

**UNIVERSIDADE CATÓLICA DE SANTOS**

**MESTRADO EM SAÚDE COLETIVA**

**Pesquisa de *Rickettsia sp* e agentes causadores de erliquiose (*Anaplasmataceae*) em carrapatos colhidos em cães e domicílios nas áreas urbana e industrial no Município de Cubatão - Estado de São Paulo, 2011-2012.**

**MÔNICA LUZIA DE ARRUDA BOTELHO**

**SANTOS**

**2013**

# UNIVERSIDADE CATÓLICA DE SANTOS

## MESTRADO EM SAÚDE COLETIVA

**Pesquisa de *Rickettsia sp* e agentes causadores de erliquiose (*Anaplasmataceae*) em carrapatos colhidos em cães e domicílios nas áreas urbana e industrial no Município de Cubatão - Estado de São Paulo, 2011-2012.**

**MÔNICA LUZIA DE ARRUDA BOTELHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Saúde Coletiva da Universidade Católica de Santos, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Saúde Coletiva.

Área de Concentração: Epidemiologia das Doenças Infecciosas

Orientador: Prof. Dr. Marcos Montani Caseiro

**SANTOS**

**2013**

Dados Internacionais de Catalogação  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Católica de Santos  
SIBIU

---

B748p Botelho, Mônica Luzia de Arruda

Pesquisa de *Rickettsia sp* e agentes causadores de erliquiose (*Anaplasmataceae*) em carrapatos colhidos em cães e domicílios nas áreas urbana e industrial no Município de Cubatão – Estado de São Paulo, 2011-2012 / Mônica Luzia de Arruda Botelho; Orientador Marcos Montani Caseiro - Santos: [s.n.], 2013.

93 f; (Dissertação de Mestrado) – Universidade Católica de Santos, Programa de Mestrado em Saúde Coletiva.

1. Pesquisa. 2. Carrapatos. I. Caseiro, Marcos Montani (Orientador). II. Universidade Católica de Santos. III. Pesquisa de *Rickettsia sp* e agentes causadores de erliquiose (*Anaplasmataceae*) em carrapatos colhidos em cães e domicílios no Município de Cubatão – Estado de São Paulo, 2011-2012.

CDU 14(043.3)

---

Pesquisa de *Rickettsia sp* e agentes causadores de erliquiose (*Anaplasmataceae*) em carrapatos colhidos em cães e domicílios nas áreas urbana e industrial no Município de Cubatão - Estado de São Paulo, 2011-2012.

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Saúde Coletiva da Universidade Católica de Santos, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Saúde Coletiva.

Área de Concentração: Epidemiologia das doenças infecciosas.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Montani Caseiro.

#### BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Marcos Montani Caseiro - orientador

---

Prof. Dr. Luiz Albero Amador Pereira – Universidade Católica de Santos

---

Dr<sup>a</sup> Maria de Fátima Domingos – Superintendência de Controle de Endemias

Data de aprovação: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**SANTOS**

**2013**

Dedico este trabalho aos meus pais,

Horácio e Luzia (*in memoriam*).

## AGRADECIMENTOS

Quando se nasce com sede de conhecimento, mesmo o abismo não assusta, pois aprende-se que ao dar o primeiro passo a ponte aparece sob os pés.

Sei que meus pais gostariam muito de estar aqui para presenciar a concretização daquilo que eu sempre disse que realizaria. Sei também que eles nunca duvidaram da força (e da teimosia) desta filha obstinada. Pai e mãe, onde quer que estejam, ofereço este momento a vocês.

Junior, mais que irmãos temos sido grandes amigos. Sei que mesmo à distância você vai chorar de emoção junto comigo, sua irmã intelectual, como você diz.

Fabio, meu Lindo, meu amor, namorado e amigo, você é o porto seguro à minha espera após as batalhas cotidianas. Nesses dois anos você massageou meus pés, enxugou minhas lágrimas e deixou de fazer suas coisas para me ajudar. Nunca ninguém me admirou tanto, torceu por mim e se orgulhou das minhas conquistas. Você merece não três, como eu dizia, mas centenas de páginas de agradecimento.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcos Caseiro, por despertar em mim o gosto pela pesquisa e conduzir os trabalhos de modo seguro. Obrigada, Professor, por sua ajuda e principalmente por sua paciência. É um grande privilégio ser sua orientanda.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Sérgio Olavo Pinto da Costa, pelo papel decisivo que desempenhou para este projeto e para mim como mestrandia. Agradeço por sua paciência e gentileza, corrigindo meus textos até tarde, atrasando seu retorno ao lar.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida.

À minha mãe honorária, professora e exemplo do que eu quero ser quando crescer Rachel Franco de Souza, que acreditou em mim e abriu portas que eu julgava estarem trancadas.

À minha amiga Carmen Curti, anjo que aparece sempre que eu preciso. E não foram poucas as vezes em que eu precisei.

Sônia Fagundes Rosa, você faz aparições tão raras na minha vida! E quando aparece, é para dar uma força extra.

À bibliotecária Sheila, que sem nunca ter me visto confiou em mim, no momento em que eu era somente uma possível aluna. Devo a você muitos chocolates, que você sempre afirmou não querer, porque fez tudo de coração.

À bibliotecária Rosina, que gentilmente me ensinou a fazer a ficha catalográfica deste trabalho.

Nada disso teria sido possível se eu não tivesse o aval da Prefeitura Municipal de Cubatão. Agradeço à Secretaria Municipal de Saúde pela permissão para a realização desta pesquisa.

Minha eterna gratidão à Dra. Maria Adelaide Rocha Mendes Gonzalez, minha chefe, por sua paciência, pelas concessões, pelo apoio e pelo modo gentil com que sempre tratou este projeto.

À Professora Silvana Rocha, mestre em saúde coletiva, responsável pela correta identificação dos espécimes, dispondo dos seus sábados para me ajudar.

À Adriana Regina Stucchi Gimarães, técnica do laboratório do IPECI (Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas da Unisantos), por sua atenção e simpatia, facilitando a compra dos insumos.

A fase laboratorial deste projeto dependeu da parceria com o Laboratório de Biologia Molecular da Fundação Lusíada, onde o Prof. Dr. Dercy Sá Filho me recebeu de braços abertos. Obrigada por sua paciência, pelo aprendizado, pela sensação de ter conquistado um pouquinho de conhecimento numa área até então desconhecida para mim. Você merece todos os bolos de chocolate do mundo.

À Daniela Castro, funcionária do Laboratório da Unilus e na época também mestrande, que realizou os pedidos dos insumos, ajudou com as normas do trabalho e me confortou nos momentos de insegurança. Espero que

você realmente goste de bolo de chocolate, já que o seu chefe não escolhe outro sabor para comemorarmos.

Tenho que agradecer imensamente a todos os funcionários do Serviço de Controle de Zoonoses pela ajuda, compreensão e colaboração durante esses dois anos.

Ao colega Augusto César de Sousa Barreto, por sua amizade, por segurar as pontas me substituindo nos períodos de ausência e pela confiança de que este projeto servirá para valorizar o trabalho de todos nós.

Ao colega Caio Catalani de Barros, pelas observações técnicas que ajudaram a nortear este projeto.

À colega Flávia Claro Beltracchini pela amizade e por me levar à Casa da Luz quando minhas forças estavam no limite.

Ao colega Shinnosuke Koshio pelo empréstimo do material acerca dos mistérios do Excell na pesquisa em saúde.

À nossa pequena Estela Maris da Silva, pela ajuda na coleta dos carrapatos, sempre interessada nos “bichinhos”. Obrigada, Estelinha, minha coleta não teria sido a mesma sem você.

Ao Valdir Caetano de Menezes e à Vanessa Cristina Santos por sua dedicação diária.

Ao Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, que cedeu material imprescindível para esta pesquisa, se interessou pelo meu trabalho, abriu as portas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Universidade de São Paulo e me deixou à vontade, como se eu fosse sua orientanda.

À minha amiga-irmã Amália Regina Mar Barbieri, que me ajudou a treinar as técnicas moleculares, me levou ao VPS (Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Universidade de São Paulo) e intercedeu por mim quando necessário. Enfim, não tenho palavras para expressar minha gratidão.



Aos pesquisadores do VPS, principalmente o Herbert que me enviou seu projeto, dando-me um norte de como eu deveria elaborar o meu próprio texto.

Ao Thiaguinho “o maior taxonomista do Brasil”, pela ajuda na identificação do *Amblyomma ovale* e pela descontração no ambiente do laboratório.

Ao Xico Kamikase, por me permitir acompanhar suas extrações de DNA e PCR.

Ao João, por me ensinar a usar o gel de agarose pela primeira vez e à Fernanda, por esclarecer minhas dúvidas quanto às dosagens dos primers.

Aos colegas do mestrado, pela convivência feliz e descontraída nesses dois anos.

Não poderia deixar de mencionar especificamente minha querida Priscila Lorangeira Carvalho, que me auxiliou na confecção do meu primeiro pôster para um congresso, me ouviu e se tornou uma grande amiga, cuja família me acolheu para um lindo réveillon.

À Eliana Lima pela parceria em diversos seminários e estudos e por solicitar à sua mãe que orasse por mim no processo seletivo de bolsas, mesmo sendo também uma candidata. Eu, você e a Pri formamos mesmo um grande trio.

Às colegas que foram a Porto Alegre para o ABRASCÃO, no que significou para algumas de nós a viagem de formatura deste mestrado. Pela alegria, apoio no momento da apresentação do trabalho, pelas fotos (Maria José, nossa “fotógrafa”, obrigada por me proporcionar tantas risadas, tanta alegria). Oito mulheres pesquisadoras representando a Unisantos, isso deu o que falar!

À Fabiana Cuconato, pelo envio do texto e por me ajudar com a formatação do meu documento. E por ser essa pessoa doce e iluminada, querida por todos.

A todos os professores do programa de mestrado em saúde coletiva da Unisantos. Foram dois anos de intenso aprendizado, sempre de forma leve e descontraída.

Sou muito grata à Profa. Dra. Aylene Moraes Bousquat pelo estágio em docência e à Profa. Dra. Rosa Ferreiro Pinto pelas orientações acerca da qualificação.

Devo milhares de agradecimentos ao Romualdo Juliatto, responsável pelo NIG (Núcleo de Informação e Geoprocessamento de Cubatão), uma pessoa que me ajudou em absolutamente tudo que diz respeito aos mapas apresentados neste trabalho. Obrigada mesmo, Romualdo, por dispor do seu tempo para me ajudar, com simpatia e boa vontade.

Agradeço também ao Cesar Cunha Ferreira, que espacializou as amostras e forneceu o último mapa que faltava no trabalho.

Devo agradecimentos e também desculpas à Barbara Galvão e às funcionárias da Secretaria Acadêmica do Campus D. David Picão. Desculpem-me pelos momentos de nervosismo quando as coisas não davam certo.

Agradeço a compreensão e também me desculpo com as minhas amigas Vivian, Didi, Ana e Rosângela, pelo chá de sumiço e pelas vezes em que “dei bolo”, não podendo aceitar seus convites ou furando na hora “H”.

Tomara que eu não tenha deixado de mencionar ninguém, mas se por ventura algum nome não tiver sido lembrado por descuido ou esquecimento, aceite minhas desculpas e receba a minha gratidão.

Instituição e fonte financiadora: CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

## EPÍGRAFE

*É de conhecimento comum em ciência que só  
achamos o que procuramos e só procuramos o  
que sabemos.*

Dr. Luiz Jacintho da Silva

## RESUMO

BOTELHO, Mônica Luzia de Arruda. Pesquisa de *Rickettsia sp* e agentes causadores de erliquiose (*Anaplasmataceae*) em carrapatos colhidos em cães e domicílios nas áreas urbana e industrial no Município de Cubatão - Estado de São Paulo, 2011-2012. Santos, 2013, 93 p. Dissertação de Mestrado em Saúde Coletiva - UNISANTOS.

Durante o período compreendido entre agosto de 2011 e maio de 2012 foram identificados morfológicamente 828 espécimes de carrapatos, sendo 827 *Rhipicephalus sanguineus* e 01 *Amblyomma ovale*. Esse número de parasitos totaliza 100 amostras colhidas em ambientes infestados, bem como na superfície corporal de cães domiciliados e errantes no Município de Cubatão, observando-se os seguintes critérios: a) carrapatos colhidos em cães apreendidos ao canil do Serviço de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Cubatão; b) carrapatos colhidos em cães apresentados à consulta ambulatorial gratuita mantida pelo mesmo serviço; c) animais de propriedade de munícipes solicitantes de orientação técnica quanto à infestação de carrapatos nos domicílios e seus métodos de controle. Neste grupo foram incluídos também os parasitos encontrados no meio ambiente durante as visitas zoossanitárias às residências, com ou sem a presença de cães.

Foi separada uma amostra de conveniência composta de 26 carrapatos de acordo com os locais de origem dos animais. A investigação de patógenos (*Rickettsia sp*, Rickettsias do grupo da febre maculosa e *Ehrlichia sp*) nos carrapatos foi realizada por meio da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). Todos os carrapatos submetidos à extração de DNA e PCR mostraram-se negativos quanto à infecção por Rickettsias. Para *Ehrlichia sp* as mesmas amostras mostraram-se negativas para o gene *dsb* e seis amostras mostraram-se positivas para o gene *16S* (RNA ribossomal). Os resultados demonstram que existe positividade nesses espécimes para bactéria da família *Anaplasmataceae*, inclusive no único espécime de *Amblyomma ovale* coletado.

Conclui-se que, embora não tenha sido demonstrada positividade para *Rickettsia sp* na amostra examinada, o risco zoonótico para erliquiose deve ser avaliado. Estudos futuros em amostra mais abrangente poderão trazer mais informações acerca da possível presença de *Rickettsia sp* nos carrapatos infestantes dos cães domiciliados ou errantes no município.

**Palavras-chave:** Carrapatos; Cães; Rickettsias; Ehrlichia.

## ABSTRACT

BOTELHO, Mônica Luzia de Arruda. Research on *Rickettsia sp* and agents causing ehrlichiosis (*Anaplasmataceae*) in ticks found on dogs and in dwellings in the urban and industrial area of Cubatão, a city located in the state of São Paulo, Brazil, 2011-2012.

Santos, 2013, 93 p. Master Thesis in Public Health – UNISANTOS.

Between August 2011 and May 2012, 100 samples of ticks were collected from infected environments and domestic or stray dogs in the city of Cubatão, with a total amount of 828 specimens, 827 *Rhipicephalus sanguineus* and 01 *Amblyomma ovale*. The parasites were subdivided into three groups: a) collected from dogs taken to the city pound; b) collected from dogs in the city's veterinary clinic c) collected from dogs during a zoosanitary visit. In this group, parasites collected in infested homes were included.

A convenience sample of 26 ticks was separated according to the address of collection and the investigation of *Rickettsia sp*, spotted fever Rickettsias and the *Ehrlichia sp* group in these ticks was conducted by means of Polymerase Chain Reaction (PCR). All samples showed negative for *Rickettsia sp*. For *Ehrlichia sp* all samples were negative for the *dsb* gene and six samples showed positive for the 16S gene (RNA ribosomal). The results demonstrate positivity in these specimens for a bacteria from the *Anaplasmataceae* family, which was also present in the only specimen of *Amblyomma ovale* collected.

In conclusion, although no positivity was found for *Rickettsia sp*, the zoonotic risk for ehrlichiosis should be considered. Besides this, an increase in the sampling submitted to PCR could furnish more information concerning the risk of infection by *Rickettsia sp* in ticks in the city studied.

**Key words:** Ticks; Dogs; Rickettsias; Ehrlichia.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição temporal e geográfica dos municípios com casos confirmados de febre maculosa brasileira por ano, de acordo com município do Estado de São Paulo, no período de 1998 a 2012. ....	27
Figura 2 – Progressão da febre maculosa nos estados brasileiros, de acordo com o ano de notificação .....	28
Figura 3 – Características morfológicas de carrapatos da família Ixodidae .....	31
Figura 4 – Distribuição geográfica do <i>Amblyomma ovale</i> no Estado de S. Paulo ....	48
Figura 5 – Região Metropolitana da Baixada Santista. ....	54
Figura 6 – Localização geográfica do Município de Cubatão.....	54
Figura 7 – Cubatão: imagem de satélite da área urbana .....	56
Figura 8 – Distribuição espacial dos cães no Município de Cubatão segundo censo animal realizado em 2011.. ....	58
Figura 9 –. Distribuição espacial da coleta de carrapatos de acordo com as UEPEs no Município de Cubatão, 2011-2012.....	66
Figura 10 – Distribuição espacial dos locais de coleta dos carrapatos positivos para o gene 16S.....	67

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição dos espécimes nos cães segundo a presença de machos, fêmeas, ninfas e ambos. Cubatão, 2012.....64

Gráfico 2 - Resultados obtidos através de PCR na pesquisa para *Ehrlichia sp* (Gene 16S) segundo a presença de machos, fêmeas e ninfas. Cubatão, 2012.. .....68



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista de municípios com presença de <i>Amblyomma ovale</i> . Estado de São Paulo, 2011 .....	48
---------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Distribuição dos carrapatos segundo local de coleta e correspondência com as UEPEs no Município de Cubatão, 2012.....	65
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

% = por cento

° C = graus Celsius

® = marca registrada

CDHU = Companhia de Desenvolvimento Habitacional e Urbano do Estado de São Paulo

CVE = Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”

x = vezes

DNA = ácido desoxirribonucleico

DNTP = nucleotídeos trifosfato

DVS = Departamento de Vigilância em Saúde

EDTA = ácido etileno-diamino-tetracético

EG = erliquiose granulocítica

EM = erliquiose monocítica

et al. = e colaboradores

FMB = febre maculosa brasileira

FM = febre maculosa

g = grama

IPECI = Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas da Unisantos

Kcl = cloreto de potássio

Kg = quilograma

L = litro

Mg = magnésio

mg = miligrama

MgCl<sub>2</sub> = cloreto de magnésio

m = molar

µg = micrograma

mL = mililitro

$\mu\text{L}$  = microlitro

mm = milimolar

MS = Ministério da Saúde

ng = nanograma

pb = pares de bases

PESM = Parque Estadual da Serra do Mar

pH = potencial hidrogeniônico

PCR = reação em cadeia da polimerase

PMC = Prefeitura Municipal de Cubatão

Primer = oligonucleotídeo iniciador da pcr

RIFI = reação de imunofluorescência indireta

RMSF = Rocky Mountain spotted fever

SES = Secretaria de Estado da Saúde

SUCEN = Superintendência do Controle de Endemias

SVS = Secretaria de Vigilância em Saúde

Taq = thermus aquaticus

TE = tampão tris-edta

TBE = tris-borato-edta

TRIS = tris (hydroxymethyl) amino metano

u = unidade

UEPE = Unidade Espacial de Pesquisa Estatística

UNISANTOS = Universidade Católica de Santos

USP = Universidade de São Paulo

uv = ultravioleta

VPS = Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da  
Universidade de São Paulo

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	23
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	24
3.1. Objetivo Geral .....	24
3.2. Objetivo Específico.....	24
<b>4. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	24
4.1. Principais patógenos e moléstias transmitidas por carrapatos.....	29
4.2. Ciclo Biológico dos carrapatos .....	32
4.2.1. Ciclo de um hospedeiro.....	32
4.2.2. Ciclo de dois hospedeiros .....	33
4.2.3. Ciclo de três hospedeiros .....	33
4.3. O processo de alimentação.....	35
4.4. Carrapatos como vetores/reservatórios de doenças e sua importância para a saúde humana .....	37
4.5. O gênero <i>Rickettsia</i> e seus vetores.....	40
4.6. Agentes causadores de erliquiose e seus vetores .....	50
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	53
5.1. Localização da pesquisa .....	53
5.2. Coleta e identificação .....	56
5.3. Extração de DNA.....	59
5.4. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).....	59
5.4.1. Pesquisa de <i>Rickettsia sp</i> .....	59
5.4.2. Pesquisa de <i>Ehrlichia sp</i> .....	61
5.4.3. Leitura e análise dos produtos de PCR.....	63
<b>6. RESULTADOS</b> .....	63
6.1. Identificação das espécies de carrapatos e distribuição por bairros .....	63
6.2. Reação em Cadeia de Polimerase .....	66
<b>7. DISCUSSÃO</b> .....	69
<b>8. CONCLUSÕES</b> .....	79
<b>9. REFERÊNCIAS</b> .....	80
<b>ANEXO</b> .....	92

## 1. INTRODUÇÃO

Os registros mais antigos sobre a presença do carrapato datam de 1.500 A.C.: uma figura em uma tumba egípcia representando um animal semelhante à hiena com três protuberâncias no pavilhão auricular interno. Sua primeira denominação foi *Cynorhaestea*, citada por Homero por volta de 800 A.C. Em 355 A.C., Aristóteles em sua *Historia Animalium* referiu-se aos carrapatos, acreditando que sua origem fosse o capim. Na Antiga Grécia era chamado de Croton, semelhante à mamona e, pela mesma razão, foi denominado Ricinus na Antiga Roma. No ano 77, o carrapato foi citado como hematófago por Plínio em sua *Historia Naturalis* (GATTO BRITO et al., 2006).

Os carrapatos são ectoparasitos que pertencem ao filo Arthropoda, à ordem Acari e à classe Arachnida, de distribuição mundial, parasitando vertebrados terrestres, anfíbios, répteis, aves e mamíferos. Podem permanecer fixados à pele do hospedeiro por dias ou semanas, secretando uma saliva com propriedades anestésicas, anticoagulantes e de minimizar as reações de defesa do organismo no local de fixação. Durante o processo de alimentação os carrapatos podem transmitir microorganismos patogênicos juntamente com a saliva, que é considerada a rota primária pela qual os microorganismos são inoculados na corrente sanguínea dos hospedeiros (BALASHOV, 1972). A saliva possui substâncias vasoativas, que induzem a vasodilatação local, facilitando a ingestão de sangue. Alimentam-se principalmente de sangue (hematofagia), mas também de linfa e restos tissulares presentes na pele do hospedeiro (SUCEN/SES-SP, 2004). Isto se dá pela alta especialização desses artrópodes ao parasitismo por possuírem peças bucais adaptadas que perfuram e penetram na pele, a fim de obter o alimento (MASSARD; FONSECA, 2004). Dadas as particularidades de seus hábitos alimentares, constituem hoje o segundo grupo em importância como vetores de doenças infecciosas para animais e humanos, perdendo apenas para os insetos.

A importância desses parasitas sempre foi reconhecida na prática da medicina veterinária, vindo a assumir grande importância entre os infectologistas a partir da descoberta da transmissão por carrapatos de inúmeras doenças humanas de alta letalidade. Hoje uma gama extensa de doenças virais, bacterianas e

parasitárias transmitidas por carrapatos estão descritas nas mais diferentes regiões do mundo. No Brasil, entretanto, a importância das doenças humanas transmitidas por carrapatos, e mesmo a existência de algumas delas, ainda está por ser adequadamente dimensionada (SILVA, 2004).

## 2. JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos os animais de companhia assumiram grande importância nos lares brasileiros. Com a diminuição dos espaços e a verticalização das moradias a proximidade entre o animal e seus proprietários também se estreitou, trazendo intimidade e convivência.

No Município de Cubatão, grandes movimentos humanos vem ocorrendo desde a implantação de programas de reurbanização e recuperação socioambiental. Os animais de companhia foram, inevitavelmente, incluídos nesse processo, provocando situações que certamente deverão ser olhadas com grande interesse pelos profissionais inseridos nas diversas áreas da saúde coletiva.

Na prática ambulatorial veterinária os profissionais encontram alta prevalência de doenças transmitidas por carrapatos, sendo o diagnóstico clínico e sorológico de erliquiose o mais comum. A erliquiose é uma doença emergente no Brasil, com notificação de casos humanos confirmados somente nesta década, com o desenvolvimento de técnicas moleculares de diagnóstico (ANGERAMI, 2006).

A febre maculosa brasileira, ou febre do carrapato, é uma zoonose de difícil diagnóstico por ser confundida com outras doenças de fácil resolução, como a gripe, apresentando sinais iniciais inespecíficos (BARBIERI, 2012). Nos últimos anos houve notificação da doença em cidades litorâneas próximas a Cubatão, mas no local do presente estudo reina um grande silêncio epidemiológico (CVE/SES-SP, 2012).

O levantamento da fauna ixodídica e a investigação de patógenos de importância para a saúde humana (*Rickettsia sp* e agentes causadores de erliquiose) poderão lançar uma luz sobre o potencial zoonótico da convivência entre as espécies humana e canina no município pesquisado.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Realização de um levantamento das espécies de carrapatos presentes em cães no município de Cubatão e avaliação de patógenos que os infectam.

#### 3.2 Objetivo Específico

Investigar a presença de dois tipos de patógenos de importância para a saúde pública: *Rickettsia sp*, com ênfase nos patógenos do grupo da febre maculosa brasileira (doença grave, frequentemente negligenciada no Brasil) e agentes causadores de erliquiose (principalmente *Ehrlichia sp*) nas amostras de carrapatos colhidos em cães e ambientes infestados na área urbana do Município de Cubatão.

### 4. REVISÃO DE LITERATURA

Riquetsioses são doenças causadas por bactérias da família *Rickettsiaceae*. Muito embora diversas espécies patogênicas já tenham sido identificadas, a febre maculosa brasileira (FMB) e a febre das Montanhas Rochosas (FMR) são causadas principalmente por *Rickettsia rickettsii*. No Brasil a FMB figura como a riquetsiose de maior importância, sendo a única passível de notificação compulsória no país até o momento e a única sob vigilância epidemiológica melhor estruturada (CVE/SES-SP, 2011).

As riquetsioses são conhecidas desde o século 19. Em 1886, Theobald Smith descreveu a então denominada Texas Cattle Fever, hoje conhecida como babesiose. Alguns anos depois, entre 1889 e 1890, o próprio Smith, juntamente com Frederick Kilborne, demonstraram a transmissão da doença por carrapatos (SILVA, 2004). No início do século XX, os estudos de Ricketts nos EUA demonstraram a transmissão por carrapatos da febre maculosa das Montanhas Rochosas (Rocky Mountain spotted fever) que já ocorria desde o final do século 19 entre colonos trabalhadores em serrarias daquela região dos EUA (PEREZ, 2008). Atualmente é conhecida a ocorrência da febre maculosa em uma grande extensão das Américas,



incluindo o Canadá, Estados Unidos, México, Panamá, Costa Rica, Colômbia, Brasil e mais recentemente a Argentina (CVE/SES-SP, 2011).

No Brasil, a febre maculosa foi primeiramente registrada no ano de 1929 em São Paulo, em áreas de expansão urbana que hoje ocupam os bairros de Sumaré e Perdizes, sendo então denominada “Tifo Exantemático de São Paulo”, por José Toledo Piza (SES/SP, 2011). Na década de 1930, Otávio Magalhães a denominou “Tifo Exantemático Neotrópico” em Minas Gerais (SVS/MS, 2011). Anos mais tarde, entre 1970 e 1980, alguns focos foram notificados em periferias da Região Metropolitana de São Paulo (CVE/SES-SP) e mais recentemente no interior do estado, dentre outros, nos municípios de Campinas, Pedreira, Piracicaba, Jaguariúna, Santo Antonio da Posse, Araras, e de uma forma geral nas bacias dos rios Piracicaba, Jaguari e Atibaia (PEREZ, 2008), tornando-se endêmico nessa região a partir de 1985. A aparente reemergência da doença também foi observada em Minas Gerais, principalmente na região do Vale do Jequitinhonha nessa mesma época. Desde então observou-se um aumento no número de casos, expansão das áreas de transmissão, ocorrência da transmissão em áreas urbanas e, principalmente, manutenção de elevadas taxas de letalidade (CVE/SES-SP, 2011).

O carrapato da espécie *Amblyomma cajennense* é considerado o principal vetor da *Rickettsia rickettsii* e a febre maculosa tem se mostrado uma moléstia de difícil diagnóstico, sobretudo na sua fase inicial, mesmo entre médicos bastante experientes. Cerca de 80% dos indivíduos em estado avançado da doença evoluem para óbito. Dados epidemiológicos do Estado de São Paulo mostram uma crescente tendência de dispersão da doença; no período compreendido entre os anos de 1985 e 2006, 14 municípios concentravam mais de 82% dos casos confirmados de febre maculosa. Esses municípios fazem parte das regiões metropolitanas de grandes e prósperos centros urbanos como São Paulo e Campinas e representam ao redor de 45% do PIB do estado mais rico da federação (PEREZ, 2008).

Somente na região de Campinas foram registrados, entre os anos de 1985 e 2000, um total de 47 casos de febre maculosa, período no qual as taxas de letalidade foram de 80% no ano de 1986 e 100% nos anos de 1988, 1989 e 1995 (LIMA et al., 2003).

Na Baixada Santista, ente 1998 e 2012, tivemos a ocorrência de cinco casos, sendo notificados um caso em Praia Grande e um caso no Guarujá no ano de 2005 e três casos em Peruíbe em 2009 (CVE/SES-SP, 2012).

A partir de 1996 o Estado de São Paulo tomou a iniciativa de propor um sistema de vigilância por meio de notificação compulsória de pessoas com quadro clínico ou óbitos de febre maculosa, devendo ser informada a suspeita pelo meio mais rápido disponível para registro e ações em áreas infestadas por *A. cajennense* e *A. aureolatum* e que apresentassem riscos para febre maculosa. Em outros estados do nordeste, sudeste e sul do Brasil também têm sido notificados casos de febre maculosa, com notificações na Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo, e Santa Catarina. No Brasil, tornou-se doença de notificação compulsória a partir de 2001 (SVS/MS, 2011).

Na **Figura 1** podemos observar a evolução dos casos da doença no Estado de São Paulo a partir de 1998.

**Figura 1.** Distribuição temporal e geográfica dos municípios com casos confirmados de febre maculosa brasileira por ano, de acordo com município do Estado de São Paulo, no período de 1998 a 2012.

1998



2000



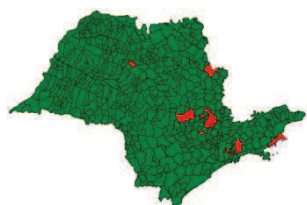
2002



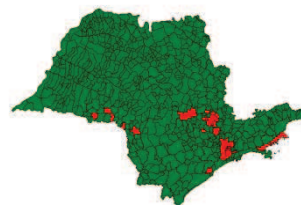
2004



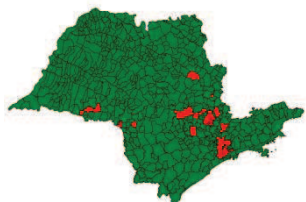
2006



2008



2010



2012

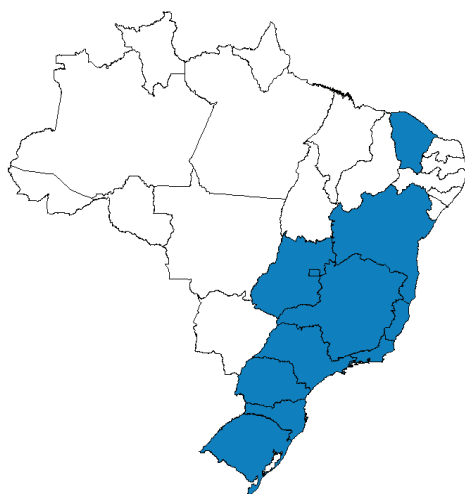


**Fonte:** SINANW, SINAN NET, Divisão de Zoonoses (CVE/CCD/SES-SP). Dados provisórios atualizados em outubro de 2012.

Nos últimos anos, o interesse pelo carrapato como transmissor de agentes infecciosos tem crescido. O surgimento da doença de Lyme (uma borreliose) nos EUA foi fator preponderante. A doença de Lyme mostrou que, mesmo numa região altamente desenvolvida como o nordeste dos EUA, doenças transmitidas por carrapatos podem representar um significativo problema de saúde pública. O número de agentes infecciosos descritos como transmitidos por carrapatos cresceu significativamente nos últimos anos (SILVA, 2004).

As doenças transmitidas por carrapatos conhecidas atualmente formam um conjunto extenso. Ao contrário do que se pensava, essas doenças não são circunscritas a determinadas regiões, ainda que sejam caracteristicamente focais, mas tem sido reconhecidas em praticamente qualquer lugar onde tenham sido pesquisadas.

**Figura 2.** Progressão da febre maculosa nos estados brasileiros, de acordo com o ano de notificação.



SP: 1929  
MG: década de 30  
RJ: 1981  
ES: 2000  
SC: 2003  
DF: 2005  
PR: 2005  
RS: 2005  
BA: 2007  
CE: 2010  
GO: 2010

**Fonte:** Sinan/SVS/MS. Dados atualizados até março de 2011.

#### 4.1 Principais patógenos e moléstias transmitidas por carrapatos

Doenças de etiologia viral: encefalite transmitida por carrapatos; febre hemorrágica do Congo-Criméia; febre hemorrágica de Omsk; febre transmitida por carrapatos do Colorado; encefalite de Powassan; encefalite Langat; encefalite Louping ill.

Doenças de etiologia bacteriana: Bacilos Gram-negativos – tularemia; Ehrlichias – erliquiose monocítica e erliquiose granulocítica; Rickettsias – febres maculosas; Borrélias – doença de Lyme e febre recorrente transmitida por carrapatos.

Doenças causadas por protozoários: babesiose (SUCEN/SES-SP, 2004).

Os carrapatos possuem extraordinária capacidade de agirem como vetores de doenças entre os animais domésticos, selvagens, aves e o homem, pelas seguintes características biológicas (FONSECA, 2000):

- a) hematofagismo em todas as fases evolutivas, o que aumenta a eficácia como vetor;
- b) fixação profunda nos hospedeiros, propiciando dificuldade de remoção e facilitando a dispersão por aves e mamíferos;
- c) ingurgitamento lento, propiciando tempo para adquirir e inocular patógenos;
- d) adaptação a diferentes hospedeiros, possibilitando veiculação de patógenos entre diferentes espécies;
- e) longevidade dos estágios no ambiente, propiciando tempo para a multiplicação dos patógenos;
- f) transmissão transovariana, permitindo sucessivas gerações com potencial de transmitir e funcionar como eficientes reservatórios;
- g) poucos inimigos naturais, pela eficiente adaptação ao ambiente tropical;
- h) grande esclerotização, propiciando resistência à adversidade climática;
- i) grande potencial biótico, possibilitando a perpetuação da espécie.

Carrapatos são mais do que simples vetores de doenças. Agem como reservatórios, transmitindo a infecção para a sua progênie, por via transovariana.

São os principais vetores de doenças animais e perdem apenas para os mosquitos como vetores de doenças humanas.

As doenças transmitidas por carrapatos são geralmente focais, uma vez que a sua mobilidade é restrita, salvo quando transportados por vertebrados rurais ou silvestres, uma vez que a capacidade de adaptação de algumas espécies de carrapatos ao meio urbano é limitada. Por outro lado, pela maior resistência ao meio externo, grande longevidade e pela capacidade de transmissão transovariana, a manutenção da transmissão da doença se faz por períodos indefinidos, até porque o controle das populações de carrapatos é extremamente difícil (LABRUNA et al., 2011).

As doenças transmitidas por carrapatos não ocorrem em surtos ou epidemias de rápida progressão, uma vez que estes são ectoparasitos eventuais de humanos e geralmente alimentam-se de sangue apenas uma vez a cada estágio. Comparados aos vetores alados, como mosquitos e outros dípteros, os carrapatos se deslocam relativamente pouco e a maioria das doenças transmitidas por carrapatos não tem transmissão inter-humana, não podendo prescindir dos reservatórios para manter os focos naturais em atividade. Em função disto, as doenças transmitidas por carrapatos geralmente não determinam epidemias ou mesmo surtos de maior intensidade, sendo sua ocorrência geralmente focal e esporádica, o que pode explicar a negligência com que geralmente são olhadas.

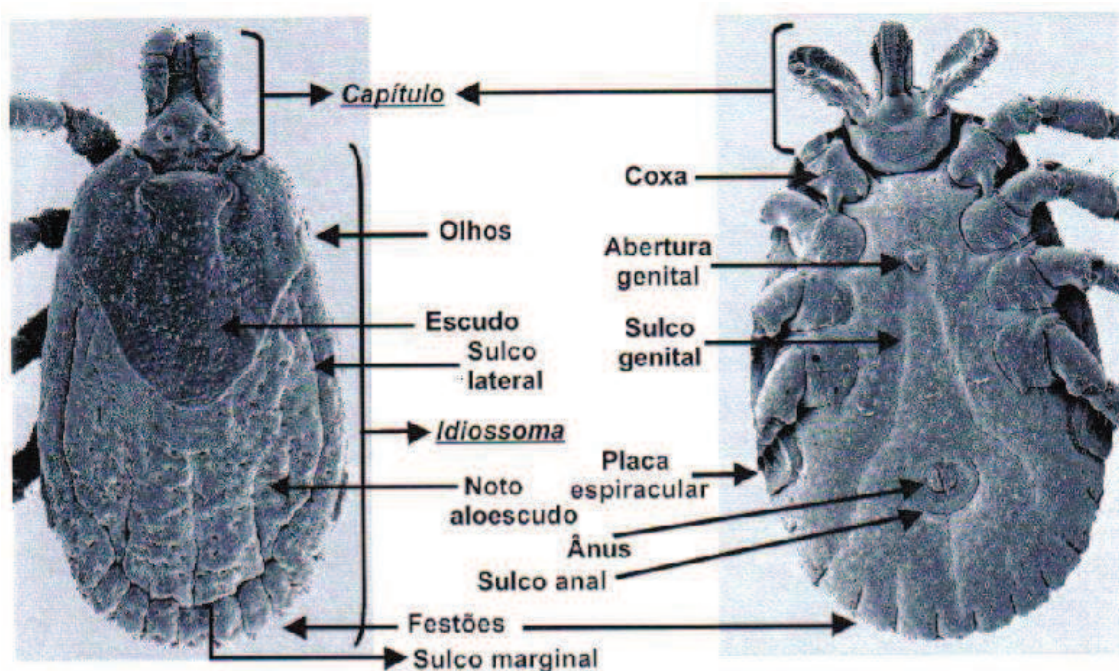
Além de atuar como vetores de doenças, os carrapatos podem exercer por si só diversos efeitos deletérios no organismo do hospedeiro, que vão desde a anemia ocasionada por uma infestação maciça à inoculação de toxinas neurotrópicas que causam paralisia ascendente, eventualmente fatal. Obviamente, tais efeitos variam conforme a espécie de carrapato e a área geográfica (SILVA, 2004).

Cerca de 90% das espécies de carrapatos parasitam exclusivamente animais silvestres. As demais podem ser encontradas parasitando os animais domésticos e os seres humanos. Grande parte das pesquisas tem sido dirigida a carrapatos de maior importância econômica. Por outro lado, o conhecimento das espécies parasitas de animais silvestres torna-se relevante, já que muitas delas participam diretamente na manutenção enzoótica de patógenos na natureza. Além disso, a história mostra que algumas dessas espécies, antes confinadas ao ambiente silvestre, são hoje vetores de zoonoses emergentes (SUCEN/SES-SP, 2004).



A família *Argasidae* apresenta, na atualidade, 183 espécies descritas e inclui os carrapatos moles, assim denominados devido à ausência de escudo quitinoso. São representados pelos carrapatos que parasitam aves, morcegos e os “carrapatos de chão”. A família de maior importância, tanto em saúde pública quanto em explorações pecuárias é a *Ixodidae*, cujos membros são denominados “carrapatos duros”. São assim denominados devido à presença de um rígido escudo quitinoso que cobre toda a superfície dorsal dos machos e parcialmente nas fêmeas, larvas e ninfas, estendendo-se apenas em uma pequena área do idiossoma, permitindo assim a dilatação do abdômen após o repasto sanguíneo (BARROS-BATTESTI, 2006). A família *Ixodidae* possui aproximadamente 680 espécies descritas. Os carrapatos dessa família apresentam acentuado dimorfismo sexual e capítulo sempre terminal em todos os estágios.

**Figura 3.** Características morfológicas de carrapatos da família *Ixodidae* ( Barros-Battesti et al., 2006).



**Fonte:** Martins (2006, slide 5). In: MANUAL EMBRAPA “Bio-Ecologia, importância médico-veterinária e controle de carrapatos, com ênfase no carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.”

Ectoparasitas obrigatórios de vertebrados, os carrapatos necessitam de alimentação sanguínea para completar seu desenvolvimento e possuem um ciclo de vida complexo, apresentando uma fase parasitária de alimentação sanguínea e

outra de vida livre (período de oviposição e entre mudas), podendo haver ou não mudança de hospedeiro.

## 4.2. Ciclo biológico dos carrapatos

O ciclo biológico dos ixodídeos consiste de um estágio inativo (ovos) e três estágios móveis e hematófagos (larva, ninfa e adulto). As larvas não apresentam estigmas respiratórios, são imaturas sexualmente e possuem três pares de pernas. Ao saírem do ovo apresentam aspecto semelhante aos adultos e após alimentação sofrem ecdise e passam a ninfas, também imaturas sexualmente, porém com placas espiraculares e quatro pares de pernas. Assim como as larvas, após alimentação também sofrem ecdise, e dão origem aos adultos, machos e fêmeas. Cada estágio requer vários dias de fixação no hospedeiro e longos repastos sanguíneos.

O ciclo biológico dos carrapatos duros pode, de acordo com a espécie, envolver um, dois ou três hospedeiros durante seu desenvolvimento (GATTO BRITO et al., 2006)

### 4.2.1 Ciclo de um hospedeiro

O ciclo biológico de um hospedeiro tem como representantes no Brasil as espécies *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (carrapato dos bovinos) e *Anocentor nitens* (carrapato-da-orelha-do-cavalo). Neste ciclo biológico, todos os estágios parasitam grandes animais como os bovinos, caprinos, veados e cavalos. A alimentação larval e ninfal, assim como as mudas, ocorrem sobre o hospedeiro e as fêmeas acasaladas e ingurgitadas caem ao solo e depositam seus ovos. Nos climas tropicais úmidos o ciclo ocorre durante todo o ano, sem a interrupção causada pela hipobiose das larvas, determinada pelas baixas temperaturas, comum em climas temperados. Geralmente o ciclo biológico dos carrapatos de um hospedeiro é curto, e no caso de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, a espécie consegue produzir de cinco a seis gerações anuais sob as condições climáticas favoráveis em termos de umidade e calor (GATTO BRITO et al., 2006).



#### 4.2.2 Ciclo de dois hospedeiros

É verificado em algumas espécies de *Hyalomma* (geograficamente encontrados na África, Ásia e região mediterrânea da Europa) que vivem em savanas e estepes onde a estação seca é longa e com poucas chuvas. A larva alimentada não cai ao solo, permanecendo no hospedeiro, as ninfas ingurgitadas caem ao solo e mudam para o estágio adulto, quando então buscam um segundo hospedeiro. As fêmeas ingurgitadas caem ao solo para realizar a oviposição, morrendo em seguida.

#### 4.2.3 Ciclo de três hospedeiros

Os carrapatos trioxenos precisam de três hospedeiros para completar a fase parasitária, ou seja, um para a larva, um para a ninfa e outro para o estágio adulto. De modo geral, os estágios de larva e ninfa são os que apresentam menor especificidade parasitária, podendo parasitar diferentes espécies, desde aves até mamíferos de diferentes tamanhos. Já o estágio adulto apresenta maior especificidade parasitária, restrita a apenas algumas espécies. Tal comportamento faz dos carrapatos trioxenos os de maior importância na transmissão de patógenos na natureza, pois o fato de parasitarem diferentes espécies de vertebrados facilita o intercâmbio de agentes causadores de doenças entre os hospedeiros. Dada a menor especificidade parasitária das larvas e ninfas, estes são os principais estágios que parasitam os seres humanos (SUCEN/SES-SP, 2004). As principais espécies que apresentam este ciclo encontradas no Brasil são *Ixodes*, *Amblyomma*, *Haemaphysalis sp* e *Rhipicephalus sanguineus* (GATTO BRITO et al., 2006).

Um exemplo clássico de carrapato trioxeno é a espécie *A. cajennense*. Larvas e ninfas desta espécie podem parasitar várias espécies de mamíferos, inclusive humanos e também as aves. O estágio adulto é mais específico de grandes mamíferos tais como equinos, antas e capivaras e, eventualmente, quando as populações deste carrapato se apresentam muito numerosas, é que o estágio adulto irá parasitar outros mamíferos inclusive humanos. No caso dos carrapatos trioxenos, tanto as larvas, como as ninfas e adultos são estágios de resistência no ambiente, já que terão uma sobrevivência dependente das reservas energéticas adquiridas do estágio anterior do ciclo de vida (SUCEN/SES-SP, 2004).

O adulto é o estágio que por mais tempo consegue sobreviver sem que encontre um hospedeiro, seguido pela ninfa, e por último, a larva, que apresenta a menor sobrevivência em jejum. De modo geral, os adultos de *Amblyomma sp* podem sobreviver em jejum, sob condições naturais, por 12 a 24 meses, a ninfa por até 12 meses, e as larvas ao redor de 6 meses (SUCEN/SES-SP, 2004; SZABÓ, 2008).

O encontro dos carrapatos com o hospedeiro se dá ao acaso, pois, se comparados aos insetos, os carrapatos movem-se muito pouco, percorrendo distâncias muito curtas e normalmente não procuram ativamente o hospedeiro. No ambiente, larvas e ninfas de *Amblyomma sp* congregam-se aos milhares, em espaços reduzidos formando aglomerados na ponta de folhas de gramíneas ou em galhos secos (PEREZ, 2008).

Em muitas regiões ocorre infestação humana maciça por carrapatos pela popularidade que vem adquirindo a prática de esportes rurais, caminhadas ecológicas e outras atividades que incentivam o estreitamento do contato do homem com a natureza (SZABÓ, 2008). As condições climáticas e a latitude representam os principais fatores reguladores do ciclo biológico dos carrapatos, e neste caso a temperatura exerce um papel dominante, regulando a duração das fases de vida livre dos carrapatos. A latitude influencia o fotoperíodo exercendo influência direta sobre a indução de diapausa, promovendo a sazonalidade e permitindo que os carrapatos sincronizem suas atividades biológicas com as condições climáticas ótimas para seu desenvolvimento e manutenção no ambiente.

Em regiões de clima tropical ou equatorial admite-se, desde que as condições climáticas sejam convenientes (temperaturas entre 20 e 28° C, umidade relativa acima de 75% e presença de precipitação) a presença de carrapatos durante todos os meses do ano, uma vez que a distribuição de carrapatos é regida principalmente pela temperatura e pelas chuvas, com exceção das espécies de *Hyalomma*, que necessitam de um índice pluviométrico anual superior a 600 mm para a sobrevivência da maioria das espécies do gênero em ambientes tropicais (GATTO BRITO et al., 2006)

Em condições naturais, a estabilidade do microclima das pastagens depende de certos fatores como a quantidade de forragem ou resíduos de plantas e a espécie da gramínea (cultivada ou nativa). Os diversos gêneros de carrapatos têm diferentes limites de temperatura e umidade dentro dos quais são ativos e se nutrem, sendo sua distribuição determinada por estes limites. De um modo geral, os carrapatos

são mais ativos durante a estação de temperaturas mais elevadas, como ocorre no verão, desde que, as chuvas sejam suficientes para proporcionar a umidade necessária ao desenvolvimento embrionário e a viabilidade das larvas.

Em algumas espécies, os estágios larvais e ninfais também são ativos em clima mais ameno, predominante no inverno, e isto afeta a duração e a escolha da época dos programas de controle para a espécie de carrapato alvo que se pretende controlar (GATTO BRITO et al., 2006; PINTER, 2008). A espécie *Amblyomma cajennense* completa uma geração por ano e apresenta os três estágios parasitários marcadamente distribuídos ao longo desse período, com ocorrência de larvas entre os meses de abril a julho; ninfas de julho a outubro e adultos de outubro a março (PEREZ, 2008).

Carrapatos da família *Ixodidae* possuem altas taxas de reprodução e podem ser transportados por longas distâncias por meio de seus hospedeiros e a fauna silvestre participa de forma decisiva nesta dispersão. Tal característica transforma os carrapatos em indivíduos com capacidade de se disseminar em diversos ecossistemas, mesmo que devido às exigências ambientais da espécie sobrevivam em pequenas parcelas dos mesmos. O sudeste brasileiro, por suas características socioeconômicas e ambientais, tem se transformado num habitat altamente favorável para a reprodução do carrapato-estrela (PEREZ, 2008, PINTER, 2008).

### **4.3 O processo de alimentação**

É crucial para qualquer parasita hematófago que os vasos sanguíneos do sítio de expoliação continuem fornecendo sangue não coagulado para o aparelho sugador. A injúria vascular desencadeia o processo natural de hemostasia, o qual consiste na tríade coagulação, agregação plaquetária e vasoconstrição. A hemostasia se inicia dentro de alguns segundos, os mecanismos de cicatrização induzem a formação de crosta já no dia da injúria e persistem por vários dias. Além disso, o sistema imune pode contribuir com respostas celulares e humorais que podem vir a modificar o sítio de expoliação do carrapato em um hospedeiro previamente exposto. Tais respostas imunes podem ser imediatas (como em reações antígeno/anticorpo/complemento) ou levar horas para ocorrer, como nas reações celulares que requeiram a formação de infiltrado leucocítico.

Os componentes básicos do aparelho bucal dos carrapatos são: base do capítulo, palpos, hipostômio, quelíceras, faringe e glândulas salivares. O hipostômio é uma peça ventral em cuja face inferior estão implantados dentículos retrógrados, que exercem importante função na fixação. As quelíceras podem exercer movimentos de extensão e flexão, através de seus músculos e tendões, constituindo a peça que produz as lacerações nos tecidos do hospedeiro. Os palpos tem função sensorial e provavelmente quimiorreceptora. A faringe possui constituição muscular e exerce a função de sucção. As glândulas salivares estão localizadas dentro do idiossoma. Anatomicamente, as glândulas salivares são compostas por quatro tipos de ácinos, sendo eles o I, o II o III e o IV (somente machos possuem o tipo IV), os quais são interligados por um sistema de dutos, que deságuam em um divertículo na cavidade oral (FONSECA, 2000).

O aparelho bucal do carrapato penetra profundamente na pele do hospedeiro, permanecendo fixado através do hipostômio e pela solidificação da secreção salivar. Ao provocar laceração dos tecidos e vasos sanguíneos, o carrapato ingere sangue e outros líquidos tissulares dos hospedeiros e regurgita grandes volumes de saliva, principal via de inoculação de patógenos. No processo de alimentação, os carrapatos provocam a dilaceração dos tecidos, a espoliação pela hematofagia e a inoculação de substâncias de alto peso molecular pela saliva, as quais podem promover reações alérgicas.

No processo de fixação, o hipostômio penetra lentamente, como consequência da ação combinada entre as quelíceras e a saliva. A digestão dos tecidos ao redor do canal de penetração causa ruptura dos capilares e vasos linfáticos. Os carrapatos se alimentam por sucção, alternada com a eliminação de saliva, sendo que o maior volume de saliva é secretado no final do processo de ingurgitamento (BALASHOV, 1972). Após a introdução do hipostômio na pele do hospedeiro, ocorre o processo de solidificação da saliva, formando uma lâmina hialina concêntrica, rica em lipoproteínas e glicoproteínas. Segundo Kaufman (1989) a saliva é o principal componente responsável pela fixação dos carrapatos que possuem aparelho bucal curto, a exemplo das espécies dos gêneros *Boophilus*, *Ixodes*, *Rhipicephalus* e *Anocentor*. Na região lesada podem ser encontrados tecido amorfo necrótico, células cutâneas e componentes do sangue. A região fica circundada por uma zona edematosa e a estrutura celular normal desaparece gradualmente com o extravasamento de sangue resultante da ruptura de vasos.

Embora a capacidade de ingestão de sangue varie consideravelmente, as peças bucais das larvas, ninfas e adultos penetram na pele dos hospedeiros na mesma profundidade. A extensão da lesão aumenta marcadamente em cada estágio, estando este fenômeno intimamente relacionado com a lise dos tecidos do hospedeiro (MOORHOUSE; TATCHELL, 1996). A saliva contém quinases, que catalisam a bradicinina, o que explica em parte a ausência de dor. As prostaglandinas presentes na saliva inibem a produção de interleucina 1 e a migração de macrófagos (MASSARD; FONSECA, 2004).

Os avanços tecnológicos dos últimos anos abriram uma gama sem precedentes de novas possibilidades, no que diz respeito à identificação de componentes salivares dos carrapatos. A partir das técnicas de transcriptoma e proteoma pode-se chegar a três grandes surpresas: a primeira delas foi a descoberta de que a saliva tem uma complexidade muito maior do que antes se supunha, tendo centenas de diferentes proteínas, muitas das quais desconhecidas até então, uma vez que não apresentam similaridades com outras proteínas em grandes bases de dados, tais como a base de dados do The National Center for Biotechnology Information (NCBI). Outra surpresa é que as proteínas mais abundantes na saliva dos carrapatos são membros de famílias multigênicas. Para algumas dessas famílias de proteínas sabe-se que são expressadas diferentemente à medida que progride o processo de alimentação, portanto no último dia de exploração o carrapato estará produzindo um tipo diferente dessa família de proteínas, em relação ao primeiro dia, podendo inclusive evitar a resposta imune do hospedeiro. A terceira surpresa (e a mais desafiadora) é que não é possível prevermos de maneira alguma a função da grande maioria das proteínas salivares. De fato, para cada espécie de carrapato com transcriptoma conhecido, menos de 5% das proteínas foram expressas e suas funções verificadas. Famílias protéicas inteiras ainda aguardam pela identificação funcional (FRANCISCHETTI et al., 2010).

#### **4.4 Carrapatos como vetores/reservatórios de doenças e sua importância para a saúde humana**

Em território brasileiro o *Amblyomma cajennense* é vulgarmente conhecido como “carrapato estrela”. As formas adultas recebem ainda as denominações de “rodoleiro” em muitas regiões do país, “picaço” no sul de Minas Gerais e “carrapato

rodolego", em Sergipe. As larvas ou as ninfas desses carrapatos são denominadas popularmente de "micuim", "carrapato pólvora", "carrapato-fogo", "carrapato meio-chumbo" e "carrapatinho". Vários animais domésticos e ampla diversidade de espécies silvestres (entre mamíferos e aves) podem albergar algum estágio parasitário deste carrapato (BARCI, 2006).

O homem se infecta com os agentes patogênicos após ter sido picado pelo carrapato, ou seja, quando acidentalmente passa a integrar o ciclo endêmico patógeno-carrapato-reservatório silvestre (SZABÓ, 2008).

Vale ressaltar que para que haja a transmissão da febre maculosa através da picada por carrapatos, estes devem permanecer fixados à pele do hospedeiro por um período de 4 a 6 horas, tempo necessário para uma possível reativação da *R. rickettsii* na glândula salivar do carrapato (BARCI, 2006).

As capivaras, reconhecidas como reservatórios naturais do agente causal da febre maculosa no nosso meio, quando confinadas podem sofrer infestações maciças pela espécie *A. cajennense*. Esses animais, assim como provavelmente alguns outros grupos de mamíferos silvestres em condições naturais, são reservatórios transitórios das bactérias, adquirindo resistência duradoura após período parasitêmico variável entre alguns dias e poucas semanas. Se os carrapatos não tiverem a possibilidade de se reinfectar periodicamente, a concentração da bactéria nesses artrópodes infectados tende ao desaparecimento após algumas gerações (PEREZ, 2008).

Os casos de febre maculosa em humanos estão diretamente relacionados à superpopulação de *A. cajennense*, pois quanto maior a população desse carrapato, mais intensamente o homem será infestado e maior a chance de um carrapato infectado picá-lo. Em regiões onde a população de *A. cajennense* está sob controle natural ou artificial, o homem é menos infestado pelo carrapato, facilitando a retirada dos ectoparasitas do corpo antes que a bactéria seja transmitida e diminuindo drasticamente as chances de desenvolver a doença. Daí a importância das criações de equinos e capivaras na epidemiologia da febre maculosa. Essas espécies animais são essenciais para o desenvolvimento dos adultos do *A. cajennense* que, ao contrário das outras fases, se alimenta com sucesso em poucos mamíferos. Assim, quanto maior a densidade populacional desses animais, maior a disponibilidade de hospedeiros para a fase adulta do ectoparasita, fator primordial

para o aumento exponencial da população do carrapato (BARCI, 2006; PEREZ, 2008).

Uma característica importante deste ectoparasito é a sua longevidade no ambiente, onde, em condições favoráveis, pode sobreviver por mais de um ano sem se alimentar, constituindo assim uma fonte prolongada de infecção. As populações de carrapatos, assim como da maioria das outras populações do reino animal, sofreram profundas modificações em decorrência das alterações globais dos últimos séculos. Estima-se que estas alterações favoreceram cerca de 10% das espécies de carrapatos. Estas espécies expandiram-se pela difusão e expansão de seus hospedeiros ou de hospedeiros alternativos ou ainda pela criação ou aumento de ambientes favoráveis. Esta nova situação criou novas relações carrapato-hospedeiro-ambiente e novos fluxos de microorganismos. Os microorganismos patogênicos albergados em novas espécies de carrapatos e seus hospedeiros levaram ao surgimento de novas enfermidades ou acentuaram aquelas restritas a determinados nichos ecológicos. Recentemente foram descritas na América do Sul diversas novas espécies de *Rickettsias*. Como muitas *Rickettsias* são encontradas em nichos selvagens, alterações ambientais poderão eliminá-las ou, acidentalmente, favorecê-las fazendo surgir novas enfermidades (SZABÓ, 2008).

Pesquisas tem revelado uma grande variedade de organismos transmitidos por carrapatos, sendo transferidos pela picada, pelos excrementos, pelo líquido coxal (em *Argasidae*) ou mesmo pela ingestão de carrapatos infectados. Em alguns casos funcionam como transmissores mecânicos ou simples transportadores. Dentre as modalidades de transmissão ocorrem situações diversificadas e os agentes patogênicos podem proliferar no organismo dos vetores, podendo ainda ocorrer um desenvolvimento cíclico através dos diferentes estádios evolutivos. Os carrapatos *Amblyomma cajennense* são os grandes responsáveis pela manutenção da *R. rickettsii* na natureza, pois ocorre transmissão transovariana (transmissão para ovos e larvas) e transestadial (transmissão do patógeno, a partir das larvas, para ninfas e destas para os adultos). Esta característica biológica permite ao carrapato permanecer infectado durante toda a sua vida e também por muitas gerações após uma infecção primária. Portanto, além de vetores, os carrapatos são verdadeiros reservatórios da bactéria, uma vez que todas as fases evolutivas, no ambiente, são potencialmente capazes de permanecer infectadas meses ou anos à espera do hospedeiro, garantido um foco endêmico prolongado (BARCI, 2006).



No Brasil, ainda que a importância do carrapato na medicina veterinária tenha recebido bastante atenção há várias décadas, seu papel na saúde pública humana tem sido desconsiderado. Até recentemente, a única doença humana transmitida por carrapato conhecida era a febre maculosa brasileira (SILVA, 2006).

Afora a febre maculosa brasileira, a descrição de doenças humanas transmitidas por carrapatos é esporádica e pontual. A babesiose e a erliquiose são conhecidas pelos veterinários, mas sobre casos humanos há apenas algumas descrições, de modo que a distribuição e incidência dessas infecções, assim como das borrelioses, são praticamente desconhecidas no Brasil (SILVA, 2004).

#### 4.5 O gênero *Rickettsia* e seus vetores

A família *Rickettsiaceae* congrega bactérias gram-negativas, aeróbicas e intracelulares obrigatórias (OLANO, 2005; SAHNI; RYDKINA, 2009), que se multiplicam por fissão binária e estão associadas a vetores invertebrados (BIBERSTEIN; HIRSH, 2003; RAOULT; ROUX, 1997). Em seres humanos, causam as doenças conhecidas como tifo endêmico, tifo epidêmico e febre maculosa, sendo somente a febre maculosa considerada importante para carnívoros (BIBERSTEIN; HIRSH, 2003; GREENE, 2006).

*Rickettsia rickettsii* é a bactéria causadora de uma grave riquetsiose em humanos, chamada no Brasil de febre maculosa brasileira (FMB) ou febre do carrapato. Na Colômbia, Panamá, México e Costa Rica esta mesma doença recebe o nome de “fiebre manchada” e nos Estados Unidos é conhecida como “Rocky Mountain spotted fever” (febre maculosa das Montanhas Rochosas). *R. rickettsii* é encontrada multiplicando-se exclusivamente em células endoteliais de humanos, de alguns animais e em células de diferentes tecidos de algumas espécies de ixodídeos, os quais são vetores da doença (WEISS; MOULDER, 1984).

A febre maculosa brasileira (FMB) é uma importante zoonose causada pela bactéria *Rickettsia rickettsii*, transmitida ao homem e animais por diferentes espécies de carrapatos. *R. rickettsii* integra, juntamente com várias outras espécies de *Rickettsia*, o chamado grupo da febre maculosa (GFM).

As bactérias do gênero *Rickettsia* foram divididas classicamente em três grupos, baseando-se em padrões antigênicos, moleculares e ecológicos: 1) grupo do



tifo, composto pela *Rickettsia prowazekii* e *Rickettsia typhi*, cujos principais vetores são insetos (piochos e pulgas, respectivamente); 2) grupo da febre maculosa (GFM), que apresenta pouco mais de 20 espécies válidas distribuídas em todos os continentes do mundo, exceto na Antártica e a transmissão da maioria está associada a carrapatos, com exceção da *Rickettsia felis* e *Rickettsia akari*, transmitidas por pulgas e ácaros, respectivamente; 3) grupo ancestral (GA), do qual fazem parte outras espécies de rickettsias, tais como, *Rickettsia bellii* e *Rickettsia canadensis* (SILVA, 2006).

A grande maioria das espécies do GFM está associada à transmissão por carrapatos. Entre as espécies de *Rickettsia* do GFM, algumas são comprovadamente patogênicas para humanos, outras comprovadamente não o são, e algumas ainda são de patogenicidade desconhecida (PINTER, 2008). No Brasil, os primeiros casos de febre maculosa foram descritos no final da década de 1920 em São Paulo e início da década de 1930 em Minas Gerais. As pesquisas para determinar qual artrópode seria o vetor da FMB começaram no início da década de 1930, quando Lemos-Monteiro, Fonseca e Prado (1932), demonstraram pela primeira vez que o carrapato *Amblyomma cajennense* podia se infectar experimentalmente com o agente causador da doença, quando alimentado em uma cobaia doente, experimentalmente infectada. Foi Gomes (1933) que pela primeira vez encontrou um carrapato naturalmente infectado, na Cidade de São Paulo, um exemplar da espécie *Amblyomma aureolatum* que parasitava um cão de uma área endêmica. Philip e colaboradores (1978) publicaram, pela primeira vez, a confirmação de que o agente causador da febre maculosa brasileira era de fato a *R. rickettsii*, através da técnica de sorotipagem por microimunofluorescência, enquanto que a confirmação genotípica de um isolado brasileiro somente foi publicado em 2004 por Pinter e Labruna. Este isolado foi obtido a partir de um carrapato *A. aureolatum* naturalmente infectado e a cepa recebeu o nome de Taiapu, em referência ao local de origem do carrapato, o distrito de Taiapupeba no Município de Mogi das Cruzes, SP (PINTER, 2008).

O carrapato *A. cajennense* já foi encontrado naturalmente infectado em Minas Gerais, embora não tenha havido isolamento da bactéria (GUEDES et al., 2005). Em 2009 Cunha e colaboradores, por meio de técnicas moleculares, identificaram pela primeira vez a infecção natural por *Rickettsia rickettsii* em

carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus*, o carrapato vermelho do cão, uma espécie considerada até recentemente não transmissora de doenças para a espécie humana. Outras espécies de Rickettsias foram isoladas no Brasil na primeira década deste século.

As Rickettsias patogênicas constituem um grupo de microrganismos responsáveis por várias doenças conhecidas como riquetsioses, que são transmitidas ao homem por meio da picada de artrópodes hematófagos, tais como carrapato, pulga e piolho (ALMOSNY, 2002).

Atualmente existem 22 espécies de Rickettsias que comprovadamente causam infecções no homem (*Rickettsia rickettsii*, *R. prowazekii*, *R. typhi*, *R. conorii* subsp. *conorii*, *R. conorii* subsp. *israelensis*, *R. conorii* subsp. *caspia*, *R. conorii* subsp. *indica*, *R. sibirica* subsp. *sibirica*, *R. sibirica* subsp. *mongolotimonae*, *R. heilogjiangensis*, *R. slovacica*, *R. marmionii*, *R. raoutii*, *R. africae*, *R. parkeri*, *R. australis*, *R. honei*, *R. japonica*, *R. massiliae*, *R. aeschlimannii*, *R. akari* e *R. felis*) (MERHEJ; RAOULT, 2011).

Casos humanos de infecção por bactérias do gênero *Rickettsia* tem sido descritos em vários países da América do Sul nos últimos vinte anos. O Brasil apresenta histórico de doença riquetsial desde a década de 20, sendo a febre maculosa brasileira a mais severa das riquetsioses descritas, ocorrendo principalmente no Sudeste do país. Em Minas Gerais tem-se registrado, desde a década de 80, a ocorrência de inúmeros casos da doença na forma de epidemias em áreas rurais e periurbanas, com predominância nos Vales do Jequitinhonha, do Mucuri e do Rio Doce (GALVÃO, 1996). A introdução de técnicas da biologia molecular na investigação de doenças riquetsiais tem assumido grande importância na detecção de várias espécies do gênero *Rickettsia* em vetores, humanos e animais, permitindo a caracterização de espécies já conhecidas como a *R. rickettsii* e outras recentemente reconhecidas como a *R. felis*. Em 2002, casos humanos de riquetsiose causada por *R. felis* foram descritos no Estado de Minas Gerais, sendo este agente detectado por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) em pulgas do gênero *Ctenocephalides*, que infestam rotineiramente cães e gatos (OLIVEIRA et al., 2002).

A ocorrência de pulgas do gênero *Ctenocephalides* infectadas com *R. felis*, detectadas por meio de PCR, constitui evidência de que a *R. felis* pode ser uma

espécie de importância epidemiológica na região estudada, indicando uma possibilidade de surgimento de outras riquetsioses humanas na região, além de atestar a potencialidade das pulgas como vetores na transmissão das riquetsioses (CARDOSO et al., 2006).

A *Rickettsia sp* ataca as células que revestem os vasos sanguíneos, ocasionando graves distúrbios circulatórios no organismo. As lesões vasculares disseminadas constituem a base fisiopatológica do quadro clínico: edema, aumento do volume extracelular com conseqüente hipotensão, necrose local e distúrbios da coagulação (coagulação intravascular disseminada). Ocorre infarto de vasos sanguíneos, com subsequente isquemia cerebral, principalmente no mesencéfalo e nas regiões dos núcleos e, menos frequentemente, no coração. No fígado, pode haver lesão perivascular, com degeneração gordurosa dos hepatócitos. As alterações renais consistem de lesões vasculares intersticiais focais, acometendo poucos néfrons (HORTA, 2002).

No homem o período de incubação varia de 2 a 14 dias. A sintomatologia inicia-se com febre cefaléia, mialgia, náuseas e vômitos. Entre o 3º e 4º dia surgem as manifestações cutâneas como máculas, pápulas róseo- avermelhadas, predominando nos membros e irradiando para palmas, solas e tronco. Nos casos graves, com o desenvolvimento da doença, as pápulas vão se tornando hemorrágicas. Alguns casos evoluem gravemente, ocorrendo a morte dos tecidos nas áreas de sufusões hemorrágicas em função da vasculite generalizada (SVS/MS, 2011).

A febre maculosa por *R. rickettsii* é relatada no Brasil desde os anos 20 e a letalidade em casos não tratados com antibióticos específicos pode chegar a mais de 80% (GALVÃO, 2002). No Estado de São Paulo, a letalidade está ao redor de 35-40% nos últimos 20 anos. Angerami e colaboradores (2006), em estudo retrospectivo, avaliaram os principais sinais clínicos de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da UNICAMP em Campinas-SP, com diagnóstico confirmado de febre maculosa por *R. rickettsii*. Os mesmos autores observaram que 100% dos pacientes apresentaram febre e sinais gerais como mialgia, cefaléia, vômito e dor abdominal em 80%, 60%, 42% e 32% dos pacientes, respectivamente. A sintomatologia mais severa estava associada a casos fatais, incluindo icterícia (52%), acometimento do sistema nervoso central (43%), dificuldades respiratórias

(37%), insuficiência renal (35,3%) e diferentes graus de hemorragia em 69,5% dos pacientes.

Gripe, febre amarela, febre tifóide, dengue, enteroviroses, caxumba, rubéola, sarampo, hepatites, leptospirose, malária, meningites e meningoencefalites tanto virais como bacterianas, meningococemia, Doença de Lyme e muitas outras enfermidades fazem parte de uma extensa lista de diagnósticos diferenciais, acentuando a importância do diagnóstico precoce (SVS/MS, 2011).

As espécies vetoras de *R. rickettsii* para humanos, conhecidas até o momento, são: *Dermacentor andersoni*, *Dermacentor variabilis* e *Rhipicephalus sanguineus* nos Estados Unidos (DEMMA et al., 2005), *R. sanguineus* e *Amblyomma cajennense* no México (BUSTAMANTE; VARELA, 1947), *A. cajennense* no Panamá, Colômbia e Argentina (PATINO-CAMARGO, 1941; RODANICHE, 1953; PADDOCK et al., 2008), e *A. cajennense* e *Amblyomma aureolatum* no Brasil (GUEDES et al., 2005; PINTER ; LABRUNA, 2006).

A febre maculosa brasileira (FMB) teve aumento contínuo dos casos ao longo dos anos, sendo atualmente considerada uma importante doença reemergente (LABRUNA, 2009). Foram notificados no país entre 1997 e 2011 um total de 968 casos, sendo 737 somente na região sudeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Alguns animais silvestres são reservatórios (hospedeiros amplificadores) dessas bactérias, como os roedores silvestres nos Estados Unidos e capivaras e gambás no Brasil (LABRUNA, 2009). Em canídeos silvestres há relatos sorológicos de infecção por *Rickettsia* em coiotes (*Canis latrans*) na Coreia (CAMER; LIM, 2008) e em coiotes e raccoons (*Nyctereutes procyonoides koreensis*) em Nebraska (BISCHOF; ROGERS, 2005).

Os seguintes recursos podem ser utilizados para o diagnóstico da febre maculosa:

- sangue/coágulo sanguíneo – para isolamento e PCR;
- soro – para imunofluorescência indireta (IFI): títulos de anticorpos superiores a 1:64 em amostra única ou diferença de 4 vezes em amostra pareada, com intervalo de 14 a 21 dias. Anticorpos são detectados a partir do 5º até o 7º dia de doença;

- tecidos – para imunohistoquímica (IHQ) - em tecidos, coágulos ou vetores é confirmada quando apresenta reação positiva para antígenos rickettsiais;
- carrapatos – taxonomia, IFI e isolamento do agente.

Importante: Ausência de reação imunohistoquímica não descarta a enfermidade (SVS/MS, 2011).

Outras espécies do gênero *Amblyomma* também tem sido estudadas quanto à infecção por Rickettsias. Amostras de *Rickettsia bellii* foram isoladas de *Amblyomma dubitatum*, (LABRUNA et al., 2004a), de *Amblyomma scalpturatum* (LABRUNA et al., 2004c), de *A. aureolatum* (PINTER; LABRUNA, 2006), de *Haemaphysalis juxtakochi* (LABRUNA et al., 2007a) e de *Ixodes loricatus* (HORTA et al., 2007). A espécie *Rickettsia amblyommii* foi isolada a partir de carrapatos *A. cajennense* (LABRUNA et al., 2004c). A espécie *Rickettsia parkeri* foi isolada a partir de carrapatos *Amblyomma triste* (SILVEIRA, 2007) e *Amblyomma ovale* (SABATINI, 2010; MEDEIROS et al. 2011; BARBIERI, 2012). A espécie *R. rhipicephali* foi isolada a partir de carrapatos *Haemaphysalis juxtakochi* (LABRUNA et al., 2007a).

Há evidências moleculares para a ocorrência de outras espécies de Rickettsias. Em carrapatos *Amblyomma longirostre* foi detectada uma espécie de Rickettsia geneticamente próxima de *R. amblyommii* (LABRUNA et al., 2004b). Em *A. dubitatum* foi detectada uma espécie próxima de *R. parkeri* (LABRUNA et al., 2004a) e em carrapatos *H. juxtakochi* foi detectada uma Rickettsia próxima de *R. rhipicephali* (LABRUNA et al., 2007a). De modo geral, as espécies de Rickettsias associadas a carrapatos são transmitidas entre gerações por transmissão transovariana e perpetuam transestadialmente, fazendo dos carrapatos importantes reservatórios da Rickettsia na natureza.

Para muitas espécies de Rickettsia (ex. *Rickettsia africae*, *R. rhipicephali*), este mecanismo de sobrevivência na população de carrapato é tão eficiente que possivelmente garante, por si só, a manutenção da Rickettsia na natureza. Para outras espécies de Rickettsias, tal como *R. rickettsii*, este mecanismo é menos eficiente, pois a infecção por esta espécie de Rickettsia no carrapato pode diminuir a capacidade reprodutiva de fêmeas adultas, podendo ser inclusive letal para o ixodídeo (BURGDORFER, 1988; NIEBYLSKI, PEACOCK, SCHWAN, 1999). Portanto, mesmo que os mecanismos de transmissão transovariana e perpetuação

transestadial sejam extremamente importantes para a sobrevivência de *R. rickettsii* na natureza, por si só não devem ser suficientes para a manutenção da bactéria. Neste caso, os animais vertebrados, hospedeiros naturais dos carrapatos vetores da *R. rickettsii*, devem assumir um papel fundamental na amplificação da infecção por *R. rickettsii* na população de carrapatos (COOKSEY et al., 1990; RANDOLPH, 1998).

Diante desta premissa, pesquisadores das Américas do Norte e do Sul vem buscando, desde o início do século XX, encontrar animais silvestres naturalmente infectados por *R. rickettsii*, a fim de compreender melhor a ecologia da febre maculosa. No Brasil, onde os carrapatos *A. cajennense* e *A. aureolatum* são os principais vetores da febre maculosa, os animais vertebrados amplificadores da *R. rickettsii* apontados como amplificadores são as capivaras e os gambás (PINTER, 2008).

A ocorrência da febre maculosa brasileira está relacionada à distribuição dos vetores. Enquanto nas regiões de floresta pluvial atlântica montanhosa o vetor incriminado tem sido o *Amblyomma aureolatum*, nas demais regiões com predomínio ou transição com o cerrado, ou áreas de mata totalmente degradadas, a transmissão tem sido relacionada ao carrapato *Amblyomma cajennense*. O carrapato *A. aureolatum* está distribuído em algumas regiões do sudeste e sul do Brasil (GUGLIELMONE et al., 2003). É um carrapato associado a áreas de mata fechada com alto índice de umidade e de temperaturas amenas. Esta espécie de carrapato tem sido reportada, no estágio adulto, parasitando carnívoros, tendo como hospedeiros primários conhecidos o cachorro-do-mato e o cão doméstico (GUGLIELMONE et al., 2003; PINTER, et al., 2004; LABRUNA et al., 2005b).

As fases imaturas estão relacionadas ao parasitismo de aves passeriformes e pequenos roedores, com relatos importantes sobre *sabiás* (*Turdos sp*) e sobre o roedor *Euryzomatomys spinosus* (VENZAL et al., 2005; ARZUA et al., 2003; FONSECA, 1936). Rodrigues e colaboradores (2002) e Pinter e colaboradores (2004) estudaram a capacidade do carrapato *A. aureolatum* parasitar animais de laboratório e os resultados apontam que aves e roedores cávides são ótimos hospedeiros para as fases imaturas. Entre os prováveis hospedeiros para as fases imaturas do *A. aureolatum*, o preá (*C. aperea aperea*) já foi apontado como um possível amplificador da *R. rickettsii* no Brasil por Travassos e Vallejo-Freire (1942). Esta informação foi reforçada por Vallejo-Freire (1947), que demonstrou que a



cobaia (*C. aperea porcellus*), quando infectada experimentalmente com o agente da FMB, atua como fonte de infecção para o carrapato *A. aureolatum*. Por outro lado, não há registro na literatura brasileira sobre o papel representado pelas aves na história natural da FMB (PINTER, 2008).

Nos Estados Unidos, algumas espécies de aves que foram experimentalmente infectadas por *R. rickettsii* desenvolveram um quadro de riquetsemia por cerca de 10 dias, sem qualquer sintoma clínico, indicando-as como um potencial amplificador da bactéria na natureza para as espécies de carrapatos que parasitam aves em pelo menos um de seus estágios de vida (LUNDGREN et al., 1966). O parasitismo em seres humanos por *A. aureolatum* foi relatado apenas para o estágio adulto e se trata de um evento raro, sendo provável que a maioria dos casos de parasitismo humano esteja relacionada a carrapatos que primeiramente estavam parasitando cães ou gatos e se transferiram para o ser humano.

É importante salientar que esta espécie de carrapato não se estabelece no intra ou peridomicílio, é uma espécie de carrapato de baixa valência ecológica, necessitando completar o ciclo no interior de áreas de mata. Isto leva a um modelo de transmissão muito distinto do aceito para o carrapato *A. cajennense*, que por sua vez, apresenta baixa especificidade parasitária e pode se alimentar em diversas espécies de aves e mamíferos. Esta espécie é muito beneficiada pela ação antrópica de destruição de habitat e pela agropecuária que beneficia animais domésticos, como o cavalo, e culturas agrícolas, como a cana-de-açúcar, que beneficiam a proliferação de capivaras (PINTER, 2008).

Outra espécie de carrapato, o *Amblyomma ovale*, é encontrado na Floresta Atlântica submontanhosa e litorânea. Esse carrapato é vetor competente da bactéria *Rickettsia parkeri*, que é um agente patogênico para o humano, embora menos virulento que a *R. rickettsii*. Está presente em vasto território, que vai do México até a Argentina (GUGLIELMONE et al., 2006). Sabe-se que o estágio adulto desta espécie tem como hospedeiros preferenciais carnívoros de diversas espécies da região neotropical (LABRUNA et al., 2005), dentre eles o cão doméstico.

Praticamente todos os municípios da Grande São Paulo e do litoral paulista já relataram a presença de *Amblyomma ovale* (CVE/SES-SP, 2011). Para melhor compreensão, foram dispostos os municípios na **Tabela 1:**

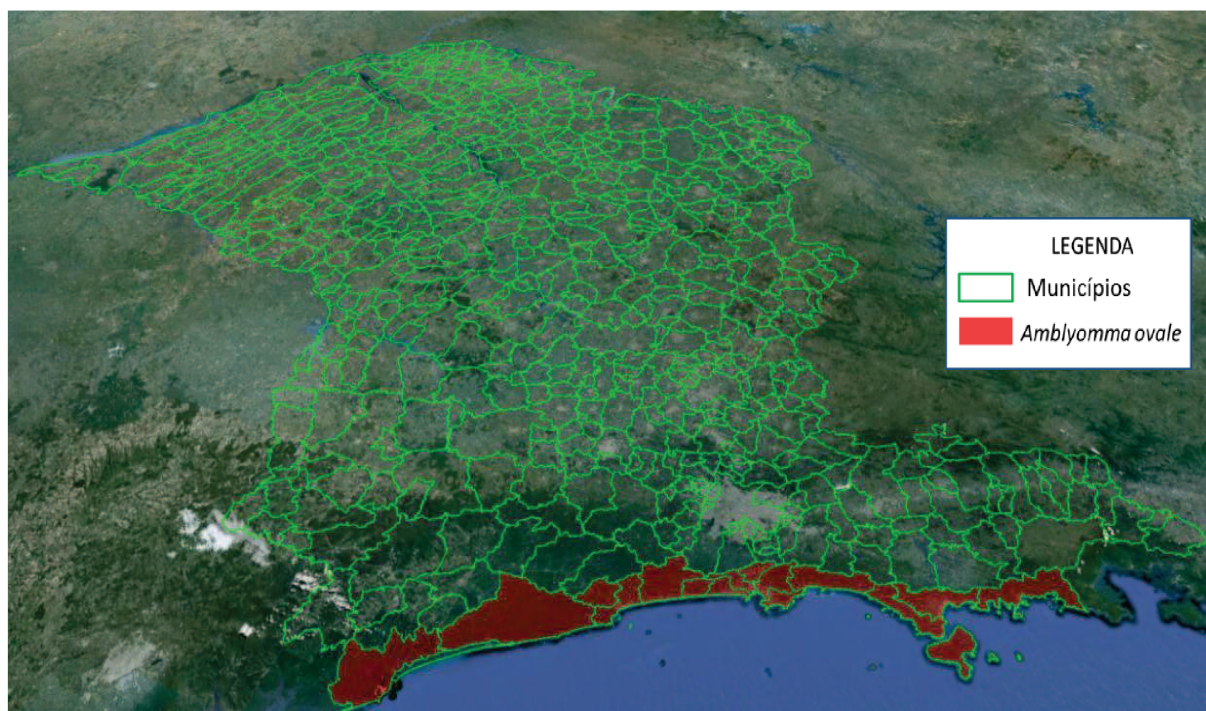
**Tabela 1.** Lista de municípios com presença de *Amblyomma ovale*. Estado de São Paulo, 2011.

Bertioga	Itariri
Cananéia	Mongaguá
Caraguatatuba	Peruíbe
Cubatão	Praia Grande
Guarujá	Santos
Iguape	São Sebastião
Ilhabela	São Vicente
Itanhaém	Ubatuba

**Fonte:** SUCEN/SES-SP dados atualizados em julho de 2011.

Os mesmos municípios podem ser melhor visualizados no mapa abaixo:

**Figura 4:** Distribuição geográfica do *Amblyomma ovale* no Estado de São Paulo.



**Fonte:** SUCEN/SES-SP. Dados atualizados em julho de 2011. NIG – DVS/PMC.

A troca de hospedeiros durante o parasitismo não é um comportamento comum para os carrapatos da família Ixodidae, mas sabe-se que os carrapatos



machos podem permanecer sobre o hospedeiro durante muitas semanas e que se movimentam intensamente sobre o animal à procura de fêmeas (GLADNEY; DRUMMOND, 1970). Este comportamento pode ocasionar o desprendimento acidental do carrapato de um cão parasitado, o que o faria procurar um novo hospedeiro, possibilitando a migração do carrapato do cão para o homem.

Para o carrapato *A. cajennense*, a transmissão está associada a um comportamento onde o ser humano é parasitado quando se desloca para áreas onde carrapatos em estágios imaturos são encontrados na vegetação, estando geralmente presente em populações super numerosas, fruto de desequilíbrio causado pela abundância de alguns de seus hospedeiros primários. Os relatos de parasitismo humano são muito frequentes, principalmente nos meses frios do ano e na ordem de dezenas a centenas de carrapatos. Já a transmissão da FMB pelo *A. aureolatum* e pelo *A. ovale* é reportada em localidades adjacentes a retalhos de mata onde são encontrados cães ou gatos errantes que adentram essas áreas. Barbieri (2012) relata infestação por *A. ovale* e *A. aureolatum* em cães domiciliados que adentram a Mata Atlântica em companhia ou não seus proprietários em estudo realizado em Santa Catarina.

A prevenção da FMB transmitida pelo *A. aureolatum* está relacionada ao controle de cães não domiciliados que têm acesso a áreas de mata. Da mesma forma, o controle da febre maculosa brasileira transmitida por *Amblyomma ovale* está calcado na posse responsável de cães domésticos (CVE/SES-SP, 2011). Estratégias baseadas na reclusão dos animais e utilização de carrapaticidas de longa ação são as únicas armas disponíveis.

Já a prevenção e o controle de FMB transmitida pelo *A. cajennense* estão relacionados ao controle da população de carrapatos, o que normalmente é feito conduzindo-se ações carrapaticidas sobre os hospedeiros primários, assim como o manejo do ambiente, como o roçado, para torná-lo inóspito às fases imaturas desta espécie (PINTER, 2008).

Em Cubatão, SABATINI (2010) realizou pesquisa de carrapatos e Rickettsias nas trilhas do Parque Estadual da Serra do Mar, encontrando treze espécies de carrapatos.

#### 4.6 Agentes causadores de erliquiose e seus vetores

A terminologia “erliquiose” é uma descrição não específica usada para caracterizar a doença causada pela infecção por bactérias pertencentes à família *Anaplasmataceae*. Membros da família *Anaplasmataceae* são bactérias intracelulares obrigatórias, localizadas em vacúolos citoplasmáticos de monócitos, granulócitos e plaquetas de hospedeiros vertebrados humanos e animais (MACHADO, 2006).

A família *Anaplasmataceae* contém quatro gêneros: *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Wolbachia* e *Neorickettsia* (DUMLER et al., 2001). Até o momento, pelo menos cinco agentes da família *Anaplasmataceae* foram descritos infectando humanos, incluindo *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum* e *Neorickettsia sennetsu* (PACHECO, 2008).

O gênero *Ehrlichia sp* pertence à tribo *Ehrlichieae*, família *Rickettsiaceae*, ordem *Rickettsiales*. São bactérias gram-negativas, pequenas, esféricas (cocos), de vida intracelular obrigatória (DUMLER et al., 2001), transmitidas por carrapatos.

No interior dos leucócitos, as *Ehrlichias* se multiplicam, formando estruturas características em aglomerados, denominadas mórulas, visíveis ao microscópio óptico. A taxonomia das *Ehrlichias* já foi assunto de grande controvérsia. A partir de 2001, com base na similaridade da sequência de nucleotídeos do gene 16S do RNA ribossomal (RNAr), Dumler e colaboradores sugeriram a reclassificação de toda a família *Anaplasmataceae*.

Após a reclassificação as bactérias do gênero *Ehrlichia*, por similaridades genéticas, foram divididas em três genogrupos: Genogrupo “I” constituído pelas espécies *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. ruminantium* (antiga *Cowdria ruminantium*); Genogrupo “II” que inclui *E. phagocytophila*, *E. equi* e *Anaplasma phagocytophilum* (agente da Ehrliquiose granulocítica humana); Genogrupo “III”, constituído pela *E. sennetsu* e *E. risticii* (SKOTARCZAK, 2003).

No Brasil, são relatadas as espécies *E. canis* e *E. chaffeensis* (ALMOSNY, 1998; MACHADO et al., 2006; LABRUNA et al., 2007b), sendo a *E. canis* de maior prevalência nos cães (ALMOSNY, 1998; TRAPP et al., 2006; AGUIAR et al., 2007), frequentemente encontrada no vetor *Rhipicephalus sanguineus* (AGUIAR et al., 2007; SOUZA et al., 2010).

Essas bactérias podem causar duas doenças distintas: a erliquiose monocítica (EM) e a ehrliquiose granulocítica (EG), acometendo tanto cães quanto humanos (SKOTARCZAK, 2003). A *E. ewingii* está associada à EG tanto em cães como em humanos (SKOTARCZAK, 2003).

As diversas espécies da família *Anaplasmataceae* causam várias doenças em animais e seres humanos, tendo sido reconhecidas inicialmente em 1910, quando Theiler descreveu o *Anaplasma marginale*, agente etiológico da anaplasmose em bovinos.

Em 1925, Cowdry descreveu o agente *Cowdria ruminantium*. Posteriormente, em 1935 foi descrita a *Rickettsia canis* em cães na Argélia, espécie reclassificada em 1945 como *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard, 1935), sendo estabelecido o Gênero *Ehrlichia* em 1945, em homenagem ao microbiologista alemão Paul Ehrlich. Em 1940, foi descrita a *Ehrlichia phagocytophila*. Outras espécies de *Ehrlichia* foram descritas posteriormente.

Ainda que infecções por bactérias do gênero *Ehrlichia sp* sejam conhecidas há muito tempo na medicina veterinária, os primeiros casos humanos somente foram reconhecidos em 1987 (SILVA, 2004).

Nos Estados Unidos a doença era praticamente desconhecida, mesmo no meio veterinário, até a Guerra do Vietnã. Cães utilizados para fins militares desenvolveram uma pancitopenia por *Ehrlichia canis*, de longe a mais conhecida das espécies de *Ehrlichia*. Somente nos anos 1980 os primeiros casos humanos de erliquiose ocorreram naquele país, demonstrando a importância desse gênero para a saúde humana (PREZIOSI; COHN, 2002).

De acordo com pesquisas sorológicas, *E. canis* pode infectar canídeos silvestres, tais como a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*) (FISHMAN et al., 2004), sendo que nos Estados Unidos, estes animais são considerados possíveis reservatórios dessas bactérias (GREENE, 2006). Em infecção experimental com *E. chaffeensis*, a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*) foi susceptível a esse agente, enquanto a raposa cinzenta (*Urocyon cinereoargenteus*) foi refratária a infecção (DAVIDSON et al., 1999). Outra espécie de *Ehrlichia* que tem como reservatório animais silvestres é a *E. ruminantium* que infeta ruminantes na África (WALKER; OLWAGE, 1987) e apresenta sequência gênica de proteínas externas de membrana semelhante a *E. canis*, *E. chaffeensis* e *A. platys* (antiga *E. platys*) (DUMLER et al., 2001).

*E. ruminantium* infecta ruminantes domésticos e silvestres na África e nas Ilhas do Caribe (ALLSOPP, 2010), sendo considerada um agente zoonótico, baseado em diagnóstico molecular em casos de óbito por erliquiose (LOUW; ALLSOPP; MEYER, 2005). É transmitida por aproximadamente 20 espécies de carrapatos do gênero *Amblyomma*, principalmente por *A. variegatum* e *A. haebreum* na África (BARRÉ; UILENBERG, 2010). As espécies *Amblyomma maculatum* e *Amblyomma cajennense* demonstraram capacidade de transmissão em condições laboratoriais, mas até agora não foram implicados como vetores (WALKER; OLWAGE, 1987).

A EM é causada por *E. canis* (em cães) e *E. chaffeensis* (em humanos), transmitida pelos carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma americanum*, respectivamente (SKOTARCZAK, 2003). Esta foi primeiramente descrita no Brasil em 1970, sendo o isolamento obtido somente em 2002 (DANTAS-TORRES, 2008). Em cães no Brasil é considerada uma doença amplamente distribuída (DANTAS-TORRES, 2008), com alta casuística (41,3%) no Estado de Espírito Santo (SPOLIDORIO et al., 2010).

Na América do Sul a erliquiose humana já foi constatada por diagnóstico molecular na Venezuela pelas espécies *E. canis* e *E. chaffeensis* (PEREZ et al., 2006; MARTÍNEZ et al., 2008), com evidências sorológicas na Argentina, no Chile (RIPOLL et al., 1999; LÓPEZ et al., 2003) e no Peru (MORO et al., 2009). No Brasil há relatos de seres humanos positivos por sorodiagnóstico em Minas Gerais (CALIC et al., 2004) e no Espírito Santo (SPOLIDORIO et al., 2010), utilizando-se antígenos de *E. chaffeensis* ou *E. canis*.

Os primeiros achados da presença de anticorpos para erliquiose humana no Brasil através de inquéritos sorológicos realizados em populações de humanos sadios datam de 1997, quando Kelly e colaboradores descreveram a presença de 20% de soropositividade para *Ehrlichia chaffeensis* através da técnica sorológica de *dipsticks* no sul da Amazônia (GALVÃO, 2006).

Costa e colaboradores (2005) relataram ter encontrado 10,5% de soropositividade para *E. chaffeensis* em uma população rural sadia de Minas Gerais, com ponto de corte de 1:128.

Os primeiros casos de erliquiose humana no Brasil (erliquiose monocítica humana) foram relatados em dois pacientes humanos de Minas Gerais por Calic,

Galvão e colaboradores em 2004. O diagnóstico foi realizado por meio de imunofluorescência indireta.

Em fevereiro de 2006, Costa e colaboradores relataram a evidência sorológica de erliquiose em nove novos casos, também em Minas Gerais. Finalmente, em 2006 Angerami e colaboradores descreveram os quatro primeiros casos confirmados em São Paulo por meio de Nested-PCR.

O diagnóstico de erliquiose é baseado em esfregaço sanguíneo, citologia corada pelo corante Giemsa, sorologia, cultura de organismos, imunoaglutinação e PCR (GREENE, 2006; DANTAS-TORRES, 2008).

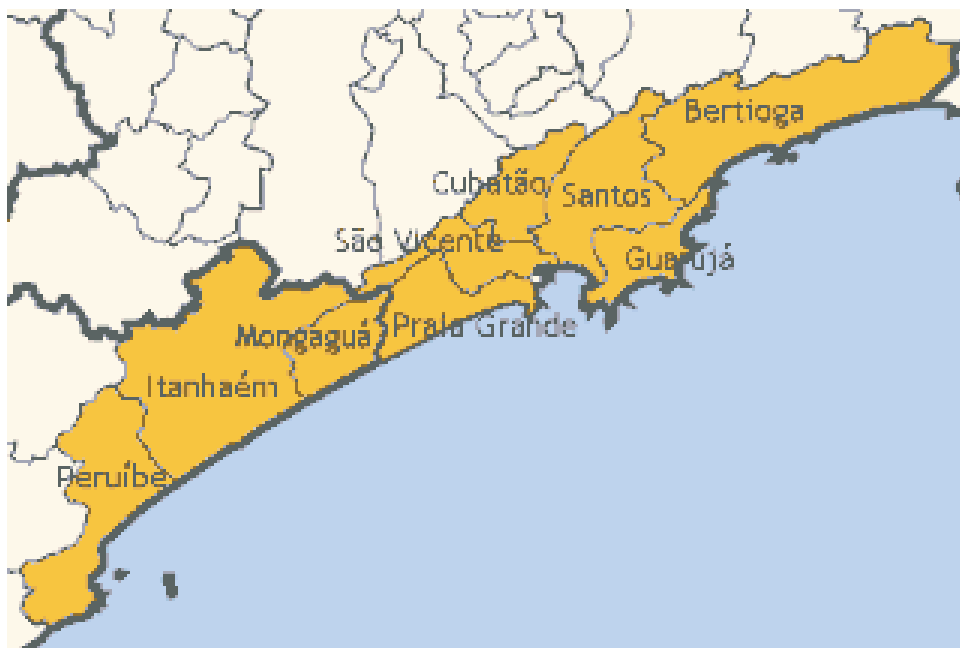
Os achados epidemiológicos até agora relatados, envolvendo o contato das pessoas envolvidas com o ambiente rural, seja em áreas de campo propriamente ditas ou na periferia de cidades de grande e médio portes e, conseqüentemente, com carrapatos, cães, pequenos roedores, capivaras e outros animais, faz com a busca de possíveis reservatórios e vetores dessa nova doença no Brasil constitua-se, a partir de agora, numa meta a ser alcançada. Essa busca torna-se importante principalmente em um momento em que ao mesmo tempo em que cresce o contato de populações com reservatórios e vetores de doenças zoonóticas como a erliquiose humana, cresce também o número de pacientes imunodeprimidos portadores de doenças infecto-contagiosas ou de doenças crônico-degenerativas (GALVÃO, 2006).

## **5. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1 Localização da Pesquisa**

O Município de Cubatão pertence à Região Metropolitana da Baixada Santista, criada pela Lei Complementar estadual de São Paulo n° 815, de 30 de julho de 1996. A região é constituída por nove municípios: Santos, São Vicente, Praia Grande, Cubatão, Guarujá, Bertioga, Mongaguá, Peruíbe e Itanhaém.

**Figura 5.** Região Metropolitana da Baixada Santista.



Fonte: Wikimedia Commons

**Figura 6.** Localização geográfica do município de Cubatão



Fonte: Wikimedia Commons



Cubatão situa-se na latitude 23° 50' a 23° 55' Sul e na longitude 46° 30' Oeste de Greenwich. Ocupa uma área de 143 Km<sup>2</sup>, tem 116.010 habitantes (IBGE, 2010) e situa-se a 57 km da capital paulista. Limita-se com os municípios de São Bernardo do Campo, Santo André, Santos e São Vicente.

O clima predominante é o tropical com suas variações quente e úmido. Verifica-se também a existência de variações climáticas de acordo com as características geográficas do relevo, como o clima da serra, o clima das áreas industrializadas, do sopé da serra e dos manguezais.

A umidade relativa do ar é superior a 80%, o que se coaduna com a alta taxa pluviométrica: média anual de 2.541 mm. A temperatura é variável, constatando-se 36° C como média das temperaturas máximas e 12° C como média das temperaturas mínimas. A pluviosidade mínima registrada nos dias com pequenas precipitações é de 1 mm (CUBATÃO, portal da cidade).

Embora oficialmente não haja zona rural, sendo o município classificado como urbano/industrial em seu plano diretor, uma grande quantidade de animais de produção, principalmente equinos e ruminantes pode ser encontrada, predominantemente em áreas de ocupação irregular, onde ocorre um contato estreito entre cães, pessoas e esses animais, fazendo supor que as espécies de carrapatos encontradas no município possam ser as mais diversas, o que aumenta as chances de transmissão zoonótica.

Como podemos observar na figura a seguir, o Município encontra-se cercado de verde, encravado em área de preservação ambiental, dentro do Parque Estadual da Serra do Mar (PESM). A distância entre a área urbana e a Mata Atlântica pode ser bastante diminuta, principalmente na região das Cotas e algumas áreas industriais, facilitando o contato entre cães e animais silvestres. É corriqueiro encontrar nos bairros mais próximos a trechos da Mata Atlântica cães que adentram a mata para caçar pequenos animais e fazer suas necessidades. Relatos de pescadores dão conta da presença de capivaras frequentando as margens dos rios e rodovias do município.

**Figura 7.** Cubatão: imagem de satélite da área urbana.



**Fonte:** Núcleo de Informação e Geoprocessamento – DVS/PMC.

## 5.2 Coleta e identificação

Foram identificados morfologicamente quanto a gênero, espécie e estadiamento 100 amostras de carrapatos colhidas entre 1º de agosto de 2011 e 1º de maio de 2012, oriundas de 26 locais, sendo 25 bairros e a área industrial. Os carrapatos foram colhidos segundo três critérios:

1. Espécimes retirados da superfície corporal de cães apreendidos ao canil municipal do Serviço de Controle de Zoonoses do Município.
2. Espécimes retirados da superfície corporal de cães atendidos em consulta clínica no ambulatório do mesmo serviço.
3. Carrapatos colhidos durante as visitas zoossanitárias mediante solicitação de munícipes quanto à infestação de carrapatos em seus animais e domicílios.



Durante esse período foram, eventualmente, atendidas solicitações quanto à infestação ambiental por carrapatos sem que houvesse animais na residência. Nesses casos, os parasitos encontrados também foram coletados e submetidos aos mesmos procedimentos aqui descritos quanto à identificação e processamento. A coleta resultou em 828 espécimes, sendo 320 machos, 464 fêmeas e 44 ninfas.

Uma vez que o ambulatório clínico é frequentado por pessoas de todos os bairros da cidade, que trazem seus cães para procedimentos nas clínicas médica e cirúrgica, espera-se obter um panorama geral dos ixodídeos que infestam cães residentes em todas as regiões do Município.

Cães eventualmente abandonados às portas do serviço ou em suas adjacências foram considerados como residentes do bairro onde se situa o referido equipamento municipal, pela impossibilidade de rastrear sua origem.

Por suas características, os bairros do Município de Cubatão tem diversas denominações, muitas vezes tornando difícil a identificação das áreas delimitantes dos mesmos. O Decreto Municipal nº 9.410 de 15 de setembro de 2009 cria e organiza as UEPEs (Unidades Espaciais de Pesquisa e Estatística) que abrangem a totalidade da área do Município.

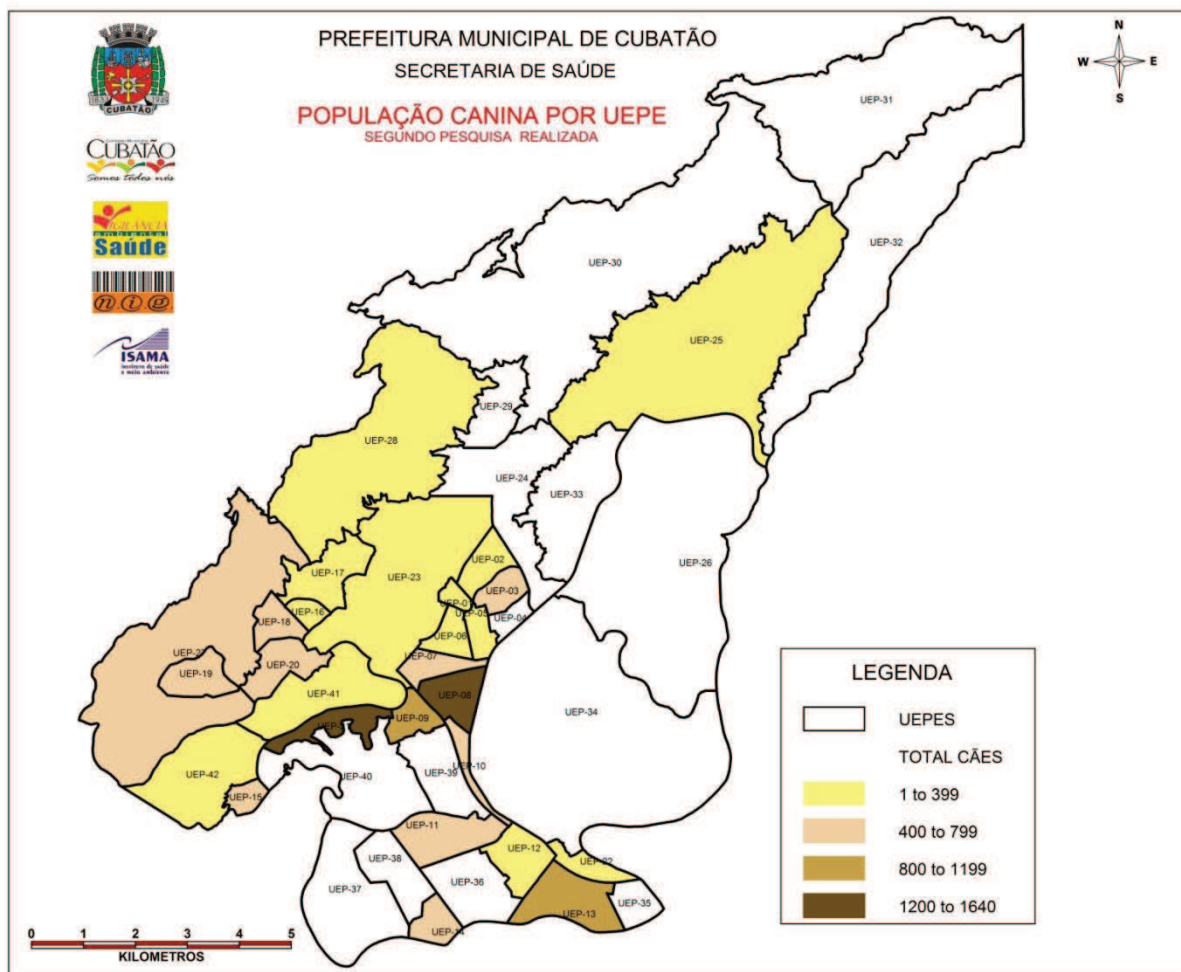
Em nosso trabalho procuramos respeitar o bairro declarado pelos munícipes quanto aos seus locais de moradia, uma vez que o decreto tem inestimável valor administrativo e organizacional, mas ainda não é amplamente conhecido pela população.

A amostragem e os procedimentos relativos às técnicas de biologia molecular foram realizados também respeitando os locais declarados pelos munícipes. Porém, fez-se necessário organizar quadros de correspondência, adequando os dados de acordo com o Decreto, para fins de espacialização. Assim os dados poderão ser utilizados para outros fins, já que a distribuição por UEPEs respeita a distribuição dos setores censitários do IBGE.

Segundo o censo animal realizado pelo Departamento de Vigilância em Saúde em 2011 existem em Cubatão cerca de 15.000 cães domiciliados.

Na **Figura 8** podemos observar a distribuição dos cães no Município:

**Figura 8.** Distribuição espacial dos cães no Município de Cubatão segundo censo animal realizado em 2011.



**Fonte:** Núcleo de Informação e Geoprocessamento – DVS/PMC.

Todos os parasitos coletados foram conservados em álcool etílico absoluto em frascos identificados quanto ao endereço do proprietário ou local de coleta e ao sexo do animal. No Laboratório do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas da Universidade Católica de Santos (IPECI) os carrapatos foram morfologicamente identificados quanto a gênero, espécie, sexo e estadiamento.

Foi separada de modo aleatório uma amostra de conveniência composta de 26 espécimes de carrapatos, sendo um por local de coleta para a extração de DNA, correspondentes às seguintes chaves de identificação: 06 (Costa Muniz), 10 (Parque Fernando Jorge), 11 (Jardim 31 de Março), 15 (Vila Couto), 18 (Cota 95), 25 (Vila Natal), 27 (Sítio Cafezal), 31 (Parque Industrial), 37 (Fábrica), 40 (Jardim Nova

República), 43 (Jardim Costa e Silva), 45 (Vila Elizabeth), 46 (Centro), 49 (Vila Esperança), 54 (Jardim das Indústrias), 58 (Pinheiro do Miranda), 64 (Água Fria), 67 (Pilões), 70 (Casqueiro), 73 (Cota 200), 75 (Vila Santa Rosa), 77 (Jardim São Francisco), 78 (Vila dos Pescadores), 82 (Vila Nova), 86 (Ilha Caraguatá) e 99 (Vila São José).

### 5.3 Extração de DNA

Para a realização da etapa laboratorial deste projeto foi firmada parceria com o Laboratório de Biologia Molecular da Fundação Lusíada.

Fêmeas ingurgitadas foram seccionadas e somente o terço anterior foi utilizado, de maneira a evitar contaminação da amostra e utilizar-se somente a parte onde os patógenos se multiplicam, ou seja, a região das glândulas salivares. Os carrapatos foram macerados em tubos de 1,5 ml do tipo Eppendorf com auxílio de ponteiros rombas estéreis e o DNA extraído de acordo com protocolo descrito para tecidos com o Kit DNeasy (Qiagen, Valencia, CA).

### 5.4 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

O DNA extraído foi submetido à Reação em Cadeia de Polimerase, como descrito a seguir:

#### 5.4.1 Pesquisa de *Rickettsia* sp

Para a pesquisa de *Rickettsias* cada amostra de DNA foi submetida à PCR utilizando-se oligonucleotídeos de alta sensibilidade (“*primers*”) denominados CS-78 senso (F- GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT) e CS-323 anti-senso (R- GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT), que amplificam um fragmento de 401 pares de bases (*pb*) do gene citrato sintetase (*gltA*), presentes em todas as espécies de *Rickettsias* (LABRUNA, et al., 2004). Além desta reação, as amostras foram

submetidas a uma segunda reação com um par de *primers* 5'→3' *Rr190.70p* (ATGGCGAATATTTCTCCAAAA) sentido e 5'→3' *Rr190.602n* (AGTGCAGCATTTCGCTCCCCCT) anti-senso, que amplificam um fragmento de 532 pares de bases (*pb*) do gene da proteína externa da membrana 190-kDa (*OmpA*), restrito às *Rickettsias* do grupo da febre maculosa (REGNERY; SPRUIL; PLIKAYTIS, 1991). Para cada reação eram utilizados controles negativos (água de miliqui livre de DNA) e positivos (*Rickettsia parkeri* cepa NOD).

A reação de amplificação foi realizada em microtubos de 200  $\mu$ l adicionando:

Buffer (200 mM Tris 8.4, 500 mM KCl, Invitrogen®) – 5  $\mu$ l

Cloreto de Magnésio (50 mM, Invitrogen®) – 1,5  $\mu$ l

dNTP (0,25 mM, Invitrogen®) – 1  $\mu$ l

Primer F (100 pM/ $\mu$ m) – 2  $\mu$ l

Primer R (100 pM/ $\mu$ m) – 2  $\mu$ l

Taq Polimerase (Invitrogen®) – 1  $\mu$ l

DNA extraído (amostra) – 5  $\mu$ l

Água de miliqui – 32,5  $\mu$ l (para um total de 50  $\mu$ l de solução).

As condições de temperatura da PCR, realizada em termociclador GeneAmp PCR Systems modelo 9700 (Applied Systems, CA), tanto para o gene *gltA* quanto para o gene *OmpA* eram conforme segue:

1 ciclo a 95°C por 5 minutos, seguidos por 40 ciclos de 40 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C e 45 segundos a 72°C, com extensão final a 72°C por 7 minutos.

#### 5.4.2 Pesquisa de *Ehrlichia sp*

Na PCR para *Ehrlichia sp* cada amostra de DNA foi testada com um par de *primers* DSB 330 (F- GATGATGTTTGAAGATATSAAACAAAT) senso e DSB 720 (R- CTATTTTACTTCTTAAAGTTGATAWATC) anti-senso para o gene *dsb* (DOYLE et al., 2005) e EHR 16SD (F- GGTACCYACAGAAGAAGTCC) senso e EHR16SR (R- TAGCACTCATCGTTTACAG) anti-senso para o gene *16S* (INOKUMA; RAOULT; BROUQUI, 2000; ALMEIDA, 2010).

A primeira reação para o gene *dsb*, que amplifica um fragmento de 401-*pb* foi realizada conforme protocolo descrito por Aguiar e colaboradores (2007), com modificações. Com o objetivo de aumentar a sensibilidade diagnóstica do teste, um novo *primer* (DSB 380) foi desenhado para a elaboração da técnica de Nested-PCR, que amplifica um fragmento de 349-*pb* do gene *dsb* (F- ATTTTGTAGRGATTTTCCAATACTTGG). Este protocolo é eficaz para a amplificação de DNA de todas as espécies conhecidas atualmente do gênero *Ehrlichia* (LABRUNA et al., 2007b; ALMEIDA, 2011).

Tanto a primeira quanto a segunda PCR foram realizadas em solução total de 50µl por amostra contendo:

Buffer (200 mM Tris 8.4, 500 mM KCl, Invitrogen®) – 5 µl

Cloreto de Magnésio (50 mM, Invitrogen®) – 1,5 µl

dNTP (0,25 mM, Invitrogen®) – 1 µl

Primer F (100 pM/µm) – 2 µl

Primer R (100 pM/µm) – 2 µl

Taq Polimerase (Invitrogen®) – 1 µl

DNA extraído (amostra) – 5 µl

Para a segunda reação (Nested-PCR) foi utilizado 1 µl do produto de DNA amplificado na reação anterior (PCR). As condições dos ciclos da primeira PCR consistiram em uma desnaturação inicial por 3 minutos a 95°C, seguidos por 35 ciclos repetitivos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 50°C e 30

segundos a 72°C, seguidos por 5 minutos de extensão final a 72°C. Na Nested-PCR a desnaturação inicial foi a 95°C por 3 minutos e 30 ciclos repetitivos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 52°C e 30 segundos a 72°C, seguidos por 5 minutos de extensão final a 72°C. Controle positivo (DNA de *Ehrlichia canis*) e controle negativo (água de miliqui) foram incluídos em cada reação.

A PCR para o gene 16S foi realizado em solução total de 50 µl, utilizando-se:

Buffer (200 mM Tris 8.4, 500 mM KCl, Invitrogen®) – 5 µl

Cloreto de Magnésio (50 mM, Invitrogen®) – 1,5 µl

dNTP (0,25 mM, Invitrogen®) – 1 µl

Primer F (100 pM/µm) – 2 µl

Primer R (100 pM/µm) – 2 µl

Taq Polimerase (Invitrogen®) – 1 µl

DNA extraído (amostra) - 5 µl

As condições de temperatura utilizadas foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 30 segundos a 55°C e 90 segundos a 72°C, com extensão final a 72°C por 5 minutos.

Um conjunto de 09 primers oligos, com 213 bases, escala de 25 nmol foram adquiridos junto à PRODIMOL BIOTECNOLOGIA S.A. de acordo com Almeida (2010) para uso neste trabalho.

### 5.4.3 Leitura e análise dos produtos de PCR

Todos os produtos de PCR, 5 µl de DNA de cada amostra, amplificado e acrescido de 3 µl de Gel Loading Buffer (Invitrogen®), foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 2% com tampão de corrida TBE 1X pH 8,0 (44,58 M Tris-base, 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA), corado com Brometo de Etídio por um intervalo de quarenta minutos. Em seguida o gel era submetido à transluminação em transluminador UV para visualização das bandas. As amostras que revelavam bandas positivas na altura dos controles positivos eram consideradas positivas para reação de PCR utilizada.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Identificação das espécies de carrapatos e distribuição por bairros

Dos 828 espécimes coletados, 827 (99,87%) pertenciam à espécie *Rhipicephalus sanguineus* e apenas uma fêmea adulta (0,13%) pertencia à espécie *Amblyomma ovale*, tendo esse último espécime sido encontrado em animal errante em um pátio de manobras denominado Ecopátio, no polo industrial de Cubatão. Dos 827 espécimes de *R. sanguineus* colhidos, 320 (38,69%) eram machos, 463 (55,98%) eram fêmeas e 44 (5,32%) eram ninfas do gênero *Rhipicephalus*, não tendo sido identificados o sexo e a espécie das mesmas.

Das 100 amostras colhidas, 85 eram oriundas de cães e 15 de ambientes infestados sem a presença de cães no domicílio. Entre os cães amostrados, 59 (69,41%) eram machos e 26 (30,59%) eram fêmeas. Dentre os 85 cães, 64 não tinham raça definida, sendo 42 machos e 22 fêmeas; 9 eram da raça Pit Bull, sendo 7 machos e 2 fêmeas; 5 eram da raça Poodle, sendo 4 machos e uma fêmea; 2 cães eram da raça Pinscher, sendo um macho e uma fêmea; os outros cães parasitados eram um Pastor Alemão macho, um Boxer macho e uma fêmea da raça Bull Terrier.

A média aritmética de infestação por carrapatos machos foi de 4,638 por amostra, apresentando mediana de 2 carrapatos e moda de 1 carrapato.

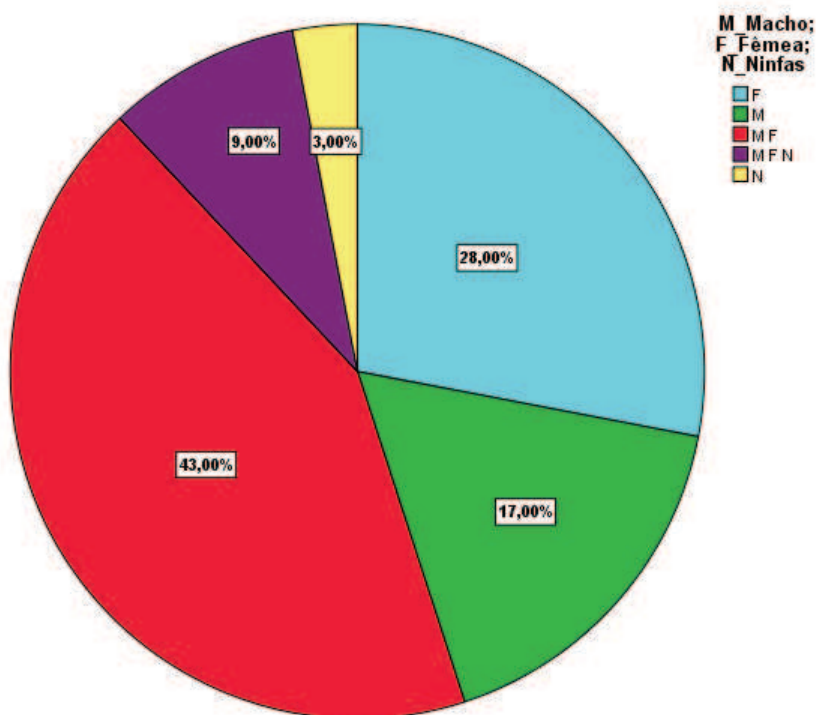
A média aritmética de infestação por carrapatos fêmeas foi de 5,8 por amostra, apresentando mediana de 3 carrapatos e moda de 1 carrapato por amostra.

Havia infestação por ninfas em 12 cães, encontrando-se a infestação máxima de 17 ninfas em um cão macho sem raça definida no Bairro Costa Muniz.

Os números máximos de parasitas encontrados foram de 59 machos e 40 fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* em uma mesma residência no Bairro Água Fria, sem que houvesse a presença de animais no imóvel.

No gráfico abaixo podemos observar como os parasitas estavam distribuídos nos hospedeiros.

**Gráfico 1.** Distribuição dos espécimes nos cães segundo a presença de machos, fêmeas, ninfas e ambos. Cubatão 2012.





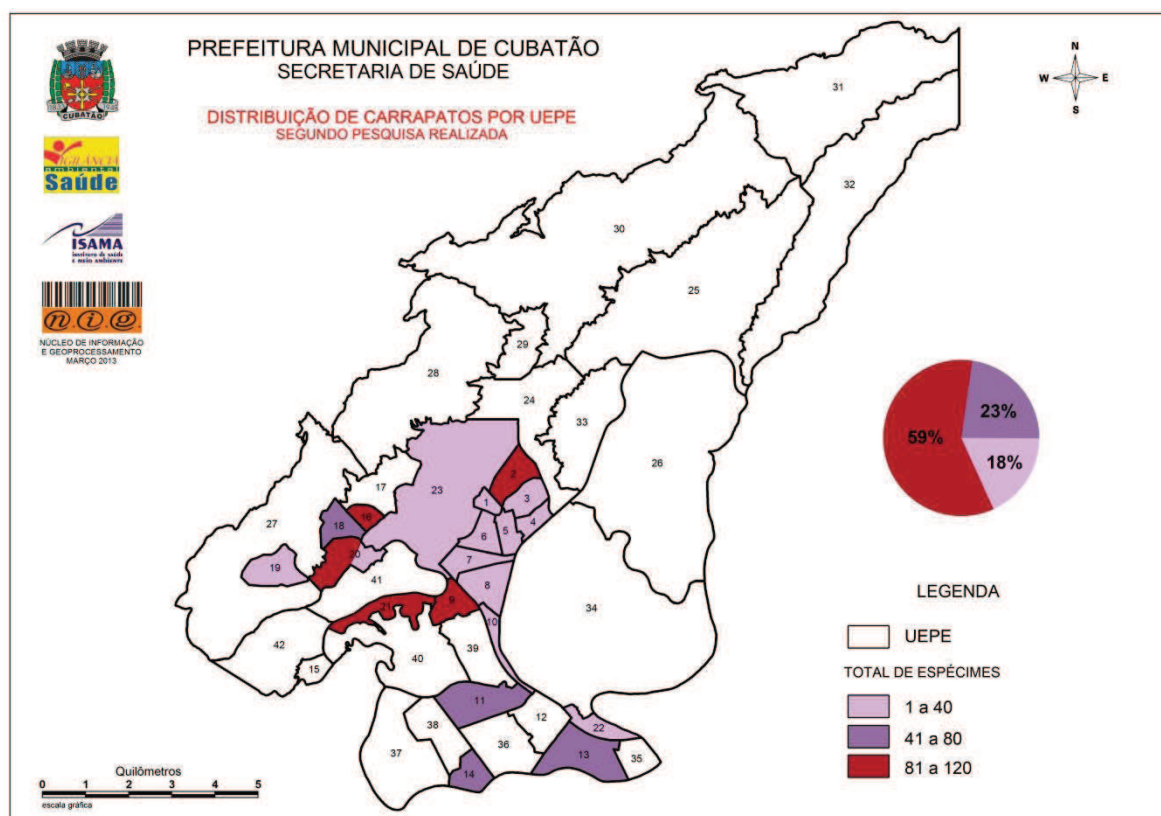
**Quadro 1.** Distribuição dos carrapatos segundo local de coleta e correspondência com as UEPEs no Município de Cubatão, 2011-2012.

Bairro declarado	Bairro referência	UEPE	Nº amostras	Nº espécimes coletados
ÁGUA FRIA	ITUTINGA-PILOES/SERRA DOS PILOES-ZANZALA/COTA 400	2027	2	102
JARDIM CASQUEIRO	JARDIM CASQUEIRO	13	8	57
CENTRO	CENTRO	5	2	17
COSTA MUNIZ	VILA NATAL	9	3	30
COTA 200	COTA 200	19	1	13
COTA 95	PINHAL DO MIRANDA	18	2	45
VILA FABRIL	VILA FABRIL	16	4	97
ILHA CARAGUATÁ	ILHA CARAGUATÁ	14	6	44
JARDIM COSTA E SILVA	JARDIM ANCHIETA	3	1	11
JARDIM DAS INDÚSTRIAS	JARDIM ANCHIETA	3	1	1
JARDIM NOVA REPÚBLICA	JARDIM NOVA REPÚBLICA	11	7	43
JARDIM SÃO FRANCISCO	JARDIM SÃO FRANCISCO	4	4	12
JARDIM 31 DE MARÇO	VILA SANTA ROSA	7	2	11
PILÕES	ITUTINGA-PILOES/SERRA DOS PILOES-ZANZALA/COTA 400	2027	3	6
PINHAL DO MIRANDA	PINHAL DO MIRANDA	18	1	3
PARQUE FERNANDO JORGE	JARDIM ANCHIETA	3	2	10
PARQUE INDUSTRIAL	CRUZEIRO QUINHENTISTA	23	1	1
SÍTIO CAFEZAL	SÍTIO DO CAFEZAL	2	23	120
VILA COUTO	VILA COUTO	6	1	11
VILA DOS PESCADORES	VILA DOS PESCADORES	22	1	14
VILA ELIZABETH	VILA ELIZABETH	1	1	10
VILA ESPERANÇA	VILA ESPERANÇA	21	8	57
ILHA BELA	VILA ESPERANÇA	21	4	26
VILA NATAL	VILA NATAL	9	6	57
VILA NOVA	VILA NOVA	8	4	24
VILA SANTA ROSA	VILA SANTA ROSA	7	1	2
VILA SÃO JOSÉ	VILA SÃO JOSÉ	10	1	4
TOTAIS			100	828

No **Quadro 1** observamos a coleta dos parasitos por bairro declarado e bairro referência, de acordo com o Decreto Municipal nº 9.410 de 15 de setembro de 2009.

Para melhor visualização da coleta, a distribuição das amostras foi georreferenciada, como demonstrado na **Figura 9**.

**Figura 9.** Distribuição espacial da coleta de carrapatos de acordo com as UEPEs no Município de Cubatão, 2011-2012.



**Fonte:** Núcleo de Informação e Geoprocessamento – DVS/PMC

## 6.2 Reação em Cadeia de polimerase (PCR)

Todos os 26 espécimes cujo DNA foi submetido à PCR foram negativos para *Rickettsia sp*, tanto na reação para todos os gêneros de *Rickettsia* como para as *Rickettsias* do grupo da febre maculosa. As bandas inespecíficas visualizadas abaixo de 349 pb correspondentes às amostras de números 10, 25 e 37 foram desconsideradas.

Para o gênero *Ehrlichia sp*, todos os 26 espécimes que tiveram seu material genético extraído e submetido à PCR foram negativos nas duas etapas da Nested-PCR para o gene *dsb*.

Para o gene *16S*, foram consideradas positivas as amostras de números 31, 40, 43, 78, 86 e 99 (correspondentes ao Parque Industrial, Jardim Nova República, Jardim Costa e Silva, Vila dos Pescadores, Ilha Caraguatá e Vila São José, respectivamente) que apresentaram bandas na altura dos 349 *pb*, tendo sido as amostras de números 31, 40 e 43 corridas em duplicata devido às bandas fracamente positivas apresentadas na primeira observação dos resultados no gel de agarose.

Para melhor visualização da distribuição geográfica dos espécimes positivos para o gene *16S*, foi realizado o georreferenciamento dos resultados encontrados, conforme se observa no mapa abaixo:

**Figura 10:** Distribuição espacial dos locais de coleta dos carrapatos positivos para o gene *16S*.

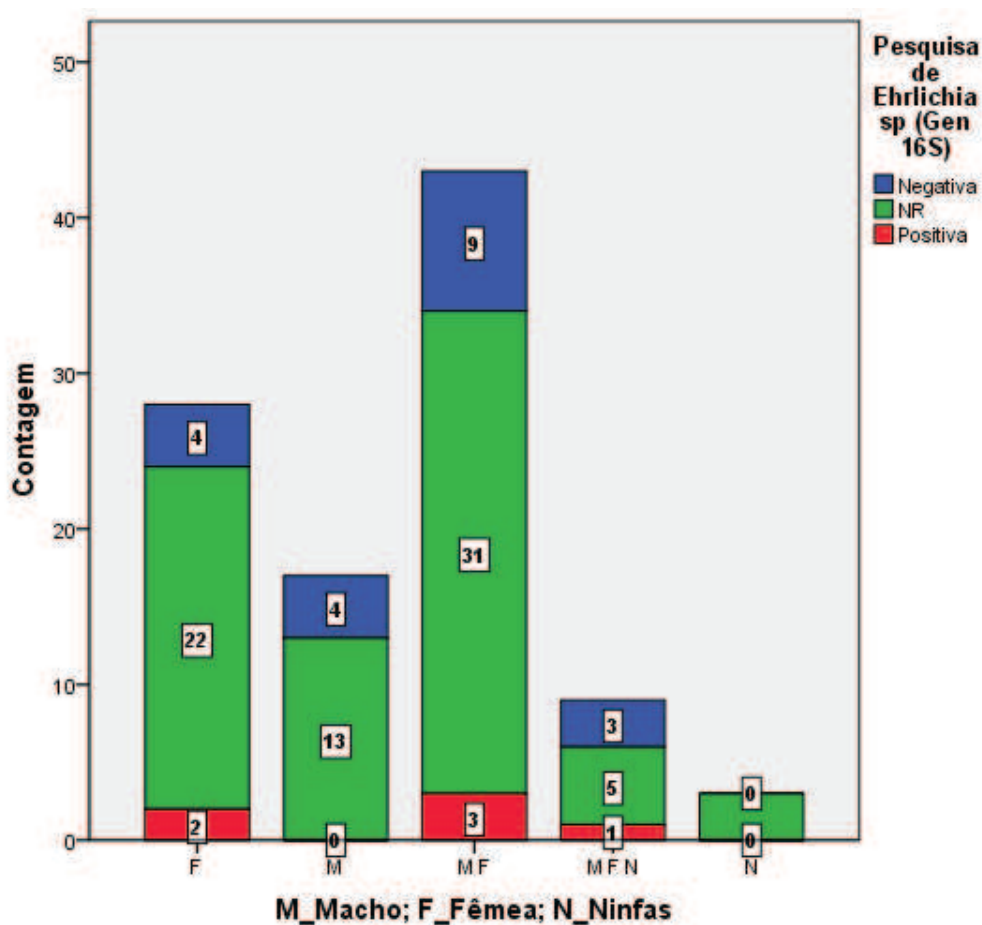


**Fonte:** Núcleo de Informação e Geoprocessamento do DVS/PMC.

No **Gráfico 2** são apresentados os resultados obtidos por meio de Reação em Cadeia de Polimerase na pesquisa de *Ehrlichia sp* (gene *16S*) segundo a presença de parasitos machos, fêmeas e ninfas.

Um achado interessante foi a positividade para o gene 16S somente em amostras onde havia a presença de fêmeas de carrapatos. O achado pode ser significativo, porém não foi possível atestar a significância do mesmo quando submetido ao teste de qui-quadrado, pelo tamanho da amostra.

**Gráfico 2.** Resultados obtidos através de PCR na pesquisa para *Ehrlichia sp* (Gene 16S) segundo a presença de machos, fêmeas e ninfas. Cubatão, 2012.



## 7. DISCUSSÃO

O Município de Cubatão apresenta peculiaridades bastante distintas, que chamam atenção quanto à exposição humana aos vetores da febre maculosa brasileira e outras zoonoses transmitidas por carrapatos. No final da década de 1970, ao término das obras da Rodovia Anchieta, houve a ocupação desordenada das residências utilizadas pelos operários durante os anos de construção, tornando os hoje denominados bairros-cota um conglomerado encravado no Parque Estadual da Serra do Mar. Anos mais tarde, com a construção da Rodovia dos Imigrantes e a presença de inúmeras indústrias constituintes do chamado polo industrial de Cubatão, tornou-se o Município um importante entroncamento por onde circulam diariamente um sem-número de veículos, pessoas e cargas, num grande aglomerado humano.

A partir de 2007 o Governo do Estado de São Paulo implantou o Programa de Recuperação Socioambiental da Serra do Mar, programa que visa a recuperação do Parque Estadual da Serra do Mar, a maior área contínua de Mata Atlântica preservada no Brasil e que sofre a ameaça da ocupação por assentamentos habitacionais precários. As intervenções habitacionais estão sendo articuladas às da Política Estadual de Meio Ambiente no Programa, que configura um conjunto de ações e intervenções das secretarias de Habitação e de Meio Ambiente, envolvendo o Parque Estadual e outras áreas remanescentes do bioma Mata Atlântica (SECRETARIA DE ESTADO DO MEIO AMBIENTE, 2012).

No Município de Cubatão, onde o problema de pressão sobre as áreas do Parque Estadual da Serra do Mar é mais grave, com a presença de 9 núcleos de ocupação irregular, que se localizam dentro da área do Parque, em áreas desafetadas desde 1994 e áreas particulares vizinhas ao Parque a estimativa é de reassentamento de cerca de 7.500 famílias ocupantes dos 9 núcleos, sendo que dessas famílias 5000 serão removidas e 2500 ficarão em área a ser reurbanizada. Segundo o Governo do Estado de São Paulo os objetivos do Programa, já em andamento, são:

- Desocupação dos bairros Água Fria, Cotas 400 e 500, com reassentamento para unidades habitacionais construídas pelo CDHU;



- Desocupação de áreas de risco e de Áreas de Preservação Permanentes nos bairros cota 95, 100 e 200, com revitalização urbana e reassentamento pelo CDHU;
- Ordenamento fundiário, adequação de limites, incluindo ampliação, recategorização e desafetação em pontos críticos;
- Recuperação ambiental, incluindo das áreas liberadas pelo reassentamento, e o enriquecimento da biodiversidade com plantio de palmeira juçara;
- Melhoria da infraestrutura e capacidade de gestão do PESH (Parque Estadual da Serra do Mar) – implantação de novas bases de apoio ao uso público e proteção, reforço da vigilância patrimonial e monitoria ambiental, capacitação das equipes, conselhos consultivos e comunidades locais;
- Melhoria do sistema de comunicação visual para o uso público e educação ambiental – produção de exposições para os centros de visitantes, material informativo para comunidades e visitantes (SECRETARIA DE ESTADO DO MEIO AMBIENTE, 2012).

Desde o início do programa mais de 3000 famílias já foram removidas. O saldo dessa movimentação humana, do ponto de vista dos riscos à saúde pública, é o número de animais, principalmente cães, deixados para trás durante o processo de mudança. O assunto gera polêmica, discussões acaloradas e constantes reuniões entre o Ministério Público, representantes do Município, Governo do Estado, Organizações não Governamentais e diversos outros setores da sociedade.

Além desse projeto de remoção, outras áreas de invasão, tais como a Vila Esperança e a Vila dos Pescadores (as duas maiores favelas do Município) serão, nos próximos anos, contempladas com projetos de reurbanização com a remoção de moradias.

Enquanto a massa humana migra, um grande contingente animal está sendo deixado à própria sorte nos bairros incluídos no Programa, principalmente as Cotas. Esses cães com frequência sofrem atropelamentos ao tentar atravessar as rodovias, invadem empresas do polo industrial, produzem e sofrem todo tipo de agravos. Pela localização desses bairros, tanto podem esses animais transitar pelas áreas de Mata Atlântica como tornar-se errantes em área urbana.

O número de cães errantes na área urbana de Cubatão cresceu exponencialmente, principalmente a partir de 2008, quando foi promulgada a Lei nº. 12.916 (conhecida como Lei Feliciano Filho). Esse instrumento legal mudou as regras para apreensão, abrigamento e eutanásia de cães em Centros de Controle de Zoonoses e a maioria dos municípios paulistas, inclusive Cubatão, não estava preparada para as mudanças propostas.

A superlotação dos canis municipais em todo o Estado de São Paulo levou a mudanças nos critérios para apreensão de cães errantes. Além disso, a Lei Feliciano cria em seu Artigo 4º a figura do cão comunitário, aquele que vive nas ruas estabelecendo vínculos com a comunidade. Esses animais somente podem ser apreendidos para fins de esterilização e registro e deve ocorrer a devolução à comunidade de origem após identificação e assinatura de termo de compromisso de seu cuidador principal. Na prática nenhum morador se dispõe a assinar tal documento.

Em Cubatão a implantação do Projeto de Recuperação Socioambiental da Serra do Mar em 2007 e as mudanças na legislação em 2008 propiciaram o quadro hoje instalado. O abandono de animais não tem ocorrido somente nos bairros afetados pela desocupação e muitos desses cães e gatos tem sido levados até as áreas centrais do Município para ali serem deixados. Um ponto conhecido de abandono é o entorno do Serviço de Controle de Zoonoses, razão pela qual pode-se observar um maior número de animais amostrados em nosso trabalho no bairro em que se situa o referido equipamento municipal (Sítio Cafezal). Como já citado, animais deixados às portas do serviço, por falta de informação quanto à sua origem, foram considerados residentes nesse bairro.

Nossa coleta não foi realizada de modo randômico, dependendo das informações por parte da população quanto à presença de parasitos ou da apreensão de cães ao Serviço de Controle de Zoonoses. Por essa razão não é possível relacionar a população parasitária à população humana do município.

Esses fatores, embora inevitáveis, levam a um viés de amostragem.

A comparação dos mapas de distribuição de cães por UEPEs e de amostragem de parasitos favorece a visualização da infestação de carrapatos em relação à população canina nos bairros, sem, contudo, possibilitar qualquer correlação entre cães e parasitos, uma vez que o número de parasitos por cão pode

variar. Além disso, as amostras foram georreferenciadas incluindo os carrapatos colhidos em ambientes infestados sem a presença de cães.

Os arredores do Ecopátio, local onde foi coletado o único espécime de *Amblyomma ovale*, também é um ponto crítico no que se refere a abandono de animais. Por haver uma intensa movimentação de pessoas e cargas, muitos animais são deixados às margens da rodovia e aproximam-se das pessoas em busca de alimento. Há uma praça de alimentação e muitos ambulantes no local, propiciando um afluxo de cães errantes e comunitários. A localização do pátio de manobras, próxima a trechos de Mata Atlântica, com certeza foi determinante para o encontro desse tipo de parasita. Os riscos desse parasitismo devem ser avaliados, por tratar-se de área de grande circulação humana. SABATINI (2010) descreve o parasitismo humano por espécimes do gênero *Amblyomma sp* e especificamente por *A. ovale* durante coletas realizadas no interior do PESM.

O *Amblyomma ovale* Koch 1844 parasita na fase adulta diversos hospedeiros, sendo principalmente encontrado em carnívoros. Fases imaturas já foram relatadas parasitando também gambás (BARROS-BATTESTI, 2006; SABATINI, 2010). É um carrapato cuja presença já foi relatada em praticamente todos os biomas brasileiros, com exceção da caatinga (LABRUNA, 2005c). Tem grande capacidade de parasitismo humano e ampla distribuição em trechos de Mata Atlântica abaixo de 700 m (SZABÓ et al., 2009b; BARBIERI, 2012).

O exemplar por nós coletado mostrou-se negativo para todas as espécies de Rickettsias. Porém, mostrou-se positivo para o gene 16S da família *Anaplasmataceae*, o que demonstra potencial zoonótico para o parasita coletado, pertencente a uma espécie que parasita tanto o homem quanto os cães.

Muitos dos animais errantes estão infestados com ectoparasitas, principalmente carrapatos, mas o que surpreende é o alto número de ectoparasitas coletados em domicílios onde não há cães residentes. Um total de 15% das amostras foi colhido nessas condições e há casos de infestação maciça em todos os cômodos das residências, inclusive nos dormitórios. O bairro em que foi coletado o maior número de parasitos foi a Água Fria, justamente uma área onde a desocupação já deixou muitos cães errantes.

O parasita preponderantemente encontrado em nossa pesquisa, como era esperado (já que o escopo deste trabalho são os cães urbanos) foi o carrapato da espécie *Rhipicephalus sanguineus*. O carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille,



1806) conhecido como o “carrapato vermelho do cão”, é a espécie de carrapato mais frequente entre caninos em todo o mundo, presente principalmente nos trópicos e subtropicais (PIRANDA, 2008; DANTAS-TORRES, 2010). Trata-se de um parasita de origem africana introduzido no meio urbano com o cão doméstico, seu principal hospedeiro (AGUIAR et al., 2007). Possui hábitos nidícolas, com preferência pelas construções de alvenaria e interior dos domicílios, embora também possa se esconder em pequenos nichos e rachaduras em muros, paredes, casinhas de madeira, etc, na área externa das residências (DANTAS-TORRES, 2010; LABRUNA; PEREIRA, 2001). Isso explica a grande quantidade de espécimes colhidos para este trabalho em domicílios, a pedido de moradores em busca de soluções para a infestação de carrapatos no intra e peridomicílio, onde muitas vezes não mais habitam cães, porém ainda restam os parasitas. O *R. sanguineus* é um “buscador” de hospedeiros e pode, em ocasiões não raras, parasitar outras espécies, inclusive a humana, embora apresente favoritismo pelo cão. Foi descrito, inclusive, como transmissor de febre maculosa no Arizona entre 2003 e 2004 (DEMMA et al., 2005).

No Brasil os primeiros casos de parasitismo humano por *R. sanguineus* foram relatados por Dantas Torres (2006), durante levantamento das espécies de parasitas provenientes de cães domésticos na periferia de Recife (PE). Quatro dos proprietários desses cães apresentavam os ectoparasitas presos ao corpo.

Apesar de possuir aparelho sugador mais curto, característica que teoricamente não propicia o parasitismo humano, casos de parasitismo humano são relatados, inclusive em outros países da América do Sul (GARCÍA-GARCÍA et al., 2010).

Na pesquisa de carrapatos e Rickettsias nas trilhas do Parque Estadual da Serra do Mar em Cubatão (SABATINI 2010) foram encontradas treze espécies de carrapatos (*A. aureolatum*, *A. brasiliense*, *A. dubitatum*, *A. fuscum*, *A. incisum*, *A. longirostre*, *A. naponense*, *A. nodosum*, *A. ovale*, *Ixodes aragaoi*, *Ixodes loricatus*, *Haemaphysalis juxtakochi* e *Rhipicephalus sanguineus*) e três espécies de Rickettsias (*Rickettsia parkeri*, *Rickettsia bellii* e *Rickettsia amblyommi*). Além de demonstrar a grande variedade de espécies de carrapatos nessa porção de Mata Atlântica, o estudo demonstrou existir Rickettsia patogênica (*R. parkeri*) em *A. ovale* e em *R. sanguineus* que se co-alimentaram em um mesmo cão. Esse achado assume grande importância, pois com os movimentos humanos em curso no

município de Cubatão, as populações de carrapatos anteriormente descritos apenas em áreas de mata tendem a ser carreados para a área urbanizada.

O movimento de cães entre trechos da Mata Atlântica e as áreas urbanizadas pode ser um meio de dispersão de diversas espécies de carrapatos, aumentando os riscos de transmissão de febre maculosa (PINTER, 2008; BARBIERI, 2012).

Sabe-se por relatos de proprietários de cães que frequentam os consultórios veterinários, que a população tem o hábito de esmagar os carrapatos encontrados em seus cães, seja com as mãos ou por meio de pisoteio com ou sem o adequado uso de calçados. Tal prática constituiria um risco à saúde de adultos e crianças, nos casos de cães infestados com carrapatos infectados por patógenos causadores de riquetsioses.

Foi relatada a transmissão humana por *R. sanguineus* de *Rickettsia rickettsii* (BURGDORFER et al., 1975; DEMMA, 2005) nos Estados Unidos e no Brasil (LABRUNA, 2011), *Rickettsia parkeri* (SABATINI, 2010) também no Brasil, *Rickettsia Massiliae* (GARCÍA-GARCÍA et al., 2010) na Argentina, *Rickettsia amblyommii* no Panamá, *Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia akari* no México, *Rickettsia conorii* em Portugal e Espanha e *R. Massiliae* em Portugal, comprovando que torna-se cada vez mais comum o parasitismo humano por essa espécie de carrapato. Além disso, foram descritos casos humanos causados por *Rickettsia sibirica* por outros carrapatos do gênero *Rhipicephalus* (*Rhipicephalus pursillus* e *Rhipicephalus bursa* na parte continental de Portugal) (LABRUNA, 2011).

Especula-se sobre o papel do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* em áreas onde há ocorrência de Leishmaniose Visceral Americana (LVA), uma importante zoonose cujo principal vetor é o inseto denominado *Lutzomyia longipalpis*, popularmente conhecido como “mosquito palha.” Em 2009, Dantas-Torres demonstrou por técnicas moleculares (PCR e real time PCR) a presença de *Leishmania infantum* em carrapatos infestantes de cães positivos para LVA em municípios pernambucanos em que o inseto vetor ainda não havia sido detectado. Embora não se afirme a competência vetorial do *R. sanguineus* para a transmissão dessa importante zoonose, a detecção desse tipo de patógeno em carrapatos desperta a suspeita de que ainda não tenham sido desvendadas todas as

implicações dos ectoparasitas na transmissão de doenças para animais e seres humanos.

Embora amplamente relatada a transmissão de outros agentes, o patógeno mais comumente transmitido por *Rhipicephalus sanguineus* é *Ehrlichia sp*, sendo esse carrapato no Brasil o principal transmissor de *Ehrlichia canis*. Por estar amplamente distribuído mundialmente, *R. sanguineus* participa da transmissão de patógenos de diversos gêneros e também de espécies de *Ehrlichia* comprovadamente patogênicas em diversos países do mundo. A distribuição geográfica das espécies de *Ehrlichia* está diretamente relacionada à distribuição dos vetores que as transmitem. Assim, não somente *R. sanguineus* mas também outros gêneros de carrapatos são capazes de transmitir erliquiose em praticamente todos os continentes (PREZIOSI; COHN, 2002).

Embora a febre maculosa seja a mais conhecida e temida moléstia transmitida por carrapatos, a literatura médica tem demonstrado que muitos pacientes com suspeita de febre maculosa na realidade estão sendo acometidos por outras moléstias transmitidas por carrapatos, entre elas a erliquiose. Nos Estados Unidos há muitos relatos de pacientes com sintomatologia febril, apresentando cefaléia e mialgia após um período de 5 a 10 dias após a picada por carrapato. Outros sinais e sintomas possíveis incluem náusea, vômitos, diarreia, tosse e confusão mental. Em casos severos pode ocorrer falência renal, coagulação intravascular, meningoencefalite e coma (CALIC et al., 2004).

Na América do Sul a erliquiose humana já foi constatada por diagnóstico molecular na Venezuela pelas espécies *E. canis* e *E. chaffeensis* (PEREZ et al., 2006; MARTÍNEZ et al., 2008), com evidências sorológicas na Argentina, no Chile (RIPOLL et al., 1999; LÓPEZ et al., 2003) e no Peru (MORO et al., 2009). No Brasil há relatos de seres humanos positivos por sorodiagnóstico em Minas Gerais (CALIC et al., 2004) e no Espírito Santo (SPOLIDORIO et al., 2010), utilizando-se antígenos de *E. chaffeensis* ou *E. canis*.

Em 2006, Angerami e colaboradores confirmaram os quatro primeiros casos humanos por meio de Nested-PCR, no Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Demonstra-se, assim, que em termos de diagnóstico de doenças transmitidas por carrapatos, as técnicas moleculares podem exercer um papel

fundamental, inclusive para a rapidez diagnóstica e o início do tratamento, embora ainda não estejam instituídas como rotina por seu alto custo.

O alto custo das técnicas moleculares foi, inclusive, um fator limitante no presente estudo. Na impossibilidade de realizar a extração do material genético de uma amostra maior de parasitos ou de todos os espécimes colhidos devido às limitações financeiras do projeto, optamos pela extração de DNA de um parasita por bairro, de modo a termos uma noção do que ocorre em termos de contaminação dos carrapatos no Município.

Essa amostra de conveniência (composta por 26 carrapatos) foi separada segundo a coleta por bairros do Município de Cubatão como declarados por munícipes solicitantes, quanto à presença de *Rickettsia sp*, Rickettsias do Grupo da febre maculosa e *Ehrlichia sp*.

A utilização de um número maior de parasitos em pool produziu um macerado muito rico em material genético, o que resultaria numa área de arrasto em gel de agarose de modo a comprometer a visualização no transluminador UV.

A extração de DNA foi realizada de acordo com os protocolos descritos, utilizando o kit de extração Dneasy (Qiagen, Valencia, CA) e o material resultante da extração foi submetido à técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para a detecção desses patógenos de importância médica e veterinária.

De acordo com os resultados obtidos os carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* utilizados neste estudo foram negativos para *Rickettsia sp* e para as Rickettsias do grupo da febre maculosa. Entre os 26 carrapatos utilizados na extração de DNA e posterior PCR, 25 eram da espécie *R. sanguineus* e um exemplar pertencia à espécie *Amblyomma ovale*. Cumpre ressaltar que, embora seja conhecidamente um transmissor de febre maculosa brasileira por *Rickettsia parkeri* (SABATINI, 2010; LABRUNA, 2011; BARBIERI, 2012), este exemplar de *A. ovale* mostrou-se negativo para todas as Rickettsias testadas mostrando, contudo, positividade para o gene 16S ribossomal de *Ehrlichia sp*.

Entre os 26 espécimes testados, seis (23,08%) mostraram positividade para o gene 16S (RNA ribossomal) de *Ehrlichia sp*. Porém, para o gene *dsb* de Ehrlichia, as 26 amostras mostraram-se negativas.

A região do gene 16S (RNA ribossomal) tem sido amplamente estudada em diagnóstico molecular de diversas espécies de bactérias por tratar-se de região muito conservada nesses organismos. Foi com base na similaridade da sequência

de nucleotídeos do gene 16S que os quatro genogrupos da família *Anaplasmataceae* foram identificados por Dumler e colaboradores em 2001.

Embora o diagnóstico clínico e os testes sorológicos sejam os métodos mais utilizados na prática ambulatorial veterinária, o potencial zoonótico demonstrado ao longo dos últimos anos trouxe à baila a necessidade de métodos mais precisos de diagnóstico. Por esse motivo diversas regiões do DNA tem sido utilizadas para o diagnóstico molecular dos patógenos da família *Anaplasmataceae*, principalmente *Ehrlichia sp.*

Muitas técnicas de PCR tem sido descritas para a detecção de bactérias causadoras de erliquiose. Os primers podem ser genéricos ou espécie-específicos e a técnica mais utilizada tem sido a Nested-PCR para o gene 16S. Porém, limitada variação de sequenciamento deste gene entre as bactérias do mesmo genogrupos propicia amplificação inespecífica.

Para uma melhor detecção do gênero *Ehrlichia* tem sido utilizado o gene *dsb*, considerado mais específico, como descrito por Aguiar e colaboradores (2007). Recentemente outra região do DNA (do gene *p28*) surgiu como alternativa para a detecção de *Ehrlichia sp* (NAKAGHI et al., 2010), aparentemente com a mesma confiabilidade.

Segundo Doyle (2005) o gene rRNA 16S é a região mais utilizada para a detecção de erliquiose, mas um padrão ouro ainda não foi estabelecido. O autor cita diferenças nos resultados da amplificação do gene *dsb* (considerado mais específico) e do gene 16S nas amostras testadas (positivas para 16S e negativas para *dsb*).

Em nosso estudo as seis amostras consideradas positivas na amplificação dos *pb* do gene 16S foram negativas na amplificação do gene *dsb*, mesmo tendo sido utilizada a Nested-PCR. Doyle (2005) cita como alternativas para explicar esses resultados uma baixa concentração de bactérias, pouca quantidade de DNA extraído ou perda de DNA durante o processo de congelamento e descongelamento para a realização das reações.

Como não foi possível quantificar o DNA extraído das amostras, não podemos afirmar qual seria a exata razão para as diferenças nos resultados obtidos na amplificação das duas regiões testadas.

As amostras de DNA extraído foram congeladas e descongeladas apenas uma vez para a Reação em Cadeia de Polimerase, portanto esta provavelmente não é a razão para o resultado obtido.

A presença de positividade para o gene *16S* do gênero *Ehrlichia* sugere potencial zoonótico, porém a identificação do patógeno infectante dependeria do sequenciamento do material, que pelas limitações acima descritas não foi realizado.

O fato de termos encontrado positividade apenas em amostras oriundas de cães que possuíam fêmeas de carrapatos presos à sua superfície corporal chama atenção, principalmente pelo fato de, ao contrário de alguns insetos, os machos de carrapatos também se alimentarem de sangue. Esse achado merece investigação futura em maior amostragem.

Sendo o gene *dsb* considerado muito específico para o gênero *Ehrlichia*, nossos resultados negativos podem indicar que a positividade apenas para o gene *16S* resulta da amplificação de DNA de uma bactéria da família *Anaplasmataceae* pertencente ao mesmo genogrupo da *Ehrlichia sp.*

## 8. CONCLUSÕES

- Demonstrou-se que, assim como em estudos realizados por outros pesquisadores, o carrapato vermelho do cão *Rhipicephalus sanguineus* é o mais comumente encontrado na área urbana do município.
- Nas amostras processadas não se detectou a presença de Rickettsias. Esse resultado está de acordo com a ausência de notificações de casos de febre maculosa no município estudado nos últimos anos (CVE-SES, 2011). Porém, essa ausência de notificações pode ser devida à falta de conhecimento acerca das riquetsioses e, portanto, a falta de elementos que sustentem a suspeita dessas enfermidades. Não podemos precisar a quantidade de casos não notificados, mesmo porque a sintomatologia de febre maculosa descrita em nossa região tende a ser branda, por estarmos em região onde a Rickettsia infectante é a *R. parkeri*.
- A positividade para o gene 16S do gênero Ehrlichia em seis amostras processadas, inclusive no carrapato da espécie *A. ovale* é sugestivo da presença de patógeno da família Anaplasmataceae do mesmo genogrupo da *Ehrlichia sp*, já que a região do gene *dsb* é muito específica para este patógeno.
- Será necessário dar continuidade às investigações acerca dos patógenos infectantes dos carrapatos no Município, principalmente neste momento em que há diversas mudanças no panorama habitacional do mesmo.
- Os cães podem ser considerados sentinelas para a ocorrência de riquetsioses e deve ser estimulada a notificação da ocorrência de carrapatos nos domicílios. Qualquer parasitismo humano por carrapatos deve ser notificado.
- Investigações futuras poderão esclarecer de forma mais assertiva as implicações dos achados deste estudo.



## 9. REFERÊNCIAS

AGUIAR, D. M. et al. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in Dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) Ticks from Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 44, n. 1, p. 126-132, 2007.

ALMEIDA, A. P. **Pesquisa de Rickettsia, Ehrlichia, Anaplasma, Babesia, Hepatozoon e Leishmania em Cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) de vida livre no estado do Espírito Santo**. Mestrado (Dissertação). Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP. 2011.

ALMOSNY, N. R. P. ***Ehrlichia canis* (DONATIEN & LESTOQUARD, 1935): Avaliação parasitológica, hematológica e bioquímica sérica da fase aguda de cães e gatos experimentalmente infectados**. 1998. 202p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 1998.

ALMOSNY, N. R. P. **Hemoparasitoses em Pequenos Animais Domésticos e como Zoonoses**. 1st. ed. Rio de Janeiro: L.F. Livros de Veterinária, 2002, 135 p.

ALLSOPP, B. A. Natural history of *Ehrlichia ruminantium*. **Veterinary Parasitology**, v. 167, n. 2-4, p. 123-135, 2010.

ANGERAMI, R. N. Clínica e epidemiologia das riquetsioses humanas no Estado de São Paulo. In: **XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA e II SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RIQUETSIOSES**. Ribeirão Preto, SP – 2006. **Resumos**. p.95.

ANGERAMI, R. N.; RESENDE, M. R.; FELTRIN, A. F. C.; KATZ, G.; NASCIMENTO, E. M.; STUCCHI, R. S. B.; SILVA, L. J. Brazilian Spotted Fever: A Case Series from a Endemic Area in Southeastern Brazil – **Clinical Aspects**. **Annals New York Academy Sciences**, v. 1078, p. 252-254, 2006.

ANGERAMI, R. N. et al. Human Ehrlichiosis diagnosed by nested-PCR, the first four confirmed cases in Brazil. **Int. J. Infect. Dis.** 2006. 10 (suppl I): S199, abstract 39017.

ARZUA, M. et al. *Amblyomma aureolatum* and *Ixodes auritulus* (Acari:Ixodidae) on birds in southern Brazil, with notes on their ecology. **Exp. Appl. Acarol.** n. 31(3-4). p. 283-296, 2003.

BALASHOV, Y. S. A translation of blood-sucking ticks (Ixodoidea)-vectors of diseases of man and animals. **Misc. Publicat. Entomol. Soc. Am.**, v. 8, p. 159-376, 1972.

BARBIERI, A. R. M. **Aspectos epidemiológicos da febre maculosa da Mata Atlântica em um foco endêmico no município de Blumenau, Santa Catarina.** Mestrado (Dissertação). Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP. 2012.

BARCI, L. A. G.; NOGUEIRA, A. H.C. **Febre maculosa brasileira.** 2006. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <<http://www.infobibos.com/artigos/febremaculosa/febremaculosa.htm>>. Acesso em: 31/1/2013.

BARRÉ, N.; UILENBERG, G. Spread of parasites transported with their hosts: case study of two species of cattle tick. **Revue Scientifique et Technique**, v. 29, n. 1, p. 149-160, 2010.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M; BECHARA, G. H. **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies.** São Paulo, Vox/ICTTD – 3 – Butantan, 2006. 223p.

BIBERSTEIN, E. L.; HIRSH, D. C. Agentes Rickettsiais de doenças animais; as Riquetsias. In: HIRSH, D. C; ZEE, Y. C. (Ed.). **Microbiologia Veterinária.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 273-275.

BISCHOF, R.; ROGERS, D. G. Serologic Survey of Selected Infectious Diseases in Coyotes and Raccoons in Nebraska. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 41, n. 4, p. 787–791, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos\\_conf\\_febre\\_maculosa\\_br\\_unidad\\_es1997\\_2011.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_conf_febre_maculosa_br_unidad_es1997_2011.pdf). Acesso em 10 de julho de 2012.

BURGDORFER, W. et al. *Rhipicephalus sanguineus*: Vector of a New Spotted Fever Group *Rickettsia* in the United States. **Infection and Immunity**, p. 205-210, July, 1975.

BURGDORFER, W. Ecological and epidemiological considerations of Rocky Mountain Spotted Fever and Scrub Typhus, p. 33-50. In D. H. Walker (ed), **Biology of rickettsial diseases**, vol. 1. CRC, Inc., Boca Raton, FL, 1988.

BUSTAMANTE, M. E.; VARELA, G. Distribucion de las rickettsiasis en Mexico. *Revista del Instituto de la Salud y Enfermedades Tropicales*, v. 8, p. 3-14, 1947.

CALIC, S. B. et al. Human Ehrlichioses in Brazil: First Suspect Cases. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**.v.8, n.3, p.259-262, 2004.

CAMER, G. A.; LIM, C. W. Detection of spotted fever and typhus group rickettsial infection in wild raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides koreensis*) in Chonbuk Province, Korea.**Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 39, n. 2, p. 145-147, 2008.

CARDOSO, L. D. et al. Caracterização de *Rickettsia* spp circulante em foco silencioso de febre maculosa brasileira no Município de Caratinga, Minas Gerais, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Mar 2006, vol.22, no.3, p.495-501.

COOKSEY, L. M.; HAILE, D. G; MOUNT, G. A. Computer Simulation of Rocky Mountain Spotted Fever Transmission by the American Dog Tick (Acari:Ixodidae).**J. Med. Entomol.** vol. 27 p. 671-680, 1990.

COSTA, P. S. G. et al. More about Human Monocytotropic Ehrlichiosis in Brazil: serological evidence of nine new cases. **Brazilian J Infect Dis** 2006; 10(1).

CUBATÃO. Portal da cidade. Disponível em: [www.cubatão.sp.gov.br](http://www.cubatão.sp.gov.br). Acesso em 14/02/2013.

CUBATÃO. Decreto Municipal nº 9.410 de 15 de setembro de 2009. Declara como Unidades Espaciais de Pesquisa e Estatística (UEPEs) do Município de Cubatão e dá outras providências.

CUNHA, N. et al. First identification of natural infection of *Rickettsia rickettsii* in the *Rhipicephalus sanguineus* tick, in the State of Rio de Janeiro. **Pesq. Vet. Bras.** 29(2):105-108, fevereiro 2009.

DANTAS-TORRES, F. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 39(1):64-67, jan-fev, 2006.

DANTAS-TORRES, F. Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasites & Vectors**, v.1, n.25, p. 1-17, 2008.

DANTAS-TORRES, F. ***Rhipicephalus sanguineus* e a Epidemiologia da Leishmaniose Visceral Canina no Estado de Pernambuco**. Doutorado em Saúde Pública (Tese). Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2009.

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites and Vectors**, v.3, p. 3-14, 2010.

DAVIDSON, W. R. et al. Susceptibility of red and gray foxes to infection by *Ehrlichia chaffeensis*. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 35, n. 4, p. 696–702, 1999.

DEMMA, L. J. et al. Rocky Mountain Spotted Fever from an unexpected tick vector in Arizona. **New England Journal Medicine**, v. 353, p. 587-594, 2005.

DOYLE, C. K. et al. Detection of Medically Important *Ehrlichia* by Quantitative Multicolor TaqMan Real-Time Polymerase Chain Reaction of the *dsb* Gene. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 7, n. 4, 2005.

DUMLER, J. S. et al. 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 'HE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 2145–2165, 2001.

FISHMAN, Z. et al. A serosurvey of *Hepatozoon canis* and *Ehrlichia canis* antibodies in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from Israel. **Veterinary Parasitology**, v. 119, p. 21–26, 2004.

FONSECA, F. Validade da espécie e ciclo evolutivo de *Amblyomma striatum* KOCH, 1844 (Acarina, Ixodidae). **Memórias do Inst. Butantan**, v.9, p. 43-58, 1936.

FONSECA, A. H. Patogenia dos carrapatos nos animais e nos seres humanos. **Revista CFMV Suplemento Técnico** N° 19, Jan/Fev./Mar/Abr. Págs 34-38, 2000.

FRANCISCHETTI, I. M. B. et al. The Role of Saliva in Tick feeding. **NIH Public Access**, Front Biosci.; 14: 2051-2088, 2010.

GALVÃO, M. A. M. **Febre Maculosa em Minas Gerais: um estudo sobre a distribuição da doença no estado e seu comportamento em área de foco periurbano**. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1996.

GALVÃO, M. A. M. et al. Riquetsioses emergentes e reemergentes numa região endêmica do Estado de Minas Gerais., Brasil. **Cad. Saúde Pública**.;18: 1593-7, 2002.

GALVÃO M. A. M. Erliquiose Humana no Brasil. **XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA e II SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RIQUETSIOSES**. Ribeirão Preto, SP – 2006. **Resumos** p.162.

GARCÍA-GARCÍA et al. Case Report: A Patient from Argentina Infected with *Rickettsia massiliae*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 82(4), pp. 691-692, 2010.

GATTO BRITTO, L. et al. **Bio-ecologia, importância médico-veterinária e controle de carrapatos, com ênfase no carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. Porto Velho: Embrapa Rondonia, 2006–Documentos / Embrapa Rondonia, ISSN 0677-8618; 104.21 p.

GLADNEY, W. J.; DRUMMOND, R. O. Mating behavior and reproduction of the lone star tick, *Amblyomma americanum*. **J.Econ.Entomol.** vol. 63, p. 1036-1039, 1970.

GOMES, L. S. Thypho exanthematico de São Paulo. **Brasil-Medico** vol. 17, n. 52, p. 919-921, 1933.

GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. In: 3. ed. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier, 2006. 1387 p.

GUGLIELMONE, A. A. et al. *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) and *Amblyomma ovale* Kock, 1844: hosts, distribution and 16S rDNA sequences. **Vet. Parasitol.** vol. 113, p. 273-288, 2003.

GUGLIELMONE, A. A. et al.; A. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Experimental and Applied Acarology**, v. 40, p. 83–100, 2006.

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**, v. 100, p. 841-848, 2005.

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

HORTA, M. C. et al. *Rickettsia* infection in five areas of the state of São Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 7 Nov. 2007.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/resultados\\_dou/SP2010.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/resultados_dou/SP2010.pdf). Acesso em 15/02/2013.

INOKUMA, H.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Detection of *Ehrlichia platys* DNA in Brown Dog Ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 4219–4221, 2000.

KAUFMAN, W. R. tick-host interaction: A Synthesis of Current Concepts. **Parasitology Today**, v. 5, p. 47-56, 1989.

KELLY, D. J. et al. The seroprevalence of Rickettsia, Ehrlichia, Dengue and Leptospira in an apparently healthy Brazilian population. **American society of Tropical Medicine and Hygiene Meeting**, 1997.

LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C. Febre Maculosa: Aspectos clínico-epidemiológicos. **Clinica Veterinária**, v. 12, p. 19-23, 2001.

LABRUNA, M. B. et al. Prevalência de carrapatos em cães de áreas rurais da região norte do Estado do Paraná. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 53, n. 5, p. 553-556, 2001.

LABRUNA, M. B. et al. Rickettsia species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an endemic area for Brazilian spotted fever in the state of São Paulo, Brazil, v. 42, n. 1, p. 90-98, 2004a.

LABRUNA, M. B. et al. Molecular evidence for a spotted fever group Rickettsia species in the tick *Amblyomma longirostre* in Brazil. **J. Med. Entomol.**, v. 41, n. 3, p. 533-537, 2004b.

LABRUNA, M. B. et al. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the state of Rondonia, Western Amazon, Brazil. **J. Med. Entomol.** v. 41, n. 6, 2004c.

LABRUNA, M. B. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. **Memórias do Inst. Oswaldo Cruz**, 100(8):841-845, 2005.

LABRUNA, M. B. et al. Ticks (Acari:Ixodidae) in wild carnivores in Brazil. **Exp. Appl. Acarol.** vol. 36, n.1-2, p. 149-163, 2005b.

LABRUNA, M. B. et al. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* from *Haemaphysalis juxtakochi* ticks in the state of São Paulo, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 3, p. 869-873, 2007a.



LABRUNA, M.B. et al. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 143, p.189-195, 2007b.

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

LABRUNA, M. B. et al. Experimental Infection of *Amblyomma aureolatum* Ticks with *Rickettsia rickettsii*. **Emerging Infectious Diseases** • www.cdc.gov/eid • Vol. 17, No. 5, May 2011.

LABRUNA, M. B. et al.; Riquetsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. **Rev. MVZ Córdoba** 16 (2): 2435-2457, Aug 2011.

LEMONS-MONTEIRO, J.; FONSECA, F.; PRADO, A. Typho Exantemático de São Paulo – Pesquisa do vírus em alguns arthropodos sob condições naturais. **Brasil-Médico**, v. 16, n. 8, P. 170-172, 1932b.

LIMA, V. L. C. et al. Situação da febre maculosa na Região Administrativa de Campinas, São Paulo, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Fev 2003, vol.19, no.1, p.331-334.

LÓPEZ, J. et al. Serologic evidence for human Ehrlichiosis in Chile. **Revista Médica de Chile**, v. 131, n. 1, p. 67-70, 2003.

LOUW, M.; ALLSOPP, M. T. E. P.; MEYER, E. C. *Ehrlichia ruminantium*, an emerging human pathogen – a further report. **South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde**, v. 95, n. 12, p. 948-950, 2005.

LUNDGREN, D. L.; THORPE, B. D.; HASKELL, C. D. Infectious Diseases in Wild Animals in Utah: Experimental Infection of Birds with Rickettsia rickettsii. **J. Bacteriol.** vol. 91, p. 963-966, 1966.

MACHADO, R. Z. Eriquiiose nos animais domésticos e silvestres do Brasil. **XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA e II SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RIQUETSIOSES**. Ribeirão Preto, SP – 2006. **Resumos** p.163.

MARTÍNEZ, M. C. et al. *Ehrlichia chaffeensis* in child, Venezuela. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 3, p. 519-520, 2008.



MASSARD, C. L., FONSECA, A. H. Carrapatos e doenças transmitidas comuns ao homem e aos animais. *A Hora Veterinária* 135(1): 15-23, 2004.

MEDEIROS, A. P.; SOUZA, A. P.; DE MOURA, A. B.; LAVINA, M. S.; BELLATO, V.; SARTOR, A. A.; NIERI-BASTOS, F. A.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. 2011. Spotted fever group Rickettsia infecting ticks (Acari: Ixodidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 8, p. 926-930, 2011.

MERHEJ, V.; RAOULT, D. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. **Biological Reviews**, v. 86, p. 379-405, 2011.

MOORHOUSE, D.E.; TATCHELL, R. J. The feeding process of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini). A study of host-parasite relations. Part I Attachment to the Host. **Parasitology**, v. 56, p. 623-632, 1996.

MORO, P.L. et al. Short Report: Serologic Evidence of Human Ehrlichiosis in Peru. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 80(2), pp. 242-244, 2009.

NAKAGHI, A. C. H. et al. Sensitivity evaluation of a single-step PCR assay using *Ehrlichia canis p28* gene as a target and its application in diagnosis of canine ehrlichiosis. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** (Online) vol.19 no.2 Jaboticabal Apr./June 2010.

NIEBYLSKI, M. L., PEACOCK, M. G.; SCHWAN, T. G. Lethal effect of *Rickettsia rickettsii* on its tick vector (*Dermacentor andersoni*). **Appl. Environ. Microbiol.** vol. 65, p. 773-778, 1999.

OLANO, J. P. Rickettsial infections. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1063, p. 187-196, 2005.

OLIVEIRA, R. P. et al. *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides* spp. fleas, Brazil. **Emerg Infect Dis.** 8:317-9, 2002.

PACHECO, R. et al. Infección por rickettsia en capibaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) de São Paulo, Brasil: evidencia serológica de infección por *Rickettsia bellii* y *Rickettsia parkeri*. **Biomédica**, Bogotá v. 27 n. 3, Sept. 2007.

PACHECO, R. C.: Zoonoses transmitidas por carrapatos. In: **XXXV SEMANA CAPIXABA DO MÉDICO VETERINÁRIO E III ENCONTRO REGIONAL DE SAÚDE PÚBLICA EM MEDICINA VETERINÁRIA - SETEMBRO DE 2008 - GUARAPARI, E.S. Resumos.**

PADDOCK, C. D. et al. Rocky Mountain spotted fever in Argentina. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, p. 687-692, 2008.

PATINO-CAMARGO, L. Nuevas observaciones sobre un tercer foco de fiebre petequial (maculosa) en el hemisferio americano. Boletín De la Oficina Sanitaria Panamericana, v. 20, p. 1112-1124, 1941.

PEREZ, C. A. **Epidemiologia e controle do carrapato-estrela, *Amblyomma Cajennense* (Fabricius) em áreas endêmicas para febre maculosa. . XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA – Uberlândia, 24 a 29/08/2008. Resumos.**

PEREZ, M. et al. Human infection with Ehrlichia canis accompanied by clinical signs in Venezuela. **Annals of the New York Academy Science**, v. 1078, p. 110-117, 2006.

PHILIP, R. N. et al. Serologic typing of rickettsiae of the spotted fever group by microimmunofluorescence. **J. Immunol.**, v. 121, p. 1961-1968, 1978.

PINTER, A. et al. Study of the Seasonal Dynamics, Life Cycle, and Host Specificity of *Amblyomma aureolatum* (Acari:Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**.vol.41, n. 3, p. 324-332, 2004.

PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Ann. N. Y. Academy of Science**. 2006.

PINTER, A. **Aspectos ecológicos da Febre Maculosa Brasileira em um Foco Endêmico no Estado de São Paulo**. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2007.

PINTER, A. Ecologia da Febre Maculosa Brasileira. **XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA – Uberlândia, 24 a 29/08/2008. Resumos.**

PINTER, A. et al. 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**, Feb 2008, vol.24, no.2, p.247-252.

PIRANDA, E. M. **Estudos biológicos de *Rhipicephalus sanguineus* e interação *Rickettsia rickettsii*, *R. sanguineus* e cães em condições**

**laboratoriais.** Tese (Doutorado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2008.

PREZIOSI, D.E.; COHN, L.A. The increasingly complicated story of *Ehrlichia*. **Compend. Cont. Educ. Pract. Vet.**, 24: 277-288, 2002.

RANDOLPH, S. E. Ticks are not insects: Consequences of Contrasting Vector biology for Transmission potential. **Parasitol.Today**, v. 14, p. 186-192, 1998.

RAOULT, D.; ROUX, V., Rickettsioses as Paradigms of New or Emerging Infectious Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n.4, p. 694-719, 1997.

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. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 1576-1586, 1991.

REGNERY, R. L.; SPRUILL, C.L.; PLIKAYTIS, B.D. Differentiation of Spotted Fever Group Rickettsiae sequencing and analysis of Restriction Fragment Length Polymorphism of PCR-Amplified DNA of the gene encoding the protein rOmpA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 2058-2065, 1996.

RIBEIRO, J.M.C. The role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Ann. Rev. Entomol.**, v. 32, p. 463-478.

RIPOLL, C. M. Evidence of Rickettsial spotted fever and Ehrlichial infections in a subtropical territory of Jujuy, Argentina. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 2, p.3 50-354, 1999.

RODANICHE, E. C. Natural infection of the tick *Amblyomma cajennense* with *Rickettsia rickettsii* in Panama. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 2, p. 696-699 1953.

RODRIGUES, D. S. et al. Biology of *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) on some laboratory hosts in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 6, p. 853-586, 2002.

SABATINI, G. S. **Pesquisa de carrapatos e Riquetsias no Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Itutinga-Pilões, SP.** Mestrado (Dissertação). Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2010.

SAHNI, S. K.; RYDKINA, E. Host-cell interactions with pathogenic Rickettsia species. **Future Microbiology**, v. 4, p. 323-339, 2009.

SÃO PAULO (Estado). Lei nº 12.916, de 16 de Abril de 2008. Dispõe sobre o controle da reprodução de cães e gatos e dá providências correlatas. Disponível em: <http://www.felicianofilho.com.br/2010/lei12916.html>. Acesso em 13/02/2013.

SÃO PAULO (Estado). Lei Complementar nº 815, de 30 de julho de 1996. Cria a Região Metropolitana da Baixada Santista e autoriza o Poder Executivo a instituir o Conselho de Desenvolvimento da Região Metropolitana da Baixada Santista, a criar entidade autárquica a construir o Fundo de Desenvolvimento Metropolitano da Baixada Santista, e dá providências correlatas.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado do Meio Ambiente. Programa de Recuperação Socioambiental da Serra do Mar. Disponível em: <http://www.fflorestal.sp.gov.br/serramarbid.php>. Acesso em 27/09/2012.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado da Saúde. Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN). **Manual de Vigilância Acarológica**. Coordenação Vera Lucia Fonseca de Camargo-Neves. Vários autores -- São Paulo. 2004. 62 p.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado da Saúde. Boletim Epidemiológico Paulista. Vol. 8, n. 1. Febre Maculosa Brasileira. Vários autores – São Paulo. 2011. 31 p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância Epidemiológica Nacional da Febre Maculosa Brasileira e outras Riquetsioses. Março de 2011. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/febre\\_maculosa\\_de\\_a\\_z\\_16\\_03\\_11.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/febre_maculosa_de_a_z_16_03_11.pdf). Acesso em 14/02/2013.

SILVA L. J. Doenças Transmitidas por Carrapatos em Humanos: Ocorrência, distribuição e impacto em saúde pública, com ênfase no Estado de São Paulo. In: **CONSULTA DE ESPECIALISTAS OPAS/OMS SOBRE RIQUETSIOSES NAS AMÉRICAS – Relatório Final**, p. 22–30, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil, 18-19 de setembro de 2004.

SILVA, L. J. Riquetsioses no Brasil. **XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA e II SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RIQUETSIOSES**. Ribeirão Preto, SP – 2006. Resumos p. 106.

SILVEIRA, I. et al. *Rickettsia parkeri* in Brazil. **Emerging Infectious Diseases** 7 (13):1111-1113, 2007.

SKOTARCZAK, B. Canine Ehrlichiosis. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 10, n. 2, p. 137-141, 2003.

SOUZA, B. M. P. S. et al. Prevalence of Ehrlichial infection among dogs and ticks in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 2, p. 89-93, 2010.

SPOLIDORIO, M. et al. Survey for Tick-Borne Zoonoses in the State of Espírito Santo, Southeastern Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 1, p. 201–206, 2010.

SZABÓ, M. P. J. et al. Ticks (Acari: Ixodidae) parasitizing humans in an Atlantic rainforest reserve of Southeastern Brazil with notes on host suitability. **Exp Appl Acarol.** v. 39, p. 339-346, 2006.

SZABÓ, M. P. J. Carrapatos, Biodiversidade e Enfermidades Emergentes. Exposição oral. In: **XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA** – Uberlândia, 24 a 29/08/2008. **Resumos.**

SZABÓ, M. P. J. et al. Biology and life cycle of *Amblyomma incisum* (Acari: Ixodidae). **Exp Appl Acarol.**v.48, p. 263-271, 2009a.

SZABÓ, M. P. J. et al. Ecological aspects of free-living ticks (Acari: Ixodidae) on animal trails in an Atlantic rainforest of Southeastern Brazil. **Ann Trop Med Parasitol** v. 103, n. 1, 57-72, 2009b.

TRAPP, S. M. et al. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Veterinary Parasitological**, v. 140, p. 223-230, 2006.

TRAVASSOS, J.; VALLEJO-FREIRE, A. Comportamento de alguns cavídeos (*Cavia aperea* e *Hydrochoerus capybara*) às inoculações experimentais do vírus da febre maculosa. Mem. Inst. Butantan. v. 15, p. 73-86, 1942.

VALLEJO-FREIRE, A. Transmissão do vírus da febre maculosa mexicana por *Amblyomma striatum* Koch, 1944. Mem. Inst. Butantan. v. 20, p. 107-112, 1947.

WALKER, J. B.; OLWAGE, A. The tick vectors of *Cowdria ruminantium* (*Ixodoidea*, *Ixodidae*, genus *Amblyomma*) and their distribution. **The Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 3, p. 353-379, 1987.

WEISS, E; MOULDER, J. W.; The Rickettsias and Chlamydias. In: KREIG, N.R.; HOLT, J.G. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984, v. 1, p. 687-739.

**ANEXO**  
**TERMO DE PARCERIA PARA UTILIZAÇÃO DO**  
**LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DA**  
**FUNDAÇÃO LUSÍADA**



## CENTRO UNIVERSITÁRIO LUSIADA

Santos, 17 de abril de 2012.

A aluna Monica Luzia de Arruda Botelho, faz parte de um projeto de pesquisa conjunto UNISANTOS / UNILUS, intitulado "PESQUISA DE CARRAPATOS E AGENTES TRANSMITIDOS POR CARRAPATOS EM CÃES NO MUNICÍPIO DE CUBATÃO - ESTADO DE SÃO PAULO"; sendo que parte de sua dissertação de mestrado, especificamente a realização dos exames de Biologia Molecular, serão realizados no Laboratório de Biologia Molecular – UNILUS, sobre minha coordenação.

Respeitosamente,

Prof. Dr. Marcos Montani Caseiro

Responsável pelo Laboratório de Biologia Molecular – UNILUS