:2006, pág.106-8.
- SILVA, L.J.; GALVÃO, M.A.M. Epidemiologia das rickettsioses do gênero *Rickettsia* no Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.13, supl.1, p.197-8, 2004.
- SILVEIRA, I.; PACHECO, R.C.; SZABÓ, M.P.J. et al. Isolamento de *Rickettsia parkeri* em cultura de células Vero a partir do carrapato *Amblyomma triste*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 2005, Porto Alegre, ANAIS... Porto Alegre:2005.
- SOUZA, C.E.; RODRIGUES NETO, E.J.; SOUZA, S.S.A.L. et al. Detecção de anticorpos anti-*Rickettsia* do grupo da Febre Maculosa Brasileira de animais domésticos e silvestres em Monte Alegre do Sul(SP). In: XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA E II SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 2006, Ribeirão Preto-SP. ANAIS... Ribeirão Preto:2006, pág.363.
- SOUZA, E.R.; GAZETA, G.S.; NASCIMENTO, E.M.M. et al. Riquetsias em ectoparasitos capturados em localidades com casos humanos fatais de febre maculosa - Petrópolis/RJ – 2005. In: XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA E II SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 2006, Ribeirão Preto-SP. ANAIS... Ribeirão Preto:2006, pág.366.
- STANLEY F.H.; BURGDORFER, W. Ultrastructure of *Rickettsia rhipicephali*, a new member of the Spotted Fever Group *Rickettsiae* in tissues of the host vector *Rhipicephalus sanguineus*. **J. Bacteriol.**, v.137, n.1, p.605-13, 1979.
- THRUSFIELD, M. Veterinary epidemiology. 2. ed. Blackwell, Oxford , 483p., 1995.
- TRAVASSOS, J.; VALLEJO, A. Comportamento de alguns cavídeos (*Cavia aperea* e *Hydrochoerus capybara*) às inoculações experimentais do vírus da febre maculosa. Possibilidade desses cavídeos representarem o papel de depositários transitórios do vírus na natureza. **Mem. Inst. Butantan.** v.15, p.73-86, 1942.
- VENZAL, J.M.; PORTILLO, A.; ESTRADA-PEÑA, A. et al. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma triste* from Uruguay. **Emerg. Infect. Dis.**, v.10, p.1493-5, 2004.
- YU, X.J.; WALKER, D.H. The Order Rickettsiales. In: M Dworkin, the Prokaryotes: na evolving electronic resource for the microbiology community, 2003, New York, Springer-Verlag, 3 ed., 2003.
- YU, W.; RAOULT, D. Taxonomic relationships among Spotted Fever Group *Rickettsiae* as revealed by antigenic analysis with monoclonal antibodies. **J. of Clin. Microbiol.**, v.36, n.4, p.887-96, 1998.
- WALKER H.D. *Rickettsia rickettsii*: as virulent as ever. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.66, n.5, p.448-449, 2002.
- WARNER, R.D.; MARSH, W.W. Rocky Mountain spotted fever, **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.15, 2002.
- WEISS, E.; MOULDER, J.W. The *Rickettsias* and *Chlamydias*. In: N.R. Kreig & J.G.Holt, 1984, Baltimore, Bergey's **Manual of Systematic Bacteriology**, v.1, 1984.

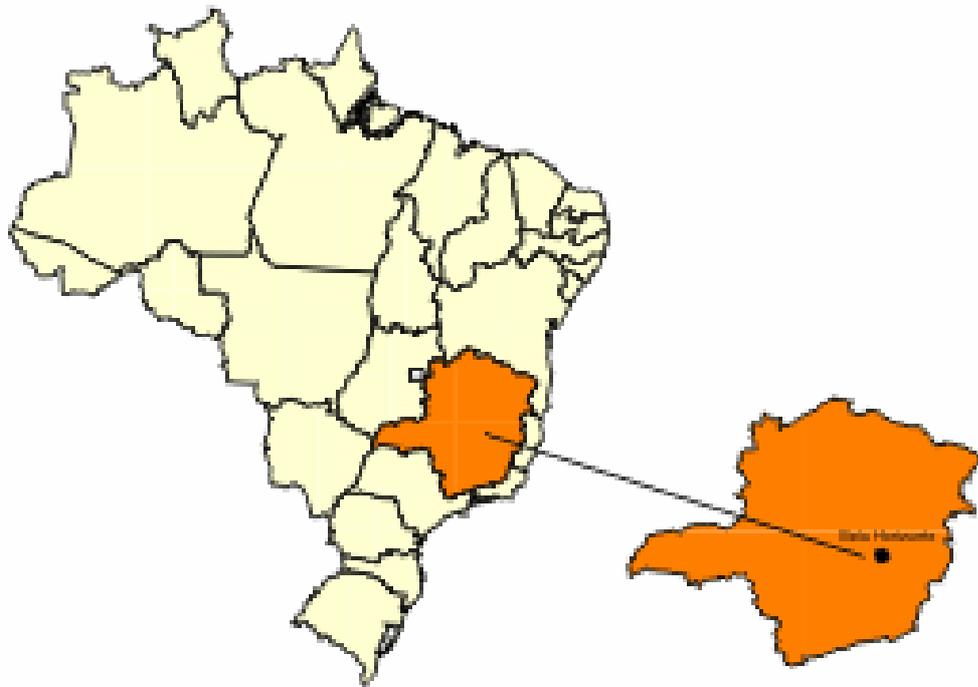


Figura 1 Localização do município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.



Figura 2 - Regionais administrativas de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Regiões Administrativas

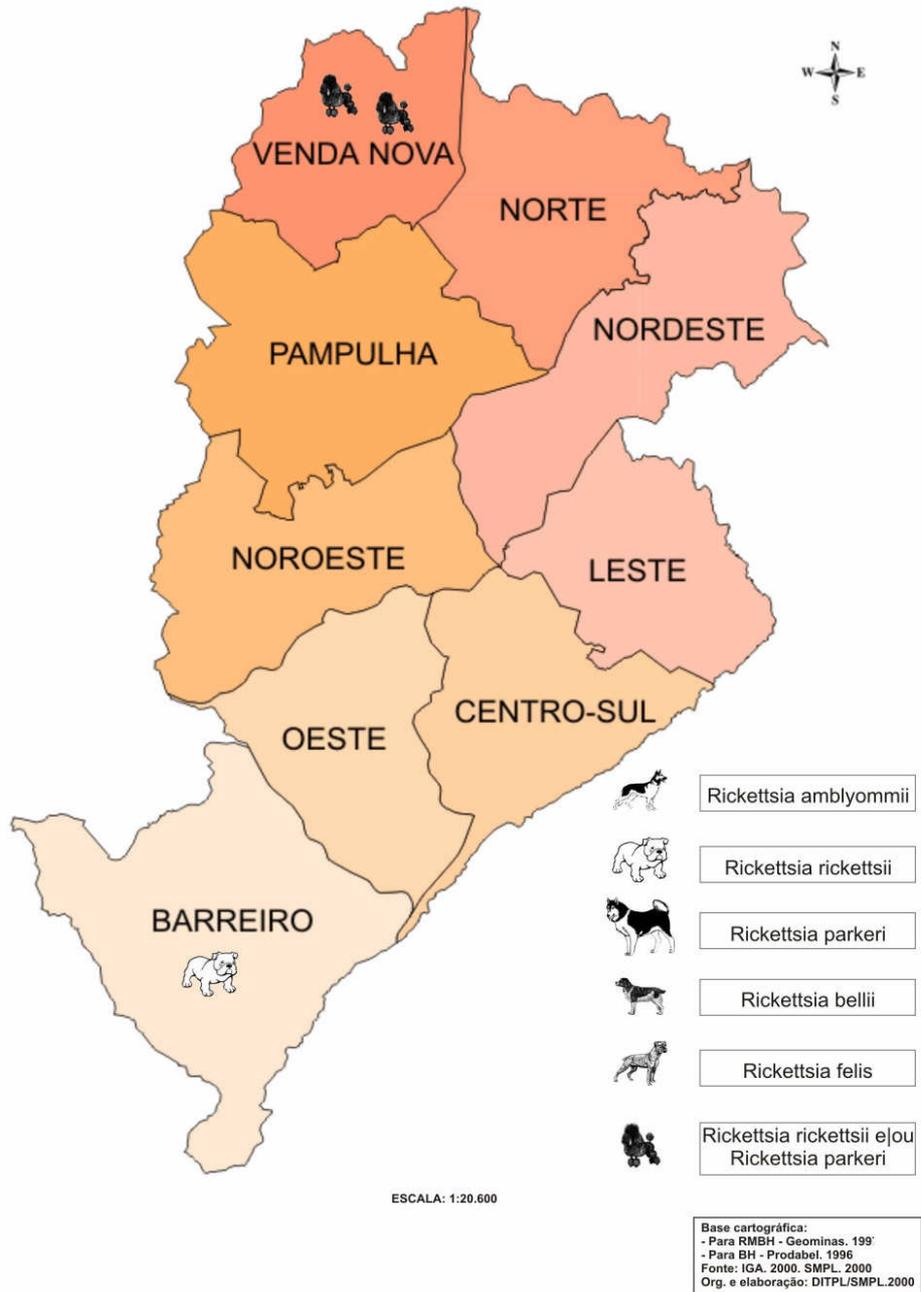


Figura 3 - Distribuição dos cães positivos à RIFI para *Rickettsia* spp nas regionais administrativas de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

8 - ANEXOS

ANEXO 01

Questionário

Data: / /2005.

Introdução

Este questionário pretende conhecer alguns aspectos das condições de criação de cães da cidade de Belo Horizonte e região metropolitana. Os dados obtidos serão usados em trabalhos científicos na Universidade Federal de Minas Gerais e na Universidade de São Paulo e suas respostas, em hipótese alguma, serão identificadas. Estamos apenas solicitando sua colaboração no sentido de responder com sinceridade e precisão as questões abaixo relacionadas:

Identificação do proprietário

1. Nome:.....Telefone.....
2. Endereço: Rua.....Bairro:.....Cidade:.....
3. Tipo de residência: Casa Apartamento Outros:.....

Identificação do animal

4. Nome:.....
5. Raça:.....
6. Sexo: Macho Fêmea
7. Idade:.....

Hábitos sanitários

8. O cão apresenta ou apresentou doenças reprodutivas? Não Sim
9. O cão apresenta ou apresentou manifestações neurológicas? Não Sim
10. Qual a periodicidade de vermifugação?
 Semestralmente Anualmente Esporádica

Hábitos alimentares

11. Qual tipo de alimentação o cão recebe diariamente?
 Somente ração comercial Somente comida caseira Alimentação mista
 Outras
12. O cão ingere subprodutos animais? Não Sim
13. Se positivo, são ingeridos? Crus Processados / Cozidos

Habitat

14. O cão tem contato com a mãe? Não Sim
15. O animal tem acesso à rua? Não Sim
16. Se positivo, com qual frequência? Diário Semanal Esporádico
17. O cão tem contato com espécies silvestres (em fazendas, sítios, etc.)? Não Sim
18. Se positivo, quais animais?.....
19. Onde o cão passa a maior parte do tempo? Rua Quintal Interior da residência
20. O cão tem contato com roedores? Não Sim
21. O cão tem contato com gatos? Não Sim
22. Possui outros animais em casa? Não Sim
23. Se positivo, quais? Cães Gatos Aves Outros

Entrevistador:

Comentários:

ANEXO 02

Reação de Imunofluorescência Indireta - RIFI

Princípio do teste

Este ensaio consiste na reação de soros ou plasmas com células Vero infectadas pela *Rickettsia spp.*, fixada em lâminas de microscopia para fluorescência. Aproximadamente 90-100% das células possuem formas coco-bacilares da riquetsia capazes de serem visualizadas numa reação positiva. Coco-bacilos extracelulares também são comumente visualizados. A reação entre o antígeno fixado e o anticorpo presente nas amostras é visualizada após a adição de anti-imunoglobulina canina (Ig) conjugada com isotiocianato de fluoresceína. Para a leitura da reação deve-se utilizar microscópio para fluorescência.

Material fornecido

1. Lâminas para RIFI contendo células Vero infectadas por *Rickettsia spp.*;
2. Soro controle positivo;
3. Soro controle negativo;
4. Anti-Ig canina conjugada com isotiocianato de fluoresceína;
5. Glicerina tamponada pH 9,0 (\pm 0,5);
6. Azul de Evans 0,2%.

Material necessário, mas não fornecido.

1. Tampão fosfato/salina (PBS) pH 7,4;
2. Tampão de lavagem (PBS com Triton X 100 a 0,1%);
3. Microplacas do tipo Elisa (96 pocinhos);
4. Micropipetas devidamente calibrada e com manutenção em dia (P20, P200 e P1000);
5. Ponteiras sem filtro, de 20, 200 e 1000 μ l;
6. Recipiente com tampa para câmara úmida;
7. Cubas para lavagem de lâminas (tipo Koplín);
8. Luvas de látex descartáveis;
9. Hipoclorito de sódio;
10. Recipiente para descarte de material contaminado;
11. Lâminulas 24 x 50 mm;
12. Papel alumínio;
13. Vidrarias em geral;
14. Estufa a 37°C;
15. Microscópio para fluorescência.

Conservação e estocagem do material fornecido

1. Lâminas para RIFI contendo células Vero infectadas por *Rickettsia spp.* (manter em freezer a - 80°C);
2. Soro controle positivo (manter em freezer a - 20°C);
3. Soro controle negativo (manter em freezer a - 20°C).
4. Anti-Ig canina conjugada com fluoresceína (manter em geladeira, entre 2 e 8°C);
5. Glicerina tamponada pH 9,0 \pm 0,5 (manter em geladeira, entre 2 e 8°C);
6. Azul de Evans 0,2% (manter em geladeira, entre 2 e 8°C);

Cuidados e precauções

1. Somente para uso diagnóstico "in vitro";
2. Ao manusear qualquer um dos reagentes desse conjunto, deve-se observar as precauções de biossegurança necessárias;
3. A qualidade dos resultados obtidos com este conjunto diagnóstico depende do cumprimento às boas práticas de trabalho e segurança do laboratório:
 - As amostras, assim como as lâminas e outros insumos devem ser estocados e manipulados adequadamente;
 - Homogeneizar as amostras e controles antes de usar;
 - Usar luvas descartáveis durante toda as etapas do teste;
 - Desprezar ponteiras, luvas, pipetas de vidro, frascos, lâminas usadas, etc., em solução de hipoclorito de sódio diluído a 1:20 ou água sanitária a 1:10;

- Nunca misturar componentes de lotes diferentes;
- Todos os frascos utilizados para diluir os componentes devem ter sido muito bem limpos, secos e desengordurados.

Preparo do tampão fosfato pH 7,4 (PBS)

Sais	Quantidade
Cloreto de sódio (NaCl) PA 0,15 M	8,77 g
Fosfato de Sódio Dibásico Anidro (Na ₂ HPO ₄) PA – 0,0072 M	1,02 g
Fosfato de Sódio Monobásico Anidro (NaH ₂ PO ₄) PA – 0,0028 M	0,34 g
Água destilada qsp (Quantidade suficiente para)	1.000 ml

Titulação do conjugado

Testes executados previamente com o mesmo lote de conjugado que está incluído neste kit demonstraram que a titulação ótima é de 1:400.

Procedimentos para execução do ensaio

Teste qualitativo (determina se a amostra é reativa ou não reativa, na titulação de 1:64).

1. Para o protocolo de trabalho, pode ser avaliado até 10 amostras de soro ou plasma por lâmina;
2. Retire da refrigeração as lâminas necessárias para testar as amostras, deixando-as imersas em PBS por 10 minutos à temperatura ambiente, deixando-as secar a temperatura ambiente em seguida. Os controles positivo e negativo, e os demais reagentes deverão estar à temperatura ambiente para sua utilização;
3. Dilua as amostras a serem testados e os soros controles positivos e negativos a 1:64 em PBS. Para realizar esta diluição utilize 2,5 µl de soro ou plasma e adicione 157,5 µl de PBS. Homogeneize suavemente evitando a formação de bolhas;
4. Adicione 20µl das diluições das amostras e soros controle positivo e controle negativo em cada poço das lâminas;
5. Incube as lâminas em câmara úmida por 30 minutos em estufa à 37°C;
6. Lave as lâminas com tampão de lavagem (usar piseta ou pipeta de Pasteur como auxiliar);
7. Deixá-las em cuba com tampão de lavagem durante 15 minutos;
8. Transferir as lâminas para outra cuba, também com tampão de lavagem e aguardar mais 15 minutos;
9. Deixe as lâminas secarem a temperatura ambiente;
10. Dilua o conjugado anti-Ig canina-fluoresceína, na proporção adequada obtida com a prévia titulação do conjugado, em PBS;
11. Adicione 20 µl da diluição do conjugado em todos os poços das lâminas;
12. Incube as lâminas em câmara úmida por 30 minutos em estufa a 37°C, ao abrigo de qualquer fonte de luz;
13. Lave as lâminas com tampão de lavagem (usar piseta ou pipeta de Pasteur como auxiliar);
14. Prepare uma solução com azul de Evans na proporção de 0,3 ml para cada 100 ml de tampão de lavagem; em cuba apropriada deixa as lâminas durante 15 minutos, cobertas com papel alumínio para proteger de qualquer fonte de luz;
15. Repita o passo anterior por mais 15 minutos;
16. Deixe as lâminas secarem a temperatura ambiente, sempre ao abrigo da luz;
17. Adicione de 4 a 5 gotas de glicerina tamponada sobre cada lâmina, cobrindo-a com lamínula, evitando a formação de bolhas. Mantenha-as sob abrigo da luz e a seco, até o momento da leitura.

Leitura

Para a leitura e interpretação das reações utilize o microscópio de imunofluorescência e objetiva de 40X.

1. Focalize a lâmina na posição do soro controle positivo e observe a fluorescência presente em cerca de 90-100% das células;

2. Focalize a lâmina na posição do soro controle negativo e observe a ausência de fluorescência nas células, bem como a coloração de fundo (“background”);
3. Proceda à leitura das amostras, considerando os padrões:

NÃO REAGENTE – ausência de fluorescência intracelular compatível com o formato padrão de riquetsias (formas coco-bacilares);

REAGENTE – presença de fluorescência intracelular compatível com o formato padrão de riquetsias (formas coco-bacilares) no interior da grande maioria das células, e no espaço extracelular também.

Teste quantitativo (realizado apenas para as amostras reativas no teste qualitativo)

1. Para esta parte do trabalho, considere uma lâmina para cada 2 amostras de soro ou plasma que se mostraram reativas a diluição de 1:64 no teste qualitativo;
2. Faça a diluição como no teste qualitativo; as diluições subseqüentes (1:128, 1:256, 1:512, 1:1024) devem ser feitas em microplacas adicionando-se quantidades iguais de PBS e diluição anterior.
3. Considere a amostra como reativa até a última diluição em que estruturas morfológicamente compatíveis com riquetsias (formas coco-bacilares) estejam sendo visualizadas no interior da grande maioria das células. Esta última diluição corresponderá ao título de anticorpos anti-*Rickettsia spp.* da amostra. Caso uma amostra de soro ou plasma se mostre reativa até a diluição de 1:1024, deve-se continuar os testes de diluição desta amostra numa nova lâmina;

Considerações

A RIFI é um grande instrumento de diagnóstico da febre maculosa, porque permite o diagnóstico através da visualização da reatividade nas formas coco-bacilares da bactéria. Desta forma, para uma leitura adequada, deve-se sempre ter em mente o padrão morfológico de uma riquetsia (tamanho e forma), que deve ser buscado principalmente no interior de células. No entanto, lâminas feitas com 100% de células infectadas também apresentam muitas riquetsias no espaço extracelular, em função da ruptura de células durante o processo de confecção das lâminas. Para um diagnóstico definitivo da febre maculosa, através da RIFI, deve-se testar amostras pareadas (duas amostras de soro ou plasma colhidas do mesmo paciente, intervaladas de 2 a 3 semanas, sendo a primeira na fase aguda da doença, e a segunda na fase de convalescença). Por esta razão, deve-se determinar os títulos de anticorpos reativos para cada amostra, pois o diagnóstico é considerado positivo somente quando o título da segunda amostra for, no mínimo, 4 vezes superior ao título da primeira amostra.