

Universidade Federal de Juiz de Fora  
Pós Graduação em Ciências Biológicas  
Mestrado em Comportamento e Biologia Animal

Daniel Leal Navarro

**SOROEPIDEMIOLOGIA E PESQUISA DE RIQUÉTSIAS NO SANGUE DE CÃES E  
EQUINOS COMO INDICADOR DA CIRCULAÇÃO DE RIQUÉTSIAS NA REGIÃO  
DO MÉDIO PARAIBUNA, MINAS GERAIS, BRASIL.**

Juiz de Fora

2014

Daniel Leal Navarro

**SOROEPIDEMIOLOGIA E PESQUISA DE RIQUÉTSIAS NO SANGUE DE CÃES E EQUINOS COMO INDICADOR DA CIRCULAÇÃO DE RIQUÉTSIAS NA REGIÃO DO MÉDIO PARAIBUNA, MINAS GERAIS, BRASIL.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em ciências biológicas (Área de concentração em Comportamento e Biologia Animal)

Orientador: Prof. Gilberto Salles Gazêta

Co-orientador: Prof. Dr. Erik Daemon

Juiz de Fora

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Navarro, Daniel Leal.

Soroepidemiologia e pesquisa de riquetsias no sangue de cães e equinos como indicador da circulação de riquetsias na região do Médio Paraibuna, Minas Gerais, Brasil. / Daniel Leal Navarro. -- 2014.

38 f. : il.

Orientador: Gilberto Salles Gazêta

Coorientador: Erik de Souza Pinto Daemon

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Comportamento Animal, 2014.

1. Rickettsiose. 2. cavalos. 3. cães. 4. anticorpos. 5. epidemiologia. I. Gazêta, Gilberto Salles, orient. II. Daemon, Erik de Souza Pinto, coorient. III. Título.

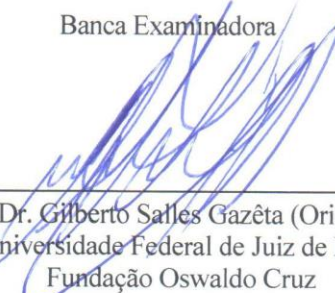
Daniel Leal Navarro

**SOROEPIDEMIOLOGIA E PESQUISA DE RIQUÊTSIAS NO SANGUE DE CÃES E EQUINOS COMO INDICADOR DA CIRCULAÇÃO DE RIQUÊTSIAS NA REGIÃO DO MÉDIO PARAIBUNA, MINAS GERAIS, BRASIL.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em ciências biológicas (Área de concentração em Comportamento e Biologia Animal)


Aprovado em: 24 / 02 / 2014

Banca Examinadora




---

Prof. Dr. Gilberto Salles Gazêta (Orientador)  
Universidade Federal de Juiz de Fora  
Fundação Oswaldo Cruz



---

Dra. Elizângela Guedes  
Universidade Federal de Lavras



---

Dra. Heloisa Helena de Oliveira Morelli Amaral  
Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Rio de Janeiro

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus pela oportunidade de conclusão de mais uma etapa na minha trajetória profissional. E esta conquista, devo compartilhar com pessoas que me ajudaram, nestes dois anos de pesquisa:

- Prof. Dr. Gilberto Salles Gazêta: antes de orientador, amigo. Muito obrigado!
- Prof. Dr. Erik Daemon: pela co-orientação e auxílio em todo o planejamento inicial.

Valeu!

- Daniella Lisieux de Oliveira Navarro: obrigado pela paciência e pelo incentivo! Merece boa parte desse mérito!

- Emília Nunes: amiga e companheira em TODAS as etapas deste trabalho! “Vamo que vamo!”.

Com semelhante importância, agradeço as pessoas que me ajudaram profissionalmente, cedendo espaços em laboratórios, como o Dr. Hugo Fajardo e membros do seu laboratório “GH Labs”; a Ana Íris Duré e sua equipe, Gabi e Vaní na FUNED; a equipe do LIRN – FIOCRUZ, em especial a Karen, Fernandinha, Bia, Bia, Aranádia, Víni; aqueles que contribuíram com informações preciosíssimas, como os membros da URS, em especial a Dra. Glênia Magalhães; ao Dr. José Geraldo, do setor de zoonoses da Secretaria de Saúde de Juiz de Fora. Valeu mesmo!

À Dra. Elizângela Guedes, que contribuiu em todas as fases do trabalho, da fase de transpiração a fase de inspiração. Muito obrigado!

E a todos os professores e colegas do Programa de Pós Graduação em Comportamento e Biologia Animais da Universidade Federal de Juiz de Fora.

## Resumo

A Febre Maculosa é uma zoonose causada por bactérias do gênero *Rickettsia*. A relação natural entre vetores e seus hospedeiros vertebrados, durante o ciclo enzoótico, pode variar no tempo e espaço, evidenciando uma complexidade epidemiológica que deve ser investigada e monitorada como principal indicador para as ações de políticas públicas na prevenção e controle de casos humanos. Nesse aspecto, cães e equinos podem atuar como sentinelas, sinalizando a circulação de riquetsias em uma região, bem como servindo como dispersores de potenciais vetores, permitindo, assim, a amplificação de um foco já estabelecido ou o estabelecimento de novos focos. Com o objetivo de melhor entender a circulação de riquetsia através de pesquisa sorológica no perímetro urbano do município de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, considerado área endêmica para febre maculosa, sangue de cães e equinos de diversas regiões foram testados através da Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). As amostras resultaram 12,75% (31/243) de cães e 23,68% (9/38) de equinos pela RIFI com títulos  $\geq 1:64$ . Na PCR foram utilizados iniciadores para amplificar fragmentos dos genes *gltA* e *ompA*. Nenhum resultado positivo foi encontrado. O maior número de cães positivos ocorreu na região leste da cidade, área com casos humanos descritos entre 2007 e 2008. Entretanto, a maior prevalência e concentração de títulos elevados em cães foi assinalada na região norte, área com casos recentes confirmados (2012), resultado semelhante àquele obtido para equinos, confirmando uma maior atividade dos focos naquela região. Áreas sem caso humano confirmado apresentaram animais com altos títulos, sugerindo um potencial risco para a população. Os resultados confirmam o papel de cães e equinos no ciclo enzoótico de riquetsias na região estudada e seu potencial como indicadores epidemiológicos para a investigação de casos e vigilância de ambiente na febre maculosa.

**Palavras-chave:** Rickettsiose; cavalos, cães, anticorpos, epidemiologia.

## Abstract

Spotted Fever is a zoonotic disease caused by bacteria of the genus *Rickettsia*. The natural relationship between vectors and their vertebrate hosts during the enzootic cycle, may vary in time and space, showing an epidemiological complexity that must be investigated and monitored as a key indicator for the actions of public policy in the prevention and control of human cases. This way, dogs and horses are sentinels, indicating the movement of *Rickettsia sp.* in a region and serving as dispersers of vectors, allowing the amplification of a focus or establishing new foci. To better understanding of the movement of *Rickettsia sp.* in the urban area of Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil , endemic area for spotted fever, blood of dogs and horses from different regions were tested by indirect immunofluorescence assay (IFA ) and Polymerase Chain Reaction ( PCR ). Samples resulted 12.75% (31/ 243) of dogs and 23.68 % ( 9/38 ) equine with titers  $\geq 1:64$ . PCR primers were used to amplify fragments of the *gltA* and *ompA* genes, no positive results. The highest number of positive dogs occurred in the east region, an area with human cases reported between 2007 and 2008. However, the highest prevalence and concentration of high titers in dogs was reported in the northern region, an area with confirmed recent cases ( 2012 ). Similar results were obtained from equine, confirming a higher activity in the foci of the region. Areas with no human case presented animals with high titers, suggesting a potential risk for the population. The results confirm the role of dogs and horses in the enzootic cycle of *Rickettsia* in the region studied and its potential as epidemiological indicators for the investigation of cases and monitoring of spotted fever in the environment.

**Key words:** Rickettsiosis, horses, dogs, antibodies, epidemiology.

## Lista de Figuras

- Figura 1:** Modelo onde uma única espécie de vetor faz ciclo em uma espécie de hospedeiro e pica acidentalmente humano, transmitindo a riquetsia.....15
- Figura 2:** Modelo onde uma única espécie de vetor faz ciclo em várias espécies de hospedeiros e picando acidentalmente humano, transmitindo a riquetsia.....15
- Figura 3:** Modelo onde diferentes espécies de vetores fazem ciclo em uma espécie de hospedeiro, e podem picar acidentalmente humano, transmitindo a riquetsia.....16
- Figura 4:** Modelo onde diferentes espécies de vetores fazem ciclo em diferentes espécies de hospedeiros e podem picar acidentalmente humano, transmitindo a riquetsia.....16
- Figura 5:** Mapa do Brasil, destacando o Estado de Minas Gerais, o município de Juiz de Fora e o perímetro urbano do município, local de coleta.....22
- Figura 6:** Distribuição de casos confirmados de Febre Maculosa, no período de 2007 a 2012, segundo a Unidade Regional de Saúde (URS), no núcleo urbano de Juiz de Fora, Minas Gerais, de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.....23
- Figura 7:** Perímetro urbano do município de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, assinalando a localização dos animais amostrados.....25
- Figura 8:** Imagem obtida pelo microscópio de Imunofluorescência Indireta de uma amostra positiva.....26



## Lista de tabelas

- Tabela 1:** Número de casos confirmados de Febre Maculosa na Região Sudeste do Brasil, segundo o Estado, no período de 2001 a 2013.....11
- Tabela 2:** Biodiversidade de vetores e hospedeiro de riquétsias patogênicas do Grupo Febre Maculosa (GFM).....14
- Tabela 3:** Número de casos confirmados de Febre Maculosa no município de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, segundo a região e bairro (LPI), no período de 2007 a 2012.....23
- Tabela 4:** Frequência absoluta (N) e relativa (%) de amostras de sangue canino e equino coletadas, segundo a região de residência, no município de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.....24
- Tabela 5:** Oligonucleotídeos utilizados para amplificação de genes de riquétsias.....26
- Tabela 6:** Frequência absoluta (n) e prevalência (%) de amostras de sangue canino testadas, pela Imunofluorescência Indireta, e reagentes (>1:64) para a presença de anticorpos anti-*Rickettsia* sp., em relação a região do município de Juiz de Fora, Estado de Minas Gerais, Brasil.....27
- Tabela 7:** Frequência de cães positivos para a presença de anticorpos anti-*Rickettsia* sp., segundo a titulação, em diferentes áreas do município de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.....28
- Tabela 8:** Frequência absoluta (n) e prevalência (%) de amostras de sangue equino testadas, pela Imunofluorescência Indireta, e reagentes (>1:64) para a presença de anticorpos anti-*Rickettsia* sp., em relação a região do município de Juiz de Fora, Estado de Minas Gerais, Brasil.....29
- Tabela 9:** Frequência de equinos positivos para a presença de anticorpos anti-*Rickettsia* sp., segundo a titulação, em diferentes áreas do município de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.....29

## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>Relação natural entre riquetsias e vertebrados na epidemiologia da Febre Maculosa .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2</b>	<b>Técnicas utilizadas na vigilância da FM .....</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>Soroepidemiologia de cães e equinos como indicador da circulação de riquetsias na região do Médio Paraibuna, Minas Gerais, Brasil. ....</b>	<b>19</b>
<b>3.1</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2</b>	<b>Material e Método.....</b>	<b>20</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Área de estudo (Figura 5) .....</b>	<b>20</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Coleta do material .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Pesquisa do bioagente / Reação de imunofluorescência indireta (RIFI).....</b>	<b>24</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Reação em cadeia da polimerase (PCR).....</b>	<b>25</b>
<b>3.3</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>25</b>
<b>3.4</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>29</b>
	<b>Conclusão.....</b>	<b>32</b>
	<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>33</b>

## 1 Introdução

Riquetsioses são doenças causadas por riquetsias, bactérias Gram-negativas, intracelulares obrigatórias, transmitidas por vetores ápteros, especialmente carrapatos. Estão amplamente distribuídas, de forma endêmica ou sazonal, podendo reemergir de forma epidêmica na população humana (Hoogstraal, 1967; Raoult; Roux, 1997; Azad e Beard, 1998).

As riquetsias pertencem à ordem Rickettsiales, com duas famílias de importância na saúde pública: Rickettsiaceae e Anaplasmataceae. A família Anaplasmataceae inclui os gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma*, bioagentes de zoonoses, *Cowdria* e *Neorickettsia*. A família Rickettsiaceae inclui *Rickettsia* e *Orientia* (Dumler et al. 2001).

Genotipicamente o gênero *Rickettsia* se divide em três grupos: Grupo Tifo (GT), composto por *Rickettsia prowazekii* (Tifo Epidêmico), transmitida por piolhos, e *Rickettsia typhi* (Tifo Murino) veiculada por pulgas; Grupo Ancestral (GA), que inclui *Rickettsia canadensis* e *R. belli*; e Grupo Febre maculosa (GFM) (Stothard; Clark; Fuerst, 1994; Roux et al. 1997; Roux; Raoult, 2000), cujas riquetsias são transmitidas principalmente por carrapatos.

O GFM é constituído por mais de trinta espécies e apenas parte dessas espécies é considerada patogênica para o homem, causando quadro de Febre Maculosa (FM). É veiculado por carrapatos, com exceção de *R. akari* e *R. felis*, transmitidas, respectivamente, por ácaros e pulgas (Raoult; Roux, 1997; Graves; Stenos, 2003; Brouqui et al. 2004; Parola; Paddock; Raoult, 2005).

A FM é considerada uma zoonose e tem aspectos epidemiológicos inerentes ao foco, podendo envolver diferentes espécies de hospedeiros vertebrados e carrapatos, o que pode variar no espaço e ao longo do tempo (Rudakov et al. 2003).

No Brasil, a Região Sudeste, com maior densidade populacional e área urbanizada do país, é a mais acometida pela FM e registra a quase totalidade dos óbitos. Assim, entre os anos 2001 e 2013 ocorreram 1260 casos no país, 938 (74,44%) deles na Região Sudeste (Tabela 1) (Brasil, 2013).

Dentro da Região Sudeste, o Estado de Minas Gerais, com 167 (17,80%) casos confirmados (Tabela 1), destaca-se pela ocorrência de casos em diferentes regiões

fisiográficas (Brasil, 2013), a maioria deles sem caracterização do papel de vetores e vertebrados no ciclo natural da doença.

**Tabela 1:** Número de casos confirmados de Febre Maculosa na Região Sudeste do Brasil, segundo o Estado, no período de 2001 a 2013.

Ano	Estados De Notificação				Total
	MG	SP	ES	RJ	
<b>2001</b>	4	8	0	0	12
<b>2002</b>	8	10	0	0	18
<b>2003</b>	11	38	14	1	64
<b>2004</b>	29	65	10	0	104
<b>2005</b>	18	82	2	24	126
<b>2006</b>	19	47	2	10	78
<b>2007</b>	14	35	4	13	66
<b>2008</b>	10	45	3	8	66
<b>2009</b>	12	65	1	8	86
<b>2010</b>	11	48	6	5	70
<b>2011</b>	18	82	9	16	125
<b>2012</b>	10	83	3	4	100
<b>2013</b>	3	19	0	1	23
<b>Total</b>	<b>167</b>	<b>627</b>	<b>54</b>	<b>90</b>	<b>938</b>

Fonte: Brasil (2013).

Nesse contexto, entre 2003 e 2012 foram confirmados 22 casos na região do médio Paraibuna, todos no município de Juiz de Fora, representando 14,47% do total para o Estado no mesmo período ( $n = 152$ ) e 1,79% em todo o território nacional ( $n = 1229$ ) (Brasil, 2013). A prevalência de casos permite assinalar esta região como área endêmica de FM, sendo, contudo, incipiente o conhecido sobre o ciclo enzoótico de riquetsias na área, especialmente sobre o envolvimento de vertebrados nesse ciclo.

O objetivo deste estudo é investigar a relação natural entre espécies de riquetsias em sangue de cães e equinos na Bacia Hidrográfica do Médio Paraibuna, microrregião de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Mas especificamente, objetivou-se: 1) analisar a circulação de riquetsias em cães e equinos através do diagnóstico sorológico pela RIFI; 2) caracterizar as

riquétias em cães e equinos através do diagnóstico molecular; 3) avaliar aspectos epidemiológicos de riquétias circulantes e seus hospedeiros vertebrados.

## 2 Revisão Bibliográfica

### 2.1 Relação natural entre riquétsias e vertebrados na epidemiologia da Febre Maculosa

Cães, gatos, cavalos, marsupiais, pequenos roedores e outros animais silvestres podem se infectar com riquétsias através da picada de carrapatos e apresentar sorologia positiva quando testados (Dias e Martins, 1939; Lemos, 2002; Horta et al. 2004, Gazêta et al. 2009). Na natureza, o ciclo das riquétsias é mantido pela capacidade dos carrapatos atuarem como vetores, reservatórios e amplificadores da riquétsia (Parola et al. 2005). Portanto, os vertebrados que servem de hospedeiros para os carrapatos participam do ciclo enzoótico da riquétsia, seja amplificando ou mantendo e difundindo carrapatos infectados para animais sinantrópicos ou domésticos (Tabela 2) (Schriefer; Azad, 1994; Fournier; Raoult, 2005).

Em um determinado ecótopo, a disponibilidade de vetores pode variar no espaço e no tempo, bem como a presença de hospedeiros vertebrados, favorecendo a circulação de riquétsias patogênicas (Guedes; Leite, 2008). As diversas atividades do homem e sua conexão com a atividade sazonal dos carrapatos, favorecem o aparecimento de casos humanos em caráter epidêmico, variando conforme as condições ambientais e peculiares ao seu ciclo enzoótico, o que torna mais complexa a epidemiologia das riquetsioses (Gazêta, 2012).

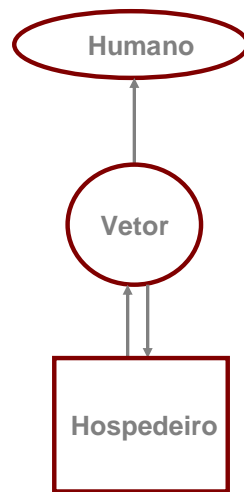
Para se conhecer o ciclo em uma determinada área e melhor investigação do foco, devemos observar três fatores: 1- o vetor capaz de manter o ciclo enzoótico da riquétsia, infectando animais; 2- animais que servem como hospedeiros para os vetores, mantendo-os e disseminando os carrapatos infectados em novas áreas sem a doença, gerando novos focos e 3- espécies de vetores que transmitem riquétsias patogênicas para humanos (Gazêta, 2012).

**Tabela 2:** Biodiversidade de vetores e hospedeiro de riquetsias patogênicas do Grupo Febre Maculosa (GFM).

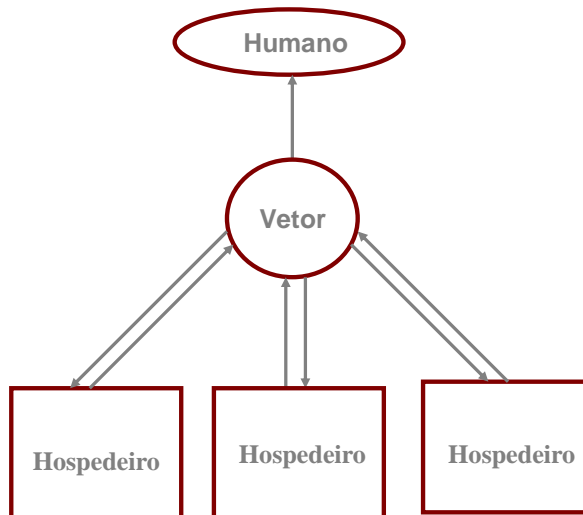
Riquetsia	Vetor	Hospedeiro	Distribuição
<i>Rickettsia rickettsii</i>	<i>Dermacentor andersoni</i>	Pequenos mamíferos	América do Norte, Central e do Sul.
	<i>Dermacentor variabilis</i>	(roedores, marsupiais,	
	<i>Amblyomma americanum</i>	coelhos), cães, equinos e	
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	aves.	
	<i>Amblyomma cajennense</i>		
<i>Rickettsia conorii</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Pequenos mamíferos	Europa, África, Ásia
	<i>Rhipicephalus pumilio</i>	(roedores, marsupiais), cães e aves.	
<i>Rickettsia japonica</i>	<i>Haemaphysalis</i> sp.	Roedores, cães	Ásia (Japão, China)
	<i>Dermacentor taiwanensis</i>		
	<i>Ixodes</i> sp.		
<i>Rickettsia africae</i>	<i>Amblyomma variegatum</i>	Bovinos, caprinos	África
	<i>Amblyomma hebraeum</i>		
<i>Rickettsia slovaca</i>	<i>Dermacentor reticulatus</i>	Suínos	Europa, Ásia (Rússia)
	<i>Dermacentor marginatus</i>		
<i>Rickettsia parkeri</i>	<i>Amblyomma americanum</i>	Cães são apontados como prováveis hospedeiros.	América do Norte e do Sul
	<i>Amblyomma maculatum</i>		
	<i>Amblyomma triste</i>		
<i>Rickettsia sibirica</i>	<i>Dermacentor</i> sp.	Roedores, aves	Ásia, África
	<i>Haemaphysalis</i> sp.		
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>		
<i>Rickettsia aeschlimannii</i>	<i>Hyalomma marginatus</i>	Ovinos, caprinos e bovinos	África, Europa
	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>		
<i>Rickettsia helvetica</i>	<i>Ixodes</i> sp.	Cão, gato, cervídeo	Europa, Ásia
<i>Rickettsia honei</i>	<i>Ixodes</i> spp.	Lagartos, ofídeo, roedor	Austrália, Ásia
	<i>Rhipicephalus</i> spp.	( <i>Rattus rattus</i> )	
<i>Rickettsia australis</i>	<i>Ixodes holocyclus</i>	Roedores, marsupiais	Austrália
<i>Rickettsia akari</i>	<i>Liponyssoides sanguineus</i>	Roedores	América do Norte, Rússia, África
	<i>Alloderm</i> sp.		
<i>Rickettsia felis</i>	<i>Ctenocephalides felis</i>	Cães, gatos, marsupiais	América do Norte e do Sul, Europa, África, Ásia

Fonte: Adaptado de Schriefer; Azad, 1994; Fournier; Raoult, 2005.

De posse dessas informações, se identificado o vetor capaz de transmitir a riquetsia patogênica ao homem, podemos descrever quatro modelos de transmissão e manutenção do ciclo em uma determinada região (Figuras 1 a 4) (Adaptado de Mather, Ginsberg 1994):

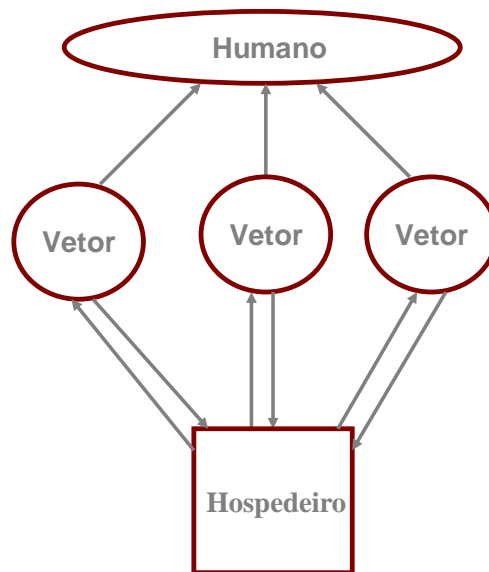


**Figura 1:** Modelo onde uma única espécie de vetor faz ciclo em uma espécie de hospedeiro e pica acidentalmente humano, transmitindo a riquetsia.

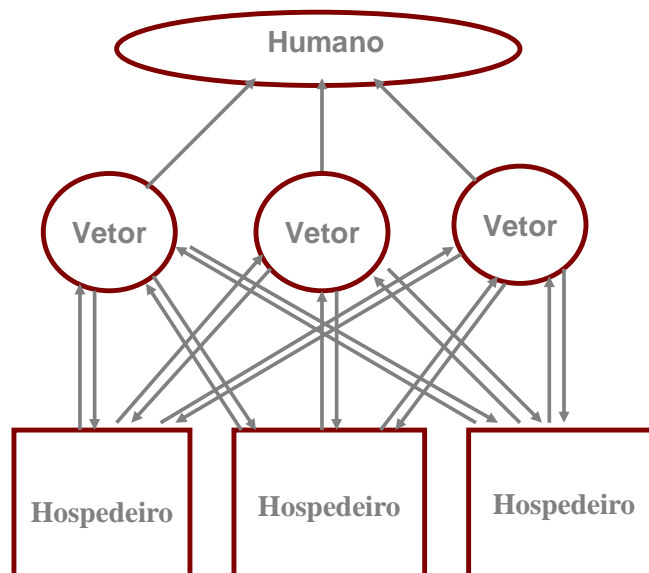


**Figura 2:** Modelo onde uma espécie de vetor faz ciclo em várias espécies de hospedeiros e pica acidentalmente humano, transmitindo a riquetsia.





**Figura 3:** Modelo onde diferentes espécies de vetores fazem ciclo em uma espécie de hospedeiro, picando acidentalmente humano e transmitindo a riquetsia.



**Figura 4:** Modelo onde diferentes espécies de vetores fazem ciclo em diferentes espécies de hospedeiros e picando acidentalmente humano, transmitindo a riquetsia.

Não é incomum a ocorrência de casos humanos de FM em áreas sob forte pressão econômica, onde as pessoas se aventuram em regiões infestadas por carrapatos em busca da

sobrevivência (Galvão et al., 2002) ou devido a outras atividades, situação em que ocorre maior chance de encontro do carrapato infectado com o homem. A diminuição de áreas de preservação e a ocupação destes espaços pelo homem refletem uma necessidade de animais selvagens saírem de seu ambiente natural, forçando-os a procurar novos lugares para se estabelecerem ou uma pressão de adaptação a ambientes antrópicos. Um bom exemplo para este caso são as capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*), animais incriminados na manutenção de riquetsias e carrapatos em áreas urbanas no Brasil, bem adaptadas ao cenário urbano (Labruna et al., 2004).

Segundo Labruna (2009), para um vertebrado contribuir com a amplificação da riquetsia, ele deve: 1) ser abundante na área endêmica; 2) ser hospedeiro para o carrapato vetor; 3) ser susceptível a infecção pela riquetsia; 4) desenvolver riquetsemia suficiente para infectar carrapatos em fase parasitária e 5) proliferar de forma abundante introduzindo novos animais sem imunidade contra a doença. Dessa forma, inúmeros animais se encaixam neste perfil, por exemplo os pequenos roedores (McDade; Newhouse, 1986; Milagres et al., 2013), os marsupiais (Horta et al., 2007) e as capivaras (Souza et al., 2009).

Nos vertebrados, a riquetsemia normalmente é breve, dificultando a detecção do agente por exames laboratoriais, porém, indiretamente, através da pesquisa de anticorpos anti-riquetsias (Lemos, 2004; Gazêta, 2012), é possível detectar a circulação da riquetsia mesmo após um longo período de tempo da infecção, confirmando o papel dos vertebrados como sentinelas (Horta et al., 2004).

## **2.2 Técnicas utilizadas na vigilância da FM**

A evolução das técnicas laboratoriais e seu acesso possibilita um maior conhecimento e melhor entendimento sobre uma determinada doença. O correto diagnóstico da FM é importante para diferenciar as riquetsioses, até mesmo de outras doenças com sinais clínicos semelhantes, direcionando para o correto tratamento e como ferramenta na vigilância epidemiológica.

Atualmente existem quatro formas padronizadas de diagnóstico para riquetsioses: técnicas sorológicas, genômicas, detecção de antígeno e isolamento (Lemos, 2004; Brites Neto; Duarte, 2010).

A técnica sorológica mais utilizada é a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), capaz de detectar anticorpos IgG e IgM após 7 a 10 dias da infecção (Lemos, 2004). É a técnica mais simples, de menor custo, apresenta boa sensibilidade e especificidade para riquetsioses, onde em caso de positividade, é possível informar o grupo antigênico a qual a riquetsia detectada pertence (Brites Neto; Duarte, 2010), não tendo o poder de afirmar o gênero do micro-organismo em questão (Raoult; Roux, 1997). É a técnica recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como padrão ouro para o diagnóstico de riquetsioses em vertebrados (Galvão et al., 2005).

O título de corte preconizado pelo *CDC (Centers for Disease Control)* é a partir de 1:64. Souza (2013) afirma que títulos maiores ou iguais a 1:64 caracterizam a circulação de riquetsias em um foco e apontam para as espécies de vertebrados potencialmente envolvidas em ciclo enzoótico e podem sugerir uma avaliação da extensão do foco, bem como identificar focos silenciosos, isto é, onde não há relato de casos humanos, mas indiretamente os títulos positivos indicam a circulação da riquetsia.

Títulos altos, por exemplo, acima de 1:512 sugerem infecções recentes e a(s) espécie(s) com maior potencial de manter(em) o ciclo enzoótico, enquanto titulações inferiores a este valor sugerem infecções recentes ou antigas (Piranda et al., 2008).

A técnica genômica mais utilizada é a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), que possibilita o diagnóstico de infecções agudas (antes mesmo da formação de anticorpos) podendo-se obter o DNA da riquetsia a partir de sangue, biópsia de pele ou tecidos de necropsia (Lemos, 2004). É uma ferramenta que permite a detecção do agente tanto nos vertebrados quanto nos vetores, uma vez detectado o agente, o produto da PCR pode ser sequenciado e ter parte de suas informações genéticas mapeadas, possibilitando a identificação do micro-organismo (Brites Neto; Duarte, 2010).

### 3 Seroepidemiologia de cães e equinos como indicador da circulação de riquetsias na região do Médio Paraibuna, Minas Gerais, Brasil.

#### 3.1 Introdução

Eventualmente, animais sinantrópicos e/ou domésticos que atuam como hospedeiros primários de carrapatos podem introduzir e manter linhagens infectadas em ambiente antrópico. Assim, por exemplo, o contato do cão doméstico com o homem permite a transmissão de patógenos e parasitos pela possibilidade de carrear bioagentes e vetores da natureza para o ambiente antrópico (Szabó et al., 2001). Cães que têm acesso à região de mata ou compartilham ambientes com a fauna silvestre podem apresentar infestações mistas, promovendo a disseminação e adaptação dos carrapatos a diversos tipos de ambiente (Perez et al., 2008), inclusive para o ambiente domiciliar. Além disso, cães, assim como os humanos, são suscetíveis à infecção por *R. rickettsii*, apresentando sinais clínicos facilmente confundidos com outras doenças (Piranda et al., 2008) e, uma vez infectados, desenvolvem riquetsemia, atuando como amplificadores de riquetsias (Labruna, 2009; Pacheco et al., 2011; Piranda et al., 2011), além de servirem de sentinelas à circulação enzoótica desse patógeno.

Mesmo considerando que em diferentes espécies de vertebrados foram detectados anticorpos anti-*Rickettsia* sp. (Dias e Martins, 1939; Horta et al. 2004, Gazêta et al. 2009), a riquetsemia geralmente é breve, dificultando o encontro desses micro-organismos.

Igualmente, apesar do encontro de cavalos infectados por *R. rickettsii* (Gerhke, 2010), o papel dos equinos no ciclo das riquetsias ainda é pouco conhecido, parecendo ter maior relevância na manutenção de potenciais vetores de *Rickettsia* sp., especialmente *A. cajennense*, carrapato sabidamente incriminado na transmissão da FM (Horta et al., 2004).

Assim, equinos infestados por carrapatos podem servir como um efetivo mecanismo de dispersão do ectoparasito infectado por riquetsias patogênicas, podendo resultar em novos focos da doença (Cardoso et al., 2006; Milagres et al., 2010). Além disso, animais imunocompetentes podem servir de sentinelas, sinalizando a circulação de riquetsias em uma determinada área.

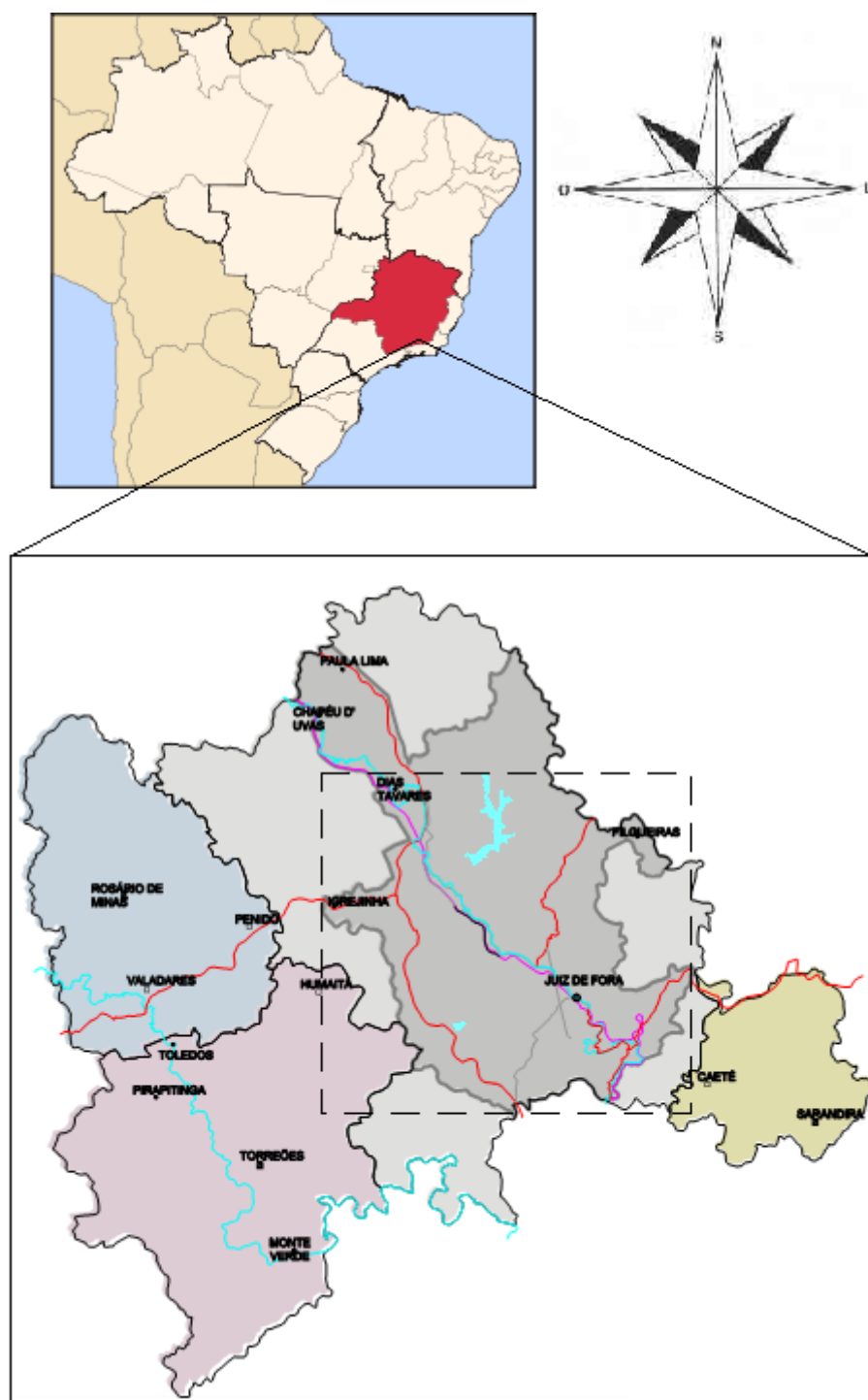
Dessa forma, antes da ocorrência do caso humano de FM, cães e cavalos podem agir como sentinelas para a detecção sorológica da riquetsia em áreas endêmicas (Horta et al., 2004). Esses vertebrados também atuam como dispersores de vetores, ampliando a

distribuição da doença. Devido ao fato desses animais serem utilizados amplamente em região urbana e rural, evidencia-se a importância do mapeamento das riquetsias de interesse para saúde pública e do conhecimento da fauna de potenciais hospedeiros e vetores/reservatórios presentes nos focos de FM.

## **3.2 Material e Método**

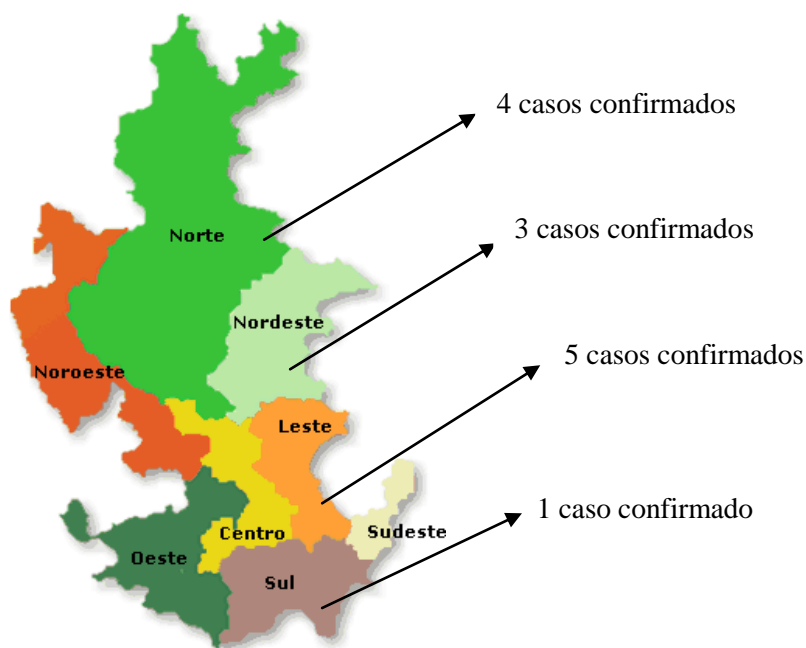
### **3.2.1 Área de estudo (Figura 5)**

A cidade de Juiz de Fora está situada no interior do estado de Minas Gerais (21° 41' 20" S 43° 20' 40" O) e pertence à mesorregião da Zona da Mata, a 283 km da capital mineira. Apresenta uma população estimada de 545.942 habitantes, bioma de mata atlântica e uma área de 1.435,664 km<sup>2</sup> (IBGE, 2013). Apresenta temperatura média anual de 19,25°C.



**Figura 5:** Mapa do Brasil, destacando o Estado de Minas Gerais, o município de Juiz de Fora e o perímetro urbano do município, local de coleta.

Foi selecionada por meio dos dados disponibilizados pela Unidade Regional de Saúde de Juiz de Fora (URS/JF) as regiões e bairros que possuem casos confirmados de FM (Figura 6, Tabela 3).



**Figura 6:** Distribuição de casos confirmados de Febre Maculosa, no período de 2007 a 2012, segundo a Unidade Regional de Saúde (URS), no núcleo urbano de Juiz de Fora, Minas Gerais, de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil

**Tabela 3:** Número de casos confirmados de Febre Maculosa no município de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, segundo a região e bairro (LPI), no período de 2007 a 2012.

Região	Bairro de Provável Local de Infecção (LPI)	Número de casos	Ano
Norte	Araújo	1	2012
	Benfica	2	2012
	Cerâmica	1	2012
<b>Total</b>		<b>4</b>	
Nordeste	Granjas Bethânia	1	2007
	Santa Teresinha	2	2007/2012
<b>Total</b>		<b>3</b>	
Leste	Linhares	1	2008
	Progresso	2	2007
	Santa Rita de Cássia	2	2007/2008
<b>Total</b>		<b>5</b>	
Sul	São Geraldo	1	2008
<b>Total</b>		<b>1</b>	
<b>Total Geral</b>		<b>13</b>	

Fonte: Unidade Regional de Saúde de Juiz de Fora

### 3.2.2 Coleta do material

Amostras de sangue de 267 cães (*Canis familiaris*) e de 38 cavalos (*Equus caballus*) (Tabela 4, Figura 7), mantidas sob refrigeração entre 1 e 8°C, por até 48 horas após coleta, foram cedidas por clínicas veterinárias e enviadas para laboratório de Análise Clínica Veterinária no município, entre 15 de outubro de 2012 e 21 de dezembro de 2012. As amostras cedidas pertenciam a cães e equinos com ou sem sintomatologia para qualquer doença.

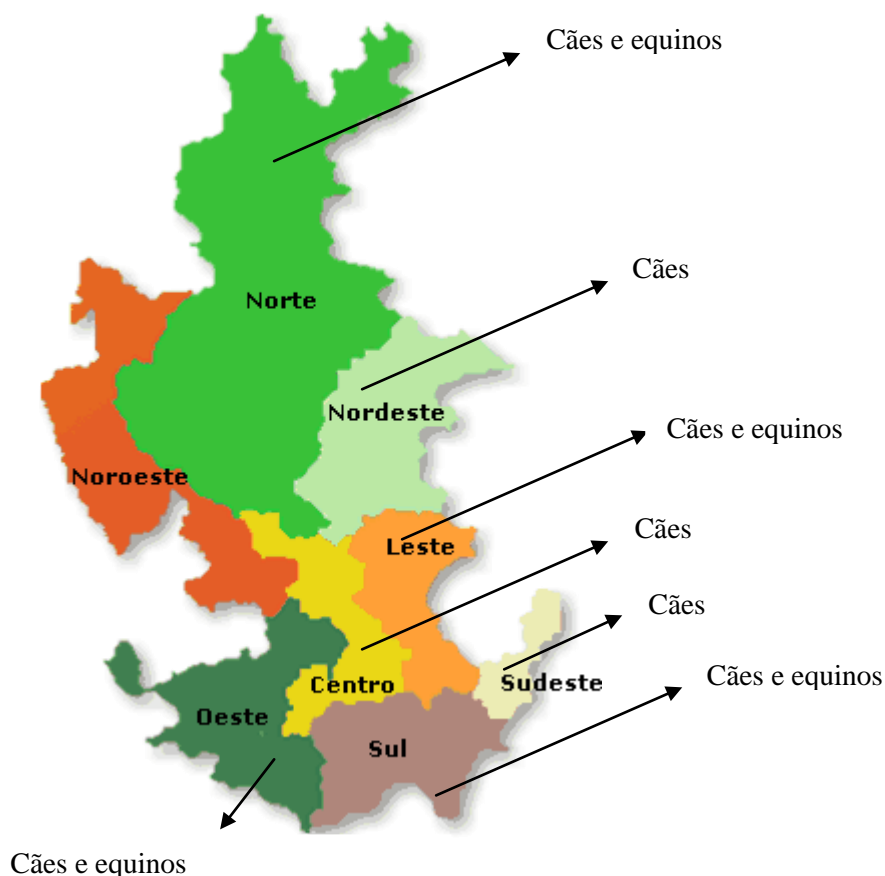
O soro e o coágulo foram separados por centrifugação a 3200 rpm por 5 minutos, armazenados em tubos de 1,5 mL e congelados a -20°C. Os tubos contendo o soro foram encaminhados para o Laboratório de Riquetsioses e Hantavirose, da Divisão de Epidemiologia e Controle de Doenças da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), em Belo Horizonte, Minas Gerais, para a pesquisa de anticorpos, e os tubos contendo o coágulo foram encaminhados para o Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses (LIRN), do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), na cidade do Rio de Janeiro/RJ, para realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Dados de localidade de residência foram obtidos a partir do cadastro das clínicas de origem das amostras.

**Tabela 4:** Frequência absoluta (N) e relativa (%) de amostras de sangue canino e equino coletadas, segundo a região de residência, no município de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

Região	Amostras de sangue canino		Amostras de sangue equino	
	N	%	N	%
Norte	17	6,36	35	92,10
Nordeste	18	6,74	0	0
Sul	16	5,99	1	2,63
Sudeste	17	6,36	0	0
Leste	116	43,44	1	2,63
Oeste	13	4,86	1	2,63
Central	70	26,21	0	0
<b>Total</b>	<b>267</b>	<b>100</b>	<b>38</b>	<b>100</b>





**Figura 7:** Perímetro urbano do município de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, assinalando a localização dos animais amostrados.

### 3.2.3 Pesquisa do bioagente / Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

Para a pesquisa de imunoglobulinas da classe G (IgG) anti-*Rickettsia* sp. foi empregada a RIFI, utilizando-se o *kit* diagnóstico do Laboratório Scimedx (New Jersey, EUA), empregando-se *R. rickettsii* como antígeno. Soro hiperimune de cão e equino positivos foram utilizados como controle positivo. Como controle negativo foi utilizado água destilada. Todo o processo de diluição seguiu o protocolo estabelecido para o *kit* diagnóstico e a triagem das amostras levou em consideração uma titulação mínima de 1:64.

Amostras consideradas positivas (1:64) foram testadas em diferentes diluições até se obter negatividade.

Os ensaios sorológicos foram realizados no Laboratório Central do Estado de Minas Gerais (Lacen / MG), na Fundação Ezequiel Dias (Funed).

### 3.2.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Todas as amostras positivas sorologicamente foram testadas, por PCR, para a presença de *Rickettsia* sp..

A extração do DNA genômico foi feita pelo QIAamp DNA Blood Mini Kit®, seguindo as recomendações do fabricante, QIAGEN.

Na amplificação foram utilizados *primers* gênero-específicos (*gltA*) para detecção de *Rickettsia* spp. e *primers* grupo-específicos, para detecção de riquetsias GFM (*ompA*) (Tabela 5) (Azad et al., 1990; Regnery; Spruill; Plikaytis, 1991; Labruna et al. 2004). O gene citrato sintase (*gltA*) é encontrado em todos os micro-organismos da espécie *Rickettsia* e a maior proteína de membrana externa (*ompA*) até agora só foi encontrada em bactérias do GFM (Labruna et al. 2004). O preparo das soluções e as condições das corridas da PCR foram adequados para cada tipo de gene pesquisado (Eremeeva; Yu; Raoult, 1994; Labruna et al. 2004). Foi utilizado DNA total de *R. rickettsii* como controle positivo e água destilada como controle negativo. Para a visualização do fragmento de DNA amplificado, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2 %, coradas por brometo de etídeo e observadas em luz ultravioleta (Sambrook; Russell, 2001).

**Tabela 5** : Oligonucleotídeos utilizados para amplificação de genes de riquetsias.

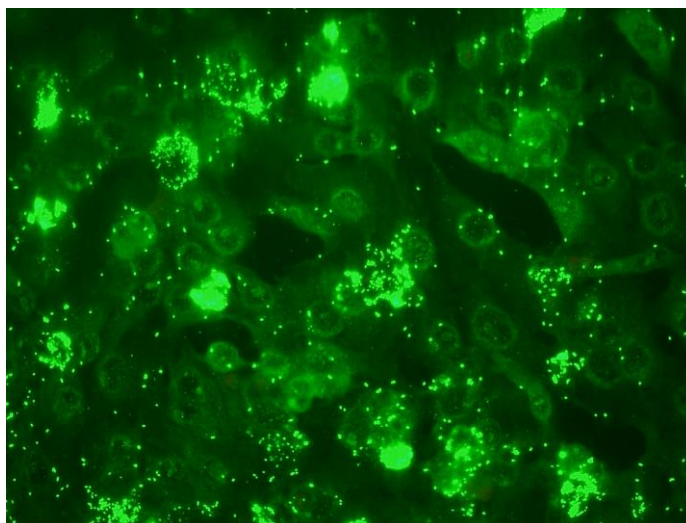
Gene	Oligonucleotídeos	Sequência de nucleotídeo (5'-3')	Tamanho amplificado (pb)
<i>ompA</i> a	<i>Rr</i> 190.70p	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA	532
	<i>Rr</i> 190.602n	AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT	
<i>gltA</i> b	CS2-78	GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT	401
	CS2-323	GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT	

Fonte: a Regnery; Spruill; Plikaytis, 1991; b Labruna et al., 2004

### 3.3 Resultados

As amostras de soro canino resultaram em 11,61% (31/267) títulos  $\geq 1:64$  (Figura 8). Destes, 14 (45,16%) estão situados na Região Leste do município, nove (29,03%) na Região Central, quatro (12,90%) na Região Norte, dois (6,45%) na Região Sudeste e dois (6,45%) na

região Sul (Tabela 6 e Tabela 7). O bairro de maior prevalência foi Linhares, com sete animais considerados positivos, seguido pelo Centro, com três.



**Figura 8:** Imagem obtida pelo microscópio de Imunofluorescência Indireta de uma amostra positiva.

**Tabela 6:** Frequência absoluta (n) e prevalência (%) de amostras de sangue canino testadas, pela Imunofluorescência Indireta, e reagentes ( $>1:64$ ) para a presença de anticorpos anti-*Rickettsia* sp., em relação à região do município de Juiz de Fora, Estado de Minas Gerais, Brasil.

Região	Amostras coletadas		Amostras positivas	
	n	n	%	
<b>Norte</b>	17	4	23,52%	
<b>Nordeste</b>	18	0	0%	
<b>Sul</b>	16	2	12,5%	
<b>Sudeste</b>	17	2	11,76%	
<b>Leste</b>	116	14	12,06%	
<b>Oeste</b>	13	0	0%	
<b>Central</b>	70	9	12,85%	
<b>Total</b>	<b>267</b>	<b>31</b>	<b>11,61</b>	

**Tabela 7:** Frequência de cães positivos para a presença de anticorpos anti-*Rickettsia* sp., segundo a titulação, em diferentes áreas do município de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

Região	Bairro	Positivo				Total
		1:64	1:128	1:256	1:512	
Norte	Araújo	-	-	-	1	1
	Barbosa Lage	1	-	-	-	1
	Benfica	-	1	-	1	2
Sul	Cidade Nova	-	-	-	1	1
	Ipiranga	-	-	-	1	1
Sudeste	Vila Ideal	-	-	-	1	1
	Parque das Palmeiras	1	-	-	-	1
Leste	Manoel Honório	1	-	-	-	1
	Linhares	4	2	1	-	7
	Santa Rita	1	-	1	-	2
	São Bernardo	-	1	-	-	1
	Centenário	1	-	1	-	2
	Nossa Senhora Aparecida	1	-	-	-	1
Central	Jardim Glória	1	1	-	-	2
	Paineiras	-	-	1	-	1
	Centro	2	-	1	-	3
	São Mateus	1	1	-	-	2
	Bom Pastor	-	1	-	-	1
<b>Total</b>		<b>14</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>31</b>
		<b>(45,16%)</b>	<b>(22,58%)</b>	<b>(16,13%)</b>	<b>(16,13%)</b>	<b>(100%)</b>

% = Prevalência

Das 38 amostras de equinos, nove (23,68%), foram consideradas positivas no teste de RIFI (Tabela 8). Destes, apenas um animal (11,11% dos positivos) está localizado na região sul da cidade de Juiz de Fora, enquanto oito animais (88,89% dos positivos) estão localizados na Região Norte da cidade (Tabela 9), região que apresentou no último ano (2012) casos humanos de FM. O bairro mais prevalente foi o bairro Remonta, apresentando sete animais positivos, situado na Região Norte da cidade de Juiz de Fora, especialmente situado próximo ao bairro Benfica e Araújo, bairros com casos humanos de FM.

**Tabela 8:** Frequência absoluta (n) e prevalência (%) de amostras de sangue equino testadas, pela Imunofluorescência Indireta, e reagentes (>1:64) para a presença de anticorpos anti-*Rickettsia* sp., em relação à região do município de Juiz de Fora, Estado de Minas Gerais, Brasil.

Região	Amostras coletadas		Amostras positivas	
	n	n	%	
Norte	35	8	22,85	
Sul	1	1	100	
Leste	1	0	0	
Oeste	1	0	0	
<b>Total</b>	<b>38</b>	<b>9</b>	<b>23,68</b>	

**Tabela 9:** Frequência de equinos positivos para a presença de anticorpos anti-*Rickettsia* sp., segundo a titulação, em diferentes áreas do município de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

Região	Bairro	Positivo					Total
		1:64	1:256	1:512	1:1024	1:2048	
Norte	Barreira do Triunfo	-	1	-	-	-	1
	Remonta	2	-	1	1	3	7
	Sul	Salvaterra	-	-	1	-	-
<b>Total</b>		<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>9</b>
		<b>(22,22%)</b>	<b>(11,11%)</b>	<b>(22,22%)</b>	<b>(11,11%)</b>	<b>(33,33%)</b>	<b>(100%)</b>

% = prevalência

Todas as amostras testadas na PCR (*primers* para *gltA* e *ompA*) foram negativas para a presença de DNA de riquetsias.

### 3.4 Discussão

Isoladamente, os testes sorológicos devem ser considerados apenas o primeiro passo para o diagnóstico ou caracterização de riquetsias. Esse processo somente é realizado mediante combinação com cultura ou técnicas de detecção genética, uma vez que há reação cruzada entre riquetsias diferentes (Horta et al., 2004; Pinter et al., 2008; Piranda et al., 2008), como ocorre com *R. rickettsii* e *R. akari* (Horta et al., 2004) ou até com outros microorganismos, como o causador da doença de Lyme (*Borrelia burgdorferi*) (Raoult; Roux, 1997) e *Legionella* (Raoult; Dasch, 1995), causadora da “doença do Legionário”. Entretanto, os títulos obtidos podem sugerir o grupo antigênico (Phillip et al., 1978; Teyssiere; Raout, 1992; Brites Neto; Duarte, 2010) ou espécie de riquetsia antigenicamente mais próxima (Piranda et al., 2008).

Conseqüentemente, a detecção sorológica do GFM ou de espécies patogênicas de riquetsias, em área com casos confirmados ou suspeitos de FM, serve de apoio às ações voltadas para a saúde pública e ao diagnóstico presuntivo ou probabilístico. Igualmente, uma elevada frequência de títulos  $\geq 1:512$ , sugestivos de infecções recentes (Piranda et al., 2008), indica uma circulação mais recente de riquetsias em uma determinada área, como a Região Norte de Juiz de Fora, tanto para caninos quanto para equinos.

De fato, inquéritos sorológicos em cães e equinos, em áreas endêmicas para FM no Brasil, resultaram em diferentes prevalências (Galvão et al., 2006; Horta et al., 2004; Vianna et al., 2008; Gazêta et al., 2009; Milagres et al., 2010, Pacheco et al., 2011), evidenciando características epidemiológicas particulares ou possíveis diferenças sazonais relativas à atividade de circulação de riquetsias em cada área (Galvão et al., 2006; Gazêta et al., 2009). Ao contrário, onde a doença não é considerada endêmica, é possível obter negatividade nesses inquéritos (Sangioni et al., 2005), salientando o papel desses vertebrados como sentinelas (Horta et al., 2004; Sangioni et al., 2005; Cardoso et al., 2006; Galvão et al., 2006).

No município de Juiz de Fora os títulos mais elevados ( $\geq 1:512$ ) (Tabelas 7 e 9) foram detectados em áreas onde foram registrados os casos mais recentes (Tabela 3). Da mesma forma, em áreas onde os casos de FM foram registrados há mais tempo (Tabela 3) os títulos detectados não foram superiores a 1:256 (Tabela 7), evidenciando uma relação temporal entre a ocorrência de casos e a atividade do foco, qualificada pela detecção de anticorpos circulantes.

Nesse sentido, é oportuno observar que em áreas sem casos humanos confirmados de FM, como a Região Sudeste, os títulos também foram elevados (Tabela 7), indicando áreas com potencial risco para FM e, conseqüentemente, necessitando de uma contínua atenção do sistema de saúde pública para a ocorrência de casos.

Essa assertiva é corroborada pelo trabalho de Pacheco et al. (2011), também realizado em Juiz de Fora, que encontraram títulos iguais ou superiores a 1:64 em 53 (67%) cães residentes no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município e 16 (41%) equinos, ao pesquisarem anticorpos contra *R. rickettsii* em dois bairros, Nova Benfica e Barbosa Lage, áreas diferentes de aquelas ora investigadas e sem casos confirmados de FM. Da mesma forma, a proposta de área endêmica para a região do médio Paraibuna parece ser pertinente já que Guedes et al. (2005), trabalhando apenas com carrapatos, relatam evidência de *R. rickettsii* em *A. cajennense* em Coronel Pacheco, município com caso confirmado de FM, localizado a 17,2 km de Juiz de Fora, mostrando a circulação da riquetsia patogênica naquela região.

As áreas com histórico de casos humanos no município de Juiz de Fora (Figura 6, tabela 3), são regiões urbanas, com predomínio de cães e equinos como animais circulantes, e presença de animais sorologicamente positivos em todas as regiões estudadas. Entretanto, em algumas dessas áreas, especialmente aquelas contínuas ao rio Paraibuna, é comumente observada a presença de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*), vertebrado frequentemente associado aos focos de FM na Região Sudeste (Pacheco et al., 2007.).

Esse cenário parece não ser incomum em áreas com casos de FM da Região Sudeste, especialmente na bacia hidrográfica do Rio Paraíba do Sul, envolvendo uma grande área que concentra um número significativo de casos e óbitos por FM (Brasil, 2013) e indica a facilidade técnica de utilizarmos a pesquisa sorológica em cães e equinos para a vigilância de ambiente pela possibilidade de analisarmos indiretamente a atividade de riquetsias em uma área através da massa biológica de anticorpos, detectada pela RIFI, técnica de baixo custo e rotineiramente empregado no serviço de saúde pública. Contudo, o entendimento do ciclo enzoótico e epidêmico de riquetsias, fundamental para a implantação de ações efetivas no controle e prevenção da FM, deve envolver o estudo dos potenciais vetores de essa riquetsiose.

Embora não tenha sido possível a identidade da(s) riquetsia(s) circulante(s), a *R. rickettsii* é a espécie mais frequentemente descrita nos focos da região da bacia do Paraíba do Sul (Guedes et al., 2005; Gerhke, 2010; Pacheco et al., 2011; Moura-Martinião et al., 2014), onde se encontra o médio Paraibuna. Sua elevada patogenicidade, associação com

*Amblyomma cajennense*, carrapato de grande antropofilia, cães e equinos, espécies comuns em ambiente antrópico, chama a atenção para o aumento de casos nas áreas urbanas, com maior concentração populacional, como acontece em Juiz de Fora, reforçando a necessidade da implantação de um serviço de vigilância de ambiente.



## Conclusão

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir:

- 1) Há circulação de *Rickettsia sp.* em diversos bairros onde ocorreram casos humanos de Febre Maculosa, confirmados pela técnica sorológica RIFI acima de 1:64 em cães e equinos;
- 2) Pela ausência de positividade nos exames moleculares (PCR) não foi possível a caracterização molecular;
- 3) A presença de cães e equinos positivos sorologicamente em áreas com casos humanos confirmados nos permite relacionar uma temporalidade e estimar um provável tempo de contato entre a *Rickettsia sp.* e o vertebrado avaliado, tendo como base os títulos obtidos através da RIFI. Dessa forma, podemos sugerir as regiões Norte, Sul e Sudeste da cidade de Juiz de Fora como áreas de circulação mais recentes que em regiões como Leste e Centro. Nas regiões Nordeste e Oeste, não foi encontrado animais positivos, sugerindo a ausência de circulação de *Rickettsia sp.* nessas áreas.

## Referências Bibliográficas

AZAD, A. F.; BEARD C. B., Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. **Emerging infectious diseases**, Atlanta, v.4, n. 2, p.179-186, 1998.

AZAD, A. F., WEBB, L., CARL, M.; DASCH, G. A. Detection of rickettsiae in arthropod vectors by DNA amplification using the polymerase chain reaction. **Annals of the Lyceum of Natural History of New York**, n.590, p.557-563. 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>. Acesso em: 23 set. 2013.

BRITES NETO, J. ; DUARTE, K. M. R. Diagnostic assays for Rickettsiosis infectiveness (review article). **Revue de Médecine Vétérinaire**, n. 161, p.167-172. 2010.

BROUQUI, P.; BACELLAR, F.; BARANTON, G.; BIRTLES, R.J.; BJOËRSDORFF, A.; BLANCO, J.R.; CARUSO, G.; CINCO, M.; FOURNIER, P.E.; FRANCAVILLA, E.; JENSENIUS. M.; KAZAR, J.; LA FERL, H.; LAKOS, A.; LOTRIC FURLAN, S.; MAURIN, M.; OTEO, J.A.; PAROLA, P.; PEREZ-EID, C.; PETER, O.; POSTIC, D.; RAOULT, D.; TELLEZ, A.; TSELENTIS, Y.; WILSKE, B. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. **Clin Microbiol Infect**, n. 10, v. 12, p.1108-32, 2004.

CARDOSO L.D.; FREITAS, R. N.; MAFRA, C.L.; NEVES, C.V.; FIGUEIRA, F.C.; LABRUNA, M.B.; GENNARI, S.M.; WALKER, D.H.; GALVÃO, M.A. Characterization of *Rickettsia* spp. Circulating in a silent peri-urban focus for Brazilian spotted fever in Caratinga, Minas Gerais, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, n. 22, p.495-501, 2006.

DIAS, E.; MARTINS, A.V. Spotted fever in Brazil. **Am. J. Trop. Med.** n.19, p.103-108, 1939.

DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.; DASCH, G.A.; PALMER, G.H.; RAY, S.C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F.R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. **Int J Syst Evol Microbiol**, n.51, p.2145-2165. 2001.

EREMEEVA, M.; YU, X.; RAOULT, D. Differentiation among spotted fever group rickettsiae species by analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR- amplified DNA. **J Clin Microbiol**, n.32, p.803-810. 1994.

FOURNIER, P.E.; RAOULT, D. Mediterranean spotted fever and other tick-borne rickettsioses. In: Goodman JL, Denis DT, Sonenshine DE (ed.). **Tick-Borne Diseases of Humans**. ASM Press, Washington, DC. 418 pp. 2005.

GALVÃO, M. A. M.; CARDOSO, L. D.; MAFRA, C. L.; CALIC, S. B.; WALKER, D. H. Revisiting Brazilian spotted fever focus of Caratinga, Minas Gerais State, Brazil. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** n.1078, p.255-256. 2006.

GALVÃO, M.A.M.; LAMOUNIER, J.Á.; BONOMO, E.; TROPPIA, M.S.; REZENDE, E.G.; CALIC, S.B.; CHAMONE, C.B.; MACHADO, M.C.; OTONI, M.E.A.; LEITE, R.C.; CARAM, C.; MAFRA, C.L.; WALKER, D.H.. Rickettsioses emergentes e reemergentes uma região endêmica do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, n.18, p.1593-1597, 2002.

GALVÃO, M. A. M.; SILVA, L. J.; NASCIMENTO, E. M. M.; CALIC, S. B.; SOUSA R.; BACELLAR, F. Riquetsioses nos Brasil e Portugal: ocorrência, distribuição e diagnóstico. **Rev. Saúde Pública**, n.39, p.850-856, 2005.

GAZÊTA, G.S. Estratégia de análise: O diagnóstico e a informação temporo espacial. In: CURSO DE CAPACITAÇÃO EM VIGILÂNCIA DE AMBIENTE DA FEBRE MACULOSA E OUTRAS RIQUETSIOSES. Belo Horizonte. Ministério da Saúde / Fiocruz. Material em Mídia Digital. 2012.

GAZÊTA, G. S.; SOUZA, E. E. R.; ABOUD-DUTRA, A. E.; AMORIM, M.; BARBOSA, P. R.; ALMEIDA, A. B.; GOMES, V.; GEHRKE, F. S.; MARRELLI, I. M. T.; SCHUMAKER, T.T. Potential vectors and hosts of *Rickettsia spp*: epidemiological studies in the Vale do Paraíba, state of Rio de Janeiro/Brazil. **Clin. Microbiol. Infect**, n.15, p.269-270. 2009.

GRAVES, S.; STENOS, J. *Rickettsia honei* - A spotted fever group rickettsia on three continents. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** n.990, p.62-66, 2003.

GERHKE, F.S. **Detecção e caracterização molecular de riquetsias em humanos, potenciais vetores e animais domésticos da Região Sudeste do Brasil**. Tese. São Paulo (Brasil). Instituto de Ciência Biomédica da Universidade de São Paulo. 122 pp. 2010.

GUEDES, E., LEITE, R.C.; PRATA, M.C.; PACHECO, R.C.; WALKER, D.H. LABRUNA, M.B. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, n.100, p.841-845, 2005.

GUEDES, E., LEITE, R.C. Dinâmica sazonal de estádios de vida livre de *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* (acarí: ixodidae) numa área endêmica para febre maculosa, na região de Coronel Pacheco, Minas Gerais. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, n.17, v.1, p.78-82, 2008.

HOOGSTRAAL, H., Ticks in relation to human diseases caused by Rickettsia species. **Annu Rev Entomol**, n.12, p.377-420, 1967.

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

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

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Minas Gerais - Juiz de Fora. Cidades. Disponível em:  
<<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/xtras/perfil.php?lang=&codmun=313670&search=minas-gerais|juiz-de-fora>>. Acesso em: 30 set. 2013.

LABRUNA, M. B. Ecology of rickettsia in South America, **Ann N Y Acad Sci**. n.1166, p.156-166, 2009.

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

LEMOS, E. R. S. Investigação sobre as rickettsioses: diagnóstico e avanços. In: **Consulta de especialistas OPAS/OMS sobre rickettsioses nas américas**. Ouro Preto, 53p., 2004.

LEMOS, E. R. S. Rickettsial diseases in Brazil. **Virus Rev. Res.**, n.7, p.7-16, 2002.

MATHER, T.N.; GINSBERG, H.S. Vector-Host-Pathogen relationships: transmission dynamics of tick-borne infections. In: Sonenshine, Mather (Ed.). **Ecological Dynamics of Tick-Borne Zoonoses**. Oxford University Press, New York. 447 pp. 1994.

MCDADE, J.E.; NEWHOUSE, V.F. Natural history of Rickettsia rickettsii. **Annu Rev Microbiol**, n.40, p. 287-309, 1986

MILAGRES, B.S.; PADILHA, A.F.; BARCELOS, R.M.; GOMES, G.G.; MONTANDON, C.E.; PENA, D.C.; NIERI-BASTOS, F.A.; SILVEIRA, I.; PACHECO, R.; LABRUNA, M.B.; BOUYER, D.H.; FREITAS, R.N.; WALKER, D.H.; MAFRA, C.L.; GALVÃO, M.A. Rickettsia in synanthropic and domestic animals and their hosts from two areas of low endemicity for Brazilian spotted fever in the eastern region of Minas Gerais, Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, n.83, p.1305-1307, 2010.

MILAGRES, B.S.; PADILHA, A.F.; MONTANDON, C.E.; FREITAS, R.N.; PACHECO, R.; WALKER, D.H.; LABRUNA, M.B.; MAFRA, C.L.; GALVÃO, M.A. Spotted fever group Rickettsia in small rodents from areas of low endemicity for Brazilian spotted fever in the eastern region of Minas Gerais State, Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, n.88, v.5, p.937-939, 2013.

MOURA-MARTINIANO, N.O.; MACHADO-FERREIRA, E.; CARDOSO, K.M.; GEHRKE, F.S.; AMORIM, M.; FOGAÇA, A.C.; SOARES, C.A.G.; GAZÊTA, G.S.; SCHUMAKER, T.T.S. Rickettsia and vector biodiversity of spotted fever focus, Atlantic rain forest biome, Brazil. **Emerg Infect Dis** [Internet]. 2014 Mar [date cited]. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2003.131013>

PACHECO, R.C.; MORAES-FILHO, J.; GUEDES, E.; SILVEIRA, I.; RICHTZENHAIN, L.J.; LEITE, R.C.; LABRUNA, M.B. Rickettsial infections of dogs, horses and ticks in Juiz de Fora, southeastern Brazil, and isolation of Rickettsia rickettsii from *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **Med Vet Entomol**, n.25, p.148-155, 2011.

PACHECO, R.C.; HORTA, M.C.; MORAES-FILHO, J.; ATALIBA, A.C.; PINTER, A.; LABRUNA, M.B. Rickettsial infection in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from São Paulo, Brazil: serological evidence for infection by *Rickettsia bellii* and *Rickettsia parkeri*. **Biomedica**, n.27, p.364-371, 2007.

PAROLA, P.; PADDOCK, C.D.; RAOULT, D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. **Clin Microbiol Rev**, n.18, p.719-756, 2005.

PEREZ, C. A.; ALMEIDA, A. F.; ALMEIDA, A.; CARVALHO, V. H. B.; BALESTRIN, D. C.; GUIMARÃES, M. S.; COSTA, J. C.; RAMOS, L. A.; ARRUDA-SANTOS, A. D.; MÁXIMO-ESPÍNDOLA, C. P.; BARROS-BATTESTI, E. D. Carrapatos do gênero *Amblyomma* spp. e suas relações com os hospedeiros em área endêmica para Febre Maculosa de São Paulo. **Rev. Bras. Parasitol. Vet**, n.17, p.210-217, 2008.

PHILLIP, R. N.; CASPER, E. A.; ORMSBEE, R. A.; PEACOCK, M. G.; BURGDORFER, W. Microimmunofluorescence test for the serological study of Rocky Mountain spotted fever and typhus. **J. Clin. Microbiol**, n.3, p.51-61, 1978.

PINTER, A.; HORTA; M.C.; PACHECO; R.C.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M.B. Serosurvey of *Rickettsia* spp. in dogs and humans from an endemic area for Brazilian spotted fever in the State of São Paulo, Brazil. **Cad Saúde Pública**, n.24, p.247-252, 2008.

PIRANDA, E.M.; FACCINI, J.L.; PINTER, A.; PACHECO, R.C.; CANÇADO, P.H.; LABRUNA, M.B. Experimental infection of *Rhipicephalus sanguineus* ticks with the bacterium *Rickettsia rickettsii*, using experimentally infected dogs. **Vector Borne Zoonotic Dis**, n.11, p.29-36, 2011.

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

RAOULT, D.; DASCH, G.A. Immunoblot cross-reactions among *Rickettsia*, *Proteus spp.* and *Legionella spp.* in patients with Mediterranean spotted fever. **FEMS Immunol Med, Microbiol**, n.11, p.13-18, 1995.

RAOULT, D.; ROUX, V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. **Clin Microbiol Rev**, n.10, p.694-719, 1997.

ROUX, V.; RAOULT, D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (OmpB). **Int J Syst Evol Microbiol**, n.50, p.1449-1455, 2000.

ROUX, V.; RYDKINA, E.; EREMEEVA, M.; RAOULT, D. Citrate Synthase Gene Comparison, a New Tool for Phylogenetic analysis, and its application for the Rickettsiae. **Intern. J. Syst. Bacteriol**, n.47, p.252-261, 1997.

RUDAKOV, N.V.; SHPYNOV, S.N.; SAMOILENKO, I.E.; TANKIBAE, M.A. Ecology and epidemiology of spotted fever group rickettsia and new data from their study in Russia and Kazakhstan. **Ann. N. Y. Acad. Sci**, n.990, p.12-24, 2003.

REGNERY, R. L.; SPRUILL, C. L.; PLIKAYTIS, B. D. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. **J Bacteriol**, n.173, p.1576-1589, 1991.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3th, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.

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

SCHRIEFER, M.E.; AZAD, A. Changing ecology of Rocky Mountain spotted Fever. In: SONENSHINE, D.E., Mather TN (Ed.). **Ecological Dynamics of tick-borne zoonoses**. 447p. 1994.

SOUZA, C.E. Vigilância soroepidemiologica em animais sentinelas. Secretaria de Estado da Saúde, São Paulo: 2013. Disponível em: [http://www.saude.sp.gov.br/resources/sucen/homepage/banner\\_central/arquivos-simposio/aulas/aulaspdf/celso-vigilanciasoroepidemiologicaemanimais sentinelas.pdf](http://www.saude.sp.gov.br/resources/sucen/homepage/banner_central/arquivos-simposio/aulas/aulaspdf/celso-vigilanciasoroepidemiologicaemanimais sentinelas.pdf) .Acesso em 01 abr 2014.

SOUZA, C.E.; MORAES-FILHO, J.; OGRZEWALSKA, M.; UCHOA, F.C.; HORTA, M.C.; SOUZA, S.S.; BORBA, R.C.; LABRUNA, M.B. Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. **Vet Parasitol**, n. 161, p. 116-21, 2009.

STOTHARD, D.R.; CLARK, J.B.; FUERST, P.A. Ancestral divergence of *Rickettsia bellii* from the spotted fever and typhus groups of *Rickettsia* and antiquity of the genus *Rickettsia*. **Int. J. Syst. Bacteriol**, n.44, p.798-804, 1994.

SZABÓ, M.P.; CUNHA, T.M.; PINTER, A.; VICENTINI, F. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. **Exp Appl Acarol**, n.25, p.909-916, 2001.

TEYSSEIRE, N.; RAOULT, D. Comparison of Western Immunoblotting and Microimmunofluorescence for Diagnosis of Mediterranean Spotted Fever. **J. Clin. Microbiol**, n.30, p.455-460, 1992.

VIANNA, M.C.; HORTA, M.C.; SANGIONI, L.A.; CORTEZ, A.; SOARES, R.M.; MAFRA, C.L.; GALVÃO, M.A.; LABRUNA M.B.; GENNARI, S.M. Rickettsial spotted fever in capoeirão village, Itabira, Minas Gerais, Brazil. **Rev Inst Med Trop**, n.50, p.297-301, 2008.