

Identificação e pesquisa de *Rickettsia* spp. em carrapatos colhidos em cães e equinos de Quirinópolis, Goiás, Brasil

Márcio Eduardo Pereira Martins¹; Wília Marta Elsner Diederichsen de Brito²; Marcelo Bahia Labruna³; Jonas Moraes Filho³

RESUMO

Objetivando verificar a presença de carrapatos vetores em um suposto foco de febre maculosa em Quirinópolis, Goiás, Brasil, colheu-se carrapatos em 14 propriedades rurais e em cães da área urbana da cidade. Os carrapatos foram colhidos por todo corpo dos animais, identificados e submetidos ao PCR para detecção da presença de DNA de *Rickettsia* sp. Das propriedades rurais foram colhidos 675 exemplares de carrapatos (seis larvas, 79 ninfas e 587 adultos) parasitando equinos no meio rural de Quirinópolis, entre fevereiro e março de 2007. Os carrapatos adultos foram caracterizados como de três espécies: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (55 fêmeas e 17 machos), *Dermacentor nitens* (274 fêmeas e 235 machos) e *Amblyomma cajennense* (cinco fêmeas e um macho). Este último foi observado em uma (7,1%) propriedade. Observou-se 1% de *A. cajennense* em relação ao total de carrapatos adultos, considerando 292 equinos. Os 89 carrapatos adultos (17 machos e 72 fêmeas) colhidos em 24 cães errantes urbanos foram caracterizados como pertencentes à espécie *Rhipicephalus sanguineus*, igualmente aos 20 carrapatos adultos (4 machos e 16 fêmeas) colhidos em dois cães na residência de um suspeito caso de FM ocorrido em Quirinópolis. A presença de DNA riquetsial não foi observada ao PCR em nenhum dos carrapatos colhidos. O principal vetor de FM foi identificado na região alvo do estudo. Sugere-se que futuros estudos devem abranger também ectoparasitos de vida livre, maior número de amostras, melhor distribuição das amostras no território de Goiás e que abranja também o ambiente silvestre, a fim de se constatar a real ausência de vetores infectados com *Rickettsia* sp.

Palavras-chave: *Amblyomma*, febre maculosa, PCR, DNA riquetsial, vetor

Identification and search *Rickettsia* spp. in ticks collected in dogs and horses from Quirinópolis, Goiás, Brazil

ABSTRACT

The objective of this study was to verify of the Brazilian spotted fever (BSF) tick-borne occurrence infected by *Rickettsia* sp. in Quirinópolis City, Goiás State, Brazil. Ticks harvested in 14 farms and urban dogs. In March, year 2007, the ticks had been harvested by all body of the animals, identified and submitted to the PCR for detention of the presence of *Rickettsia* sp. DNA. In the farms had been harvested 675 ticks (six larvae, 79 nymphs and 587 adults), fixed in equine. three different species of ticks had been found: *Rhipicephalus B. microplus* (55 females and 17 males), *Dermacentor nitens* (274 females and 235 males) and *A. cajennense* (cinco females and one male). This last one was observed in one (7.1%) property. The *A. cajennense* it was observed in 1% of the adult ticks total, considering 292 equines. The 89 adult ticks (17 males and 72 females), harvested in 24 free life urban dogs, had been of the *R. sanguineus* species, equally to the 20 adult ticks (4 males and 16 females) harvested in two dogs in the residence of one suspected BSF case occurred in Quirinópolis. The presence of rickettsial DNA was not observed to the PCR in none tick. The main BSF tick-borne was identified in the studied region. In the future new studies must also to consider free life ticks, more representative number of samples in ampler areas and with better distributed in Goiás, objectifying to evidence the real absence of arthropods vectors infected with *Rickettsia* species in this State.

Keywords: *Amblyomma*, BSF tick-borne, PCR, rickettsial DNA, vector

Autor para correspondência: Márcio Eduardo Pereira Martins

Rodovia Geraldo Silva Nascimento, km 2,5, s/n, Zona

Rural, Urutaí, GO, Brasil.

E-mail: marcioeduvet@gmail.com

Recebido em: 10 mar. 2015

Aceito em: 25 mar. 2015

¹Instituto Federal Goiano – Câmpus Urutaí, GO, Brasil

²Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil

³Universidade de São Paulo, SP, Brasil

INTRODUÇÃO

Em fevereiro de 2006, uma criança (NFSC) de três anos de idade foi levada ao Hospital Municipal de Quirinópolis-GO, apresentando sinais de febre, com temperatura de 38°C e uma mancha rósea no pescoço. A criança foi encaminhada a um hospital público infantil em Goiânia-GO, onde ficou hospitalizada por 53 dias. Exames laboratoriais complementares foram solicitados e duas amostras de sangue, com intervalo de 15 dias, foram colhidas e enviadas à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) de acordo com o protocolo oficial do Ministério da Saúde (MS). O exame confirmou que a criança teve contato com agentes do grupo da febre maculosa (GFM), sendo o diagnóstico médico de febre maculosa (FM). Após tratamento com antibióticos específicos a criança evoluiu para a cura. Este foi o primeiro caso suspeito de FM registrado no município e no Estado de Goiás (Oliveira 2006).

A percepção da importância das doenças causadas por riquétsias em saúde pública vem crescendo em todo mundo, pois estão associadas a vetores artrópodes (carrapatos, pulgas, piolhos e ácaros) com ampla distribuição mundial, de fácil disseminação, sendo mantidas na natureza por hospedeiros que atuam como amplificadores do microrganismo, todavia, ainda ocorrendo de forma endêmica (OPAS 2004).

As espécies de *Rickettsia* mantêm ciclos silvestres e enzoóticos na natureza e muitas são agentes de zoonoses transmitidas especialmente por carrapatos. Dessas, as “febres maculosas” são as de maior impacto e incidência mundial, principalmente a “febre maculosa das montanhas rochosas” (FMMR) de distribuição em vastas áreas de países das Américas (CDC 2006, Sucen 2009).

A riquetsiose mais importante nas Américas, conhecida no Brasil como “febre maculosa Brasileira” (FMB), é a causada pela *Rickettsia rickettsii* (CDC, 2006; Sucen 2009). Mas as espécies *R. parkeri*, *R. africae*, *R. akari* e *R. felis*, também têm sido relatadas como causadoras de FM em humanos dessa região. Várias outras espécies de *Rickettsia* têm sido descritas em carrapatos nas Américas, porém sem qualquer associação com casos de FM em humanos (Díaz 2001, OPAS 2004).

Nos Estados Unidos, até o ano de 2005, existiam oficialmente duas espécies de carrapatos incriminadas na transmissão da *R. rickettsii*: o *Dermacentor variabilis* e o *Dermacentor andersoni* (CDC, 2006). Recentemente o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* foi considerado um dos vetores de FMMR nos Estados Unidos (Demma et al. 2005), já na Europa é o principal vetor da febre maculosa do Mediterrâneo, causada pela *R. conorii* (Sousa et al. 2003).

No Brasil, os carrapatos vetores pertencem ao gênero *Amblyomma*: *A. cajennense*, carrapato estrela ou do cavalo e o *A. aureolatum*, presente em canídeos silvestres e no cão doméstico de regiões onde esse carrapato se faz presente (Pinter et al. 2005; Labruna 2009). O *A. cajennense* é o principal vetor (Dias & Martins 1939). Seus três estádios evolutivos, larva, ninfa e adulto, podem transmitir a bactéria (Comer 1991). Estudos realizados na Região Sudeste do Brasil vêm revelando cada vez mais espécies de carrapatos infectados por *Rickettsia* spp. patogênicas: *A. cajennense* (Sangioni 2003, Guedes et. al. 2005), *A. triste* (Silveira 2006), *A. aureolatum* (Pinter & Labruna 2006), *R. sanguineus* (Oliveira et al. 2008; Moraes-Filho et al. 2009), dentre outros.

A *R. rickettsii* pode ser encontrada em capivaras, gambás, coelhos, equinos, cães, aves e outros, e muitas destes podem atuar como hospedeiros, ora apresentando infecção aguda ou como portadores permanentemente infectados ou inaparentes (Galvão 1999). As capivaras, hospedeiros dos carrapatos *A. cajennense* e *A. dubitatum* (Sucen 2004), são consideradas um potencial reservatório de *R. rickettsii* (Travassos & Vallejo 1942ab, Burgdorfer et al. 1962, Souza et al. 2009). O cão doméstico, principal hospedeiro do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, pode atuar como amplificador de *R. rickettsii*. (Burgdorfer 1988). Equinos são considerados excelentes animais sentinelas para a FM (Sangioni et al. 2005)

Segundo dados obtidos no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net - do DATASUS do Ministério da Saúde, nos últimos sete anos, período entre 2007 a 2013, foram confirmados 807 casos de FM no Brasil, sendo 71% na Região Sudeste, com 399 casos registrados em São Paulo, seguido da Região Sul com 26% dos casos confirmados do país (Brasil 2014).

Aparentemente a doença tem se disseminado para Estados antes considerados indenes para FM, como é a situação dos Estados da Região Nordeste (seis casos – dois na Bahia, três no Ceará e um na Paraíba), Norte (sete casos, sendo um em Rondônia e seis no Tocantins) e Centro-Oeste, que até o presente momento tem ocorrência de FM limitada a sete casos, sendo três casos registrados no DF (um por ano em 2005, 2006 e 2011), dois casos no Mato Grosso (um em 2009 e outro em 2010), dois casos no Mato Grosso do Sul (2010), e outros dois casos de FM mais recentes confirmados em Goiás no ano de 2012 (Brasil 2014).

Em 2009 uma Tese de doutorado defendida em Goiás apontou que provavelmente estaria ocorrendo ausência de diagnóstico de FM no Estado, já que foi constatada a presença de anticorpos anti-*Rickettsia* spp no soro sanguíneo de

humanos, cães e equinos no Município de Quirinópolis, região limítrofe com o Estado de Minas Gerais (Martins 2009). De acordo com a fonte, embora até 2009 Goiás fosse considerado indene para a FM, seria bem provável a circulação destes agentes no Estado, devido a constatação de consideráveis títulos de anticorpos, frente a cinco espécies de *Rickettsia*, entre elas a *R. rickettsii*, encontrados em soro sanguíneo de humanos, cães e equinos de Quirinópolis-GO. As previsões do autor foram confirmadas em 2012 quando da confirmação de dois casos de FM já registrados no Ministério da Saúde.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido amplamente utilizada em estudos epidemiológicos ou de surtos de riquetsioses para detecção de *Rickettsia* sp em carrapatos. Os oligonucleotídeos iniciadores mais utilizados são dirigidos para genes específicos de gênero, citrato sintase (*gltA*), gene da proteína de 17-kDa (*htra*) e específicos do GFM, genes das proteínas externas *ompA* e *ompB* (Sangioni 2003, Labruna et al. 2004, Guedes et al 2005, Labruna et al. 2005, Sangioni et al., 2005).

O objetivo deste estudo foi identificar carrapatos colhidos na região de um suspeito foco de FM em Quirinópolis, Goiás, e submetê-los ao PCR para detecção de *Rickettsia* sp.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

O estudo foi realizado em duas etapas de amostragem: a primeira ocorreu entre fevereiro e março de 2007 e a segunda um ano após, ambas no Município de Quirinópolis-GO, onde aconteceu no Estado de Goiás o primeiro caso humano notificado ao MS como suspeito de FM.

As amostras foram obtidas considerando-se o perímetro urbano e o meio rural. Foram escolhidas propriedades rurais com criação de equinos, situadas em várias direções em raio crescente de 100 Km. A colheita nos animais foi realizada por Médico Veterinário auxiliado por um técnico da Agência Goiana de Defesa Agropecuária. Aplicou-se questionário epidemiológico elaborado com base em Trhusfield (2004).

Caracterização da região.

O município de Quirinópolis-GO, com população estimada em 2007 de 38.064 habitantes, sendo 33.746 habitantes urbanos e 4.318 habitantes rurais (SEPIN 2009), se localiza dentro do Bioma Cerrado, clima tropical, altitude média de 542 metros, área de 3.780 km², latitude 18°26'52"S e longitude 50°27'07"W, a 290km da capital Goiânia, no sudoeste do Estado de Goiás. Em Goiás, Quirinópolis faz divisa ao sul com o município de

Paranaiguara, ao sudoeste com Cachoeira Alta, ao norte com Rio Verde, Castelândia e Bom Jesus de Goiás e ao leste com Gouvelândia e, também, com a região Sudeste do Brasil, pela divisa com o Estado de Minas Gerais (SEPIN 2009).

A hidrografia em Quirinópolis é constituída, principalmente, pelos rios: Rio dos Bois, São Francisco, Fortaleza, Inhumas, Rio das Pedras, Rio Preto, Rio Alegre e o Rio Paranaíba, cuja coleção de águas compõe o Lago Dourado formado pela Barragem São Simão, que divide os Estados de Goiás e Minas Gerais.

A atividade econômica da região é essencialmente agropecuária. Em Quirinópolis, no campo da agricultura a atividade predominante é a produção de grãos e cana-de-açúcar. Na pecuária, o município conta com rebanho de cerca de 367.000 bovinos, 11.000 suínos, 6.000 equinos e 508.000 aves (SEPIN 2009).

Anamnese

Dados obtidos com os responsáveis pela criança-NFSC, caso suspeito, destacam que o pai era vaqueiro em três fazendas de Quirinópolis e em sua residência havia dois cães infestados por carrapatos. A mãe da criança relatou que a mesma sempre "pegava" carrapatos. O pai da criança, trabalhador rural em três propriedades rurais de Quirinópolis, Goiás, relatou já ter chegado em sua residência trazendo consigo alguns exemplares de carrapatos na roupa. Além disso, declarou que NFSC esteve nas propriedades rurais onde trabalha, tendo contato direto com equinos de montaria.

Colheita e identificação de carrapatos.

Na primeira etapa de amostragem (fev e mar/2007) foram visitadas 23 propriedades rurais. Na mesma época também foram colhidos carrapatos em cães domiciliares urbanos oriundos do suspeito foco de FM.

Na segunda etapa de amostragem (mar/2008) foi possível colher carrapatos em equinos pertencentes a uma propriedade rural, onde a presença de capivaras foi relatada ser mais constante do que nas demais. Adicionalmente, colheram-se carrapatos em cães errantes provenientes da área urbana de Quirinópolis, animais capturados ou abandonados mantidos em canil de uma ONG da cidade.

Os ectoparasitos foram colhidos por todo o corpo dos animais com o auxílio de uma pinça e conservados em álcool isopropílico PA, conforme Sucen (2004), até o momento de sua identificação e análise.

Os carrapatos foram identificados de acordo com Battesti et al. (2006) no Centro de Parasitologia da Escola de Veterinária da

Universidade Federal de Goiás. Após a identificação, os carrapatos permaneceram em álcool isopropílico PA até o momento da extração do DNA, segundo orientações contidas no “Manual de Vigilância Acarológica” (Sucen 2004).

Extração do DNA de *Rickettsia* sp. dos carrapatos

Para realizar a extração do DNA, os carrapatos foram retirados do álcool e submetidos à secagem ao ambiente durante 24 horas para total evaporação do álcool. Em seguida, os carrapatos foram cortados em sentido longitudinal, preservando-se uma das metades em freezer a -80°C e a outra foi submetida a extração de DNA.

Seguiu-se protocolo de extração de DNA descrito por Chomczynski (1993). Cada carrapato foi triturado em um tubo cônico de 1,5 mL, com auxílio de um micropistilo. Ao macerado, foram adicionados 150 µL de TE (10 mM Tris HCl; 1 mM de EDTA, pH 8) e 450 µL de isotiocianato de guanidina, seguindo-se homogeneização por 10 minutos à 56°C, com homogeneização a cada 2 min. Foi acrescentado 100 µL de clorofórmio e submeteu-se a mistura à centrifugação (12.000 g, 5 minutos). Adicionou-se 400 µL de pronanol à fase aquosa, seguindo-se um descanso de 2 horas (-20 °C). Após centrifugação (12.000 g, 5 minutos) foi adicionado 800 µL de etanol 70% ao sedimento seguindo-se uma nova centrifugação (12.000 g, 5 minutos). Após desprezar o sobrenadante, secou-se o sedimento em temperatura ambiente, e ele foi ressuspenso em 30 µL de TE, em banho-maria (56 °C, 15 minutos). O material extraído foi armazenado em freezer à -20°C até o momento do uso.

Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).

O PCR em carrapatos foi realizado sob a forma de *pools* contendo o material extraído de três carrapatos adultos. Uma alíquota do DNA extraído dos carrapatos foi usada como molde para amplificação dos fragmentos. A ocorrência de *Rickettsia* sp. nas amostras de DNA extraídos dos carrapatos foi avaliada por meio da amplificação de um fragmento de 401 pb do gene cintrato sintase (*gltA*), presente em todas as espécies de *Rickettsia*. Foi utilizado um par de oligonucleotídeos iniciadores denominados CS-78 (*forward*), de extensão de bases GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT, e CS-323 (*reverse*) de extensão de bases GCTTCCTAAAATTCAATAAATCAGGAT (LABRUNA et al., 2004). O volume utilizado para a reação de PCR foi de 25 µL por tubo de amostra, sendo 22,5 µL de mix e 2,5 µL da amostra de DNA extraído dos carrapatos. O mix da reação foi preparado com 12,6 µL de água miliQ; 4 µL de DNTP; 2,5 µL de buffer; 0,75 µL de MgCl₂; 1,25 µL de *primer forward*; 1,25 µL de *primer reverse*; 0,15 µL de Taq

DNApolimerase. A amplificação foi realizada em 3 min / 95°C para desnaturação inicial, 40 ciclos de 95°C / 15 seg, 48°C / 30 seg e 72°C – 30 seg, 7 min / 72°C para extensão final.

Análise dos produtos da amplificação

Para a confirmação de DNA amplificado 10 µL do produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2% (Sigma), em cuba horizontal com tampão de corrida TBE 0,5X (0,045 Tris-borato e 0,001 M EDTA, pH 8,0), sob voltagem de 100 volts por aproximadamente uma hora, e depois corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) por 15 min. A visualização das bandas foi realizada em transiluminador ultravioleta (Sambrook et al. 1989). Como controle negativo foi utilizada água milliQ e como controle positivo amostras de DNA extraído de carrapatos *A. cajennense* experimentalmente infectados com *R. parkeri* como descrito em Sangioni et al. (2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em 100% das propriedades rurais houve relato da presença de capivaras e, em algumas delas, durante a visita, as capivaras foram vistas transitando por locais onde os equinos eram manejados. As capivaras, hospedeiros primários de todos os estádios parasitários do *A. cajennense* e *A. dubitatum* (SUCEN, 2004), são consideradas um potencial reservatório de *R. rickettsii* (Travassos & Vallejo 1942ab, Souza et al. 2009).

Foi possível colher carrapatos em 14 das 23 propriedades rurais visitadas. Em duas das três propriedades onde NFSC esteve antes do surgimento de sinais compatíveis com FM, não foram constatadas espécies de *Amblyomma* e em uma houve tratamento carrapaticida nos equinos previamente ao presente estudo e, portanto, não foram encontrados carrapatos. Foram colhidos um total de 675 exemplares de carrapatos parasitando equinos no meio rural de Quirinópolis em 2007 sendo nove larvas, 79 ninfas e 587 adultos (Tabela 1). Os adultos caracterizados de acordo com BATTESTI et al. (2006) eram de três diferentes espécies: *R. (Boophilus) microplus* (55 fêmeas e 17 machos), *Dermacentor nitens* (274 fêmeas e 235 machos) e *A. cajennense* (cinco fêmeas e um macho). Este último somente foi observado em uma (7,1%) das 14 propriedades amostradas. A presença de DNA riquetsial não foi identificada em nenhum dos 675 carrapatos pela técnica da PCR.

A frequência do *A. cajennense* foi somente de 1,0%, em relação ao total de carrapatos adultos colhidos, considerando os 292 equinos nos quais os ectoparasitas foram colhidos. Num estudo sobre Ixodídeos na microrregião de Goiânia-GO, em 1993, Borges & Silva (1994) constataram frequência

de 3,9% do *A. cajennense* em 77 equinos. Dos sete exemplares de carrapatos colhidos na única propriedade onde o *A. cajennense* foi identificado, seis eram adultos desta espécie, o que é condizente com seu ciclo de vida de uma geração ao ano em que o estágio adulto é mais frequente e predomina nos meses quentes e chuvosos, de outubro a março, na Região Sudeste do Brasil (Sucen 2004). A respeito

do baixo número de exemplares do carrapato *A. cajennense* encontrados no presente estudo, futuros estudos talvez possam considerar períodos mais longos, podendo abranger o ciclo anual integral do *A. cajennense*, considerando sua sazonalidade local no Bioma Cerrado.

Tabela 1. Carrapatos colhidos em equinos parasitados, no período de fevereiro e março de 2007, em propriedades rurais de Quirinópolis, Goiás.

Fazenda (km ²)	CARRAPATOS									
	Total por estágio			Total por Espécie/sexo/propriedade						
	Larva	ninfa	adulto	<i>R.B.microplus</i>		<i>D. nitens</i>		<i>A. cajennense</i>		Total
			F	M	F	M	F	M		
01(08)**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
02(25)**	3	1	9	6	2	0	1	0	0	13
03(15)	2	17	24	3	0	14	7	0	0	43
04(50)**	0	5	67	0	0	49	18	0	0	72
05 (12)	0	3	25	0	0	20	5	0	0	28
06 (45)	1	0	6	0	0	0	0	5	1	7
07 (30)	0	1	7	5	2	0	0	0	0	8
08 (36)	2	0	13	9	4	0	0	0	0	15
09 (38)	0	3	106	0	0	61	45	0	0	109
10 (50)	0	1	23	7	2	8	6	0	0	24
11 (28)	0	6	47	0	0	24	23	0	0	53
12 (20)	0	6	13	0	0	5	8	0	0	19
13 (50)	0	11	154	0	0	65	89	0	0	165
14 (30)	1	22	59	0	0	28	31	0	0	82
15 (70)	0	3	34	25	7	0	2	0	0	37
Total	9	79	587	55	17	274	235	5	1	675

Legenda: *R.B.microplus* = *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*;

D. nitens = *Dermacentor nitens*; Km² = distância da área urbana até a propriedade rural;

** propriedades rurais onde NFSC esteve antes do quadro enfermo suspeito de FM.

No Brasil, o parasitismo por carrapatos *R. (Boophilus) microplus* em seres humanos foi evidenciado cientificamente por Labruna et al. (2005) em Rondônia e por Soares et al. (2007) em São Maria, Rio Grande do Sul. Mas, segundo Pinter et al. (2005), no Brasil, as espécies de carrapato dos gêneros *Rhipicephalus* e *Dermacentor* não teriam importância na epidemiologia da *R. rickettsii*, contudo, mais recentemente Moraes-Filho et al. (2009) demonstraram que essa situação tende a mudar como pode ser verificado mais abaixo.

Os 89 carrapatos adultos (17 machos e 72 fêmeas) colhidos em 24 cães errantes urbanos foram caracterizados como pertencentes à espécie *R. sanguineus*, mas nenhum foi positivo ao PCR para *Rickettsia* spp. Demma et al., (2005) apontaram o carrapato *R. sanguineus* como possível vetor de FM, depois de tê-lo encontrado parasitando um indivíduo que contraiu FM após a picada do carrapato no Estado do Arizona, EUA. A presença de *R. rickettsii*, foi detectada por PCR e isolada em cultura celular tanto no carrapato retirado do

indivíduo quanto em carrapatos *R. sanguineus* colhidos do cão que pertencia a este paciente.

Em Goiânia, Goiás, Louly et al. (2006) relataram pela primeira vez no Brasil, o parasitismo em seres humanos pelo *R. sanguineus*, carrapato comum de cães. Nos achados dos referidos autores, as vítimas do parasitismo relataram que após a remoção do carrapato houve lesão no sítio de fixação do carrapato. Em Minas Gerais, onde a FM é endêmica, Cardoso et al. (2006) utilizando a técnica do PCR identificaram seqüências genômicas com 100% de homologia com *R. felis*. em pulgas do gênero *Ctenocephalides* e em carrapatos *A. cajennense*. Em carrapatos *R. sanguineus* uma seqüência apresentou 99% de homologia com *R. felis* e uma seqüência obtida de *A. cajennense* apresentou 97% de homologia com *R. honei* e *R. rickettsii*. Esse estudo reforça a possibilidade de ocorrência de mais de uma espécie de *Rickettsia* nos casos onde antes a *R. rickettsii* era a única incriminada.

Informações obtidas com a aplicação do questionário epidemiológico revelaram que na

residência de NFSC havia dois cães adultos, SRD, infestados de carrapatos. Os 20 carrapatos adultos colhidos nestes animais, quatro machos e 16 fêmeas, e caracterizados, de acordo com Battesti et al. (2006), como pertencentes a espécie *R. sanguineus*, foram negativos ao PCR para detecção de *Rickettsia* spp. Carrapatos *R. sanguineus*, comum em cães, são apontados como possíveis vetores de riquetsiose no México (CDC, 2006).

Um estudo recente realizado em São Paulo, por Moraes-Filho et al. (2009), constatou *R. sanguineus* infectados com *R. rickettsii* por meio do PCR. Esses autores sugeriram pela primeira vez no Brasil a possibilidade da participação deste carrapato como vetor na epidemiologia da FM, já que nos EUA a participação do *R. sanguineus* como vetor da FMMR foi evidenciada por Demma et al. (2005).

Em nova amostragem realizada em março de 2008 em Quirinópolis, um ano após a primeira, na propriedade rural onde a presença de capivara foi relatada ser mais constante do que nas demais, colheram-se 212 carrapatos adultos (53 machos e 159 fêmeas) em 24 equinos, os quais foram caracterizados como pertencentes à espécie *D. nitens* e foram da mesma forma que na primeira amostragem de 2007, negativos ao PCR para detecção de *Rickettsia* spp.

Independente da espécie, do total de 908 carrapatos adultos colhidos, 64% (581/908) eram fêmeas e destas 99% (575/581) estavam ingurgitadas ou repletas de sangue. Diversos fatores deletérios originam falsos negativos: a ação de DNases, RNases, a inibição da reação pelo íon Fe^{+2} ou pela heparina (Galvão et al. 2005). Logo, o resultado da amplificação de DNA riquetsial pelo PCR envolvendo carrapatos fêmeas no presente estudo pode ter sido comprometido pelo excesso da presença do íon Fe^{+2} e níveis de heparina sanguínea presente nestas amostras.

Obstantes aos resultados de PCR obtidos no presente estudo, diversas espécies de carrapatos provenientes da Região Sudeste do Brasil têm sido alvo de freqüentes estudos que resultam no isolamento ou caracterização de espécies patogênicas de *Rickettsia*: *A. cajennense* infectado com *R. felis* (Sangioni 2003) e com *R. rickettsii* (Guedes et al. 2005), *A. triste* infectado com *R. pakeri* (Silveira 2006), *A. aureolatum* infectado com *R. rickettsii* (Pinter & Labruna 2006), *R. sanguineus* infectado com *R. felis* (Oliveira et al. 2008) e com *R. rickettsii* (Moraes-Filho et al. 2009), e vários outros.

O crescente número de casos e óbitos provocados pela FM confirmados pelo MS na Região Sudeste do Brasil (Brasil 2009a e 2009b), a presença do *A. cajennense*, principal vetor da FM, observada

neste estudo, constantes evidências científicas da presença de vetores da FM infectados com espécies de *Rickettsia* nos Estados limítrofes à Goiás, e os dois casos de FM confirmados pelo Ministério da Saúde no DF, ainda que sem informações de serem ou não autóctones, leva a suspeita de que bactérias do gênero *Rickettsia* possam estar circulando no Estado de Goiás.

Sugere-se que novos estudos, com dimensões maiores, maior quantidade de amostras em área de estudo mais amplas e com melhor distribuição, devem ser realizados em Goiás, abrangendo também ectoparasitos de vida livre, a fim de se constatar a real ausência de artrópodes vetores infectados com espécies de *Rickettsia* neste Estado.

CONCLUSÕES

Apesar de identificados o carrapato *A. cajennense* parasitando equino no meio rural e o *R. sanguineus* em cães urbanos, dois potenciais vetores para a FM, nas condições em que foi realizado o presente estudo não foi detectada ao PCR a presença de DNA riquetsial nos exemplares de carrapatos colhidos em animais, seja de área rural ou urbana, do Município de Quirinópolis, Estado de Goiás.

REFERÊNCIAS

Battesti DMB, Arzua M, Bechara GH. Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: VOX/ICTTD-3/Butantan, 2006, 223p.

Borges LMF, Silva CRF. Ixodídeos parasitos de bovinos e equinos da microrregião de Goiânia, Goiás. Revista de Patologia Tropical, 23(1): 69-74, 1994.

Brasil. Ministério da Saúde. Casos confirmados de Febre maculosa. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1997 a 2008*. Acessado dia 13/03/2009(a). Disponível no site:

http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_cofebre_maculosa.pdf

Brasil. Ministério da Saúde. Óbitos de febre maculosa. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990-2008. Acessado dia 13/03/2009(b). Disponível no site: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/obitos_cofebre_maculosa.pdf

Brasil, 2014. DATASUS/FEBRE MACULOSA - Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SinanNet. Acessado dia 30/03/2014. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinan-net/fmaculosa/bases/febremaculosabrnet.def>

Burgdorfer W, et al. Ecology of rocky mountain spotted fever in Western Montana – I. Isolation of *Rickettsia*

rickettsii from wild mammals. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 76: 293-301, 1962.

Burgdorfer W. Ecological and epidemiological considerations of Rocky Mountain spotted fever and scrub typhus. Biology of Rickettsial Diseases, 1: 33-50, 1988.

Cardoso LD, et al. Caracterização de *Rickettsia* spp. circulante em foco silencioso de febre maculosa brasileira no Município de Caratinga, Minas Gerais, Brasil. Cadernos de Saúde Pública, 22(3): 495-501, 2006.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Diagnosis and Management of Tickborne Rickettsial Diseases. Morbidity and Mortality Weekly Report. CDC, Atlanta, GA. v.55, n.RR-4, 36p, 2006.

Chomczynski PA. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue sample. Biotechniques, 15(3): 532-7, 1993.

Comer MK. Rocky Mountain Spotted Fever. Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice, 21(1): 27-44, 1991.

Dias E, Martins AV. Spotted Fever in Brazil. American Journal of Tropical Medicine, 19: 103-8, 1939.

Díaz IAC. Rickettsiosis por *Rickettsia conorii* (fiebre botonosa del Mediterráneo o fiebre de Marsella), Estado actual en Uruguay. Revista Médica del Uruguay, 17(2): 119-124, 2001.

Demma LJ, et al. Rocky Mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. The New England Journal of Medicine, 353(6): 551-553, 2005.

Galvão MAM. Febre Maculosa. Revista da Pesquisa e Pós-graduação, 1(1): 1-7, 1999.

Galvão MAM, et al. Riquetsioses no Brasil e Portugal: ocorrência, distribuição e diagnóstico. Revista Saúde Pública, 39(5): 850-856, 2005.

Guedes E, 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. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 100: 841-845, 2005.

Labruna MB, et al. Ticks (Acari: Ixodidae) from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. Systematic & Applied Acarology, 10: 17-32, 2005.

Labruna MB. Ecology of *Rickettsia* in South America. Rickettsiology and Rickettsial Diseases-Fifth International Conference: Ann. N.Y. Acad. Sci. New York Academy of Sciences. 11p. 2009. No prelo.

Labruna MB, et al. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from na area in the State of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. Journal of Clinical Microbiology, 42(1): 90-98, 2004.

Louly CCB, et al. Ocorrência de *Rhipicephalus sanguineus* em trabalhadores de clínicas veterinárias e canis, no município de Goiânia, GO. Ciência Animal Brasileira, Goiânia, 7(1): 103-106, 2006.

Martins MEP. Aspectos epidemiológicos da febre maculosa no município de Quirinópolis, Goiás, Brasil. Tese

de Doutorado. Goiânia: Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás. 111p. 2009.

Moraes-Filho J, et al. New Epidemiological Data on Brazilian Spotted Fever in an Endemic Area of the State of São Paulo, Brazil. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 9(1): 73-78, 2009.

Oliveira VAC. Comunicação pessoal - Superintendência de Políticas de Atenção Integral à Saúde, da Secretaria de Estado da Saúde, Goiás, 2006.

Oliveira KA, et al. Molecular identification of *Rickettsia felis* in ticks and fleas from an endemic area for Brazilian Spotted Fever. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 103(2): 191-194, 2008.

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde. Organização Mundial da Saúde. Consulta de especialistas OPAS/OMS sobre rickettsioses nas Américas – Relatório Final. Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil, 18 - 19 de setembro de 2004. Disponível no site: <http://bvs.panaftosa.org.br/textoc/Reuniao-rickett-port-rev.pdf>.

Peacock MG, Ormsbee RA, Johnson KM, Rickettsioses of Central America. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 20: 941–9, 1971.

Pinter A, Horta MC, Labruna MB. Febre Maculosa – Informe Técnico II/Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Acessado dia 19/11/2005. Disponível no site: <http://cohabrp.com.br/SSAUDE/DOENCAS/febremaculosa.pdf>

Pinter A, Labruna MB. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. Annals of the New York Academy of Sciences, 1078: 523-529, 2006.

Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. Clinical Microbiology Reviews, 10(4): 694-719, 1997.

Sambrook J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2.ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Sangioni LA. Pesquisa de infecção por rickettsias do grupo da febre maculosa em humanos, cães e equinos e adultos de *Amblyomma cajennense*, em área endêmica e não-endêmica do Estado de São Paulo. 2003. 86f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Sangioni L, et al. Rickettsial Infection in Animals and Brazilian Spotted Fever Endemicity. Emerging Infectious Disease Journal. 11(2): p.265-270, 2005.

Silveira I. Investigação da infecção pela bactéria *Rickettsia parkeri* em carrapatos *Amblyomma triste* no Estado de São Paulo. 2006. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Soares JF, Sangioni LA, Vogel FSF, Silvai CFB. Parasitismo em ser humano por *B. microplus* (Acari: Ixodidae) em Santa Maria, RS, Brasil. *Ciência Rural*, 37(5): 1495-7, 2007.

Sousa R, Nóbrega SD, Bacellar F, Torgal J. Sobre a realidade da febre escaro-nodular em Portugal. *Acta Médica Portuguesa*, 16: 429-436, 2003.

SUCEN. Superintendência de Controle de Endemias-SP. Manual de Vigilância Acarológica, São Paulo: SUCEN, 2004, 62p.

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. Butantã*, 15: 73-86, 1942a.

Travassos J, Vallejo A. Possibilidade de *Amblyomma cajennense* se infectar em *Hydrochoerus capybara* experimentalmente inoculado com o vírus da febre maculosa. *Mem. Inst. Butantã*, 15: 87-90, 1942b.