



**CRISTIANE APARECIDA MOREIRA MESQUITA**

**INFERÊNCIA SOROLÓGICA DE ESPÉCIES DA ORDEM  
RICKETTSIALES DE IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA  
EM CÃES NO SUL DE MINAS GERAIS.**

**LAVRAS – MG**

**2019**

**CRISTIANE APARECIDA MOREIRA MESQUITA**

**INFERÊNCIA SOROLÓGICA DE ESPÉCIES DA ORDEM RICKETTSIALES DE  
IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA EM CÃES NO SUL DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária, área de concentração em Sanidade Animal e Saúde Coletiva, para obtenção do título de Mestre.

Prof(a). Dr(a). Christiane M. B. M. Rocha  
Orientador (a)

Prof. Dr. Antônio Marcos Guimarães  
Coorientador:

**LAVRAS- MG**

**2019**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Mesquita, Cristiane Aparecida Moreira.  
Inferência Sorológica de Espécies da Ordem Rickettsiales de  
Importância em Saúde Pública em Cães no Sul de Minas Gerais /  
Cristiane Aparecida Moreira Mesquita. - 2019.  
46 p.

Orientador(a): Christiane Maria Barcellos Magalhães da Rocha.  
Coorientador(a): Antônio Marcos Guimarães.  
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2019.  
Bibliografia.

1. Rickettsia spp. 2. Anaplasma phagocytophilum. 3. Reação de  
Imunofluorescência Indireta. I. Rocha, Christiane Maria Barcellos  
Magalhães da. II. Guimarães, Antônio Marcos. III. Título.

**CRISTIANE APARECIDA MOREIRA MESQUITA**

**INFERÊNCIA SOROLÓGICA DE ESPÉCIES DA ORDEM RICKETTSALES DE  
IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA EM CÃES NO SUL DE MINAS GERAIS**

**SEROLOGICAL INFERENCE OF SPECIES OF ORDER RICKETTSALES OF  
IMPORTANCE IN PUBLIC HEALTH IN DOGS IN SOUTH MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária, área de concentração em Sanidade Animal e Saúde Coletiva, para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 25 de outubro de 2019.

Dr. Antônio Marcos Guimarães - UFLA

Dra. Elizângela Guedes - Unifenas

Dr. Gino Chaves da Rocha – FAV/UnB

Dr. Júlia Angélica Gonçalves Silveira – ICB/UFMG

Prof(a). Dr(a). Christiane M. B. M. Rocha

Orientador (a)

Prof. Dr. Antônio Marcos Guimarães

Coorientador:

**LAVRAS - MG  
2019**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, por todas as bênçãos e por me dar exatamente o que preciso na hora certa.

À minha família, especialmente a minha filha, por tentar entender as ausências da mãe e sempre me receber com um sorriso quando chego, me fazendo perceber que tudo vale a pena.

À prof. Dra. Christiane M. B. M da Rocha, minha orientadora, por ter me aceitado como sua orientada. Pelo carinho, paciência e orientação, não só no desenvolvimento deste trabalho, mas pela orientação na vida.

Ao prof. Dr. Antônio Marcos, pelo carinho e suavidade com que me conduziu no desenvolvimento do trabalho. Por me apresentar as riquétias.

Ao prof. Dr. Gino Chaves da Rocha pelas dicas.

Aos demais membros da banca (Dra. Elizângela Guedes e Dra. Júlia A. G. Silveira) pelo carinho com que corrigiram o trabalho.

Às pessoas que sempre estiveram presentes na minha vida acadêmica e pessoal, em especial a minha mãe, meus irmãos, ao Márcio A. P do Carmo, e aos meus amigos Dircéia A. da Costa Cústodio, Yuly Andrea Caicedo, Verônica Castro Perez, Izabela Gattini, Mirian Silvia Braz, Marina Rosa, Dênis Lúcio e demais integrantes do Núcleo de Estudos Saúde Única e Laboratório de Epidemiologia.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária e à Universidade Federal de Lavras pela oportunidade e apoio durante o mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), código de financiamento 001, por me proporcionar apoio financeiro durante o desenvolvimento do trabalho.

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse grande sonho. Muito obrigada!

“A sabedoria de um homem não está em não errar, chorar, se angustiar e se fragilizar, mas em usar seu sofrimento como alicerce de sua maturidade”  
Augusto Cury

## RESUMO

Doenças causadas por bactérias da ordem Rickettsiales são um grande desafio para saúde pública. Alta taxa de letalidade pode estar associada ao desconhecimento dos profissionais de saúde sobre histórico clínico-epidemiológico do paciente e a circulação destes na área geográfica. Isso pode levar a um diagnóstico e tratamento tardios. Os cães são hospedeiros dos carrapatos e, podem ser sentinelas para zoonoses. Portanto, investigar a presença de anticorpos anti-riquétsia e anti-anaplasma em cães é importante em regiões sem registro de casos humanos. Esse estudo teve como objetivo determinar a presença de patógenos da ordem Rickettsiales circulantes no município de Lavras/MG, considerando que não há relatos de casos animais e/ou humanos na região. Sua importância epidemiológica está em ser uma cidade universitária e pólo para a região em que circulam pessoas do Brasil inteiro e do exterior. Utilizou-se um banco de soros caninos armazenados no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras coletados em 2010. Foram testados por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) os 99 soros coletados de cães da zona urbana e 100 da zona rural para pesquisa de anticorpos anti-*Rickettsia amblyommatis*, *R. belli*, *R. parkeri*, *R. rickettsii* e *Anaplasma phagocytophilum*. Foi realizada análise descritiva de todas as variáveis, e testada associação entre cada diagnóstico com a área urbana/rural, sexo e idade pelo teste do qui-quadrado, considerando significância estatística de  $p < 0,05$  e calculadas as *odds ratio* com intervalo de confiança de 95%. Títulos iguais ou superiores a 1:64 e 1:320 foram considerados positivos para riquetésias e *A. phagocytophilum*, respectivamente. No caso de testes positivos para mais de uma riquetésia, foi considerado como diagnóstico mais provável o agente com título final quatro vezes superiores aos outros na RIFI. Das amostras, 61,8% (123/199) foram soropositivas para riquetésias. Destas, 26,0% (32/123) apresentaram reação para mais de uma espécie: dez foram considerados como provável para *R. parkeri* e uma como *R. rickettsii*, o restante foi considerado como coinfeção. A espécie *R. rickettsii* apresentou maior taxa de coinfeções 71,9% (23/32) com títulos que variaram de 1/64 a 1/256. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as áreas, sexo ou idade. Considerando por espécies, apenas soropositivos para *R. parkeri* e *R. belli* apresentaram diferença significativa entre áreas. Na análise da estimativa de risco (*OR*), cães da área urbana apresentaram 5,16 (IC=0,13 a 0,85) vezes mais chance de soropositividade para *R. parkeri* ( $p=0,037$ ) e 3,39 (IC=0,27 a 0,96) vezes para *R. belli* ( $p=0,017$ ), quando comparados aos animais da zona rural. Quanto à pesquisa sorológica relacionada ao *A. phagocytophilum*, 19,1% (38/199), foram reativos quando considerado o ponto de corte 1:40, porém somente dois soros (1%), ambos da zona rural, foram positivos com título final quatro vezes superior ao ponto de corte, descartando uma possível reação cruzada com *A. platys*. Um dos soros positivos para *A. phagocytophilum*, também foi reativo a *R. parkeri*. Os resultados indicam a circulação de bactérias da ordem Rickettsiales em Lavras/MG, com cães soropositivos para *R. parkeri*, *R. rickettsii*, *R. belli*, *R. amblyommatis* e *A. phagocytophilum*, nesta ordem de frequência. Alguns com frequência semelhante a regiões endêmicas no Brasil. Consequentemente, pela ausência de casos clínicos pode-se inferir que a região é área silenciosa para Febre Maculosa Brasileira e Anaplasmoose Granulocítica Humana Deve-se considerar o risco e a necessidade da adoção de medidas de vigilância de ambientes para diagnóstico precoce de possíveis casos humanos.

**Palavras Chaves:** *Rickettsia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, Reação de Imunofluorescência Indireta, epidemiologia de infecções transmitidas por carrapatos

## ABSTRACT

Diseases caused by bacteria of the order Rickettsiales are a great public health challenge. A high fatality rate may be associated with health professionals' lack of knowledge about the patient's clinical and epidemiological history and their circulation in the geographical area. The high lethality is associated to late diagnosis and treatment. Dogs are host to ticks and can be sentinels to zoonosis. Therefore, so investigating the presence of anti-rickettsia and anti-anaplasma antibodies in these is important in regions with no recorded human and animal cases. This study aimed to determine the presence of circulating Rickettsiales pathogens in the city of Lavras / MG. This is a university city and have a great important to commerce in the region. There is almost people the all states of Brazil and immigrants. A bank of canine serums stored in the the Department of Veterinary Medicine at the Federal University of Lavras, collected in 2010 was used. Serums of 99 urban and 100 rural dogs were tested by Indirect Immunofluorescence Reaction (IFAT) for anti-*Rickettsia amblyommatis* antibodies, *R. belli*, *R. parkeri*, *R. rickettsii* and *Anaplasma phagocytophilum*. Descriptive analysis of all variables was performed, and the association between each diagnosis with urban/rural area, gender and age were tested by the chi-square test. Considered the statistical significance of  $p < 0.05$ . Are calculated odds ratios with a confidence interval of 95%. Titers equal or greater than 1:64 and 1: 320 were considered positive for rickettsiae and *A. phagocytophilum*, respectively. In the case of more than one positive rickettsiae, the final titer agent was four times higher than the others in the IFAT was considered as the most likely diagnosis. Of the samples, 61.8% (123/199) were seropositive for rickettsiae. Of these, 26.0% (32/123) had a reaction for more than one species: ten were considered probable for *R. parkeri* and one as *R. rickettsii*, the remainders were considered as coinfection. The *R. rickettsii* species had the highest rate of coinfections 71.9% (23/32) with titers ranging from 1/64 to 1/256. There was no significant difference ( $p > 0.05$ ) among areas, gender or age. In this comparison by species, only seropositive for *R. parkeri* and *R. belli* showed significant differences between areas,  $p = 0.037$  and  $p = 0.017$ , respectively. In the analysis of the risk estimate (OR), dogs from the urban area had 5.16 (CI = 0.13 to 0.85) times more chance of seropositivity for *R. parkeri* and 3.39 (CI = 0.27 to 0.96) times for *R. belli* compared to rural animals. Regarding the serological research related to *A. phagocytophilum*, 19.1% (38/199) were reactive when considering the 1:40 cutoff point, but only two sera (1%), both from rural areas, were positive with titer four times the cut-off point, ruling out a possible cross-reaction with *A. platys*. One of the sera positive for *A. phagocytophilum* was also reactive to *R. parkeri*. The results indicate there is circulation of bacteria of the order Rickettsiales in Lavras/ MG with dogs seropositive for *R. parkeri*, *R. rickettsii*, *R. belli*, *R. amblyommatis* and *A. phagocytophilum*, in this frequency order. Some of it has a similar frequency in others endemic regions in Brazil. Consequently, due to the absence of clinical cases, it can be inferred that the region is a silent area for Brazilian Macular Fever and Human Granulocytic Anaplasmosis. The risk and the need to adopt environmental surveillance measures for early diagnosis of possible human cases should be considered.

**Keywords:** *Rickettsia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, Indirect Immunofluorescence Reaction, epidemiology of tick-borne infections

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1	Ordem Rickettsiales.....	12
2.2	<i>Rickettsia</i> spp. ....	13
2.3	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> .....	18
2.4	Animais Sentinelas.....	20
2.5	Reação De Imunofluorescência Indireta .....	22
3	MATERIAL E MÉTODO .....	23
3.1	Área de Estudo.....	23
3.2	Banco de Soros Caninos .....	23
3.3	Amostragem.....	23
3.4	Reação de Imunofluorescência.....	24
3.5	Análise Estatística.....	25
4	RESULTADOS.....	25
5	DISCUSSÃO.....	29
6	CONCLUSÃO.....	35
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

## 1 INTRODUÇÃO

Doenças causadas por patógenos da ordem Rickettsiales e vetoradas por carrapatos têm sido um grande desafio para a saúde pública, pois por muito tempo foram negligenciadas. O fato dos sintomas serem inespecíficos torna o diagnóstico difícil, ocasionando uso de terapias inadequadas, que podem agravar os casos e levar a morte dos pacientes. Além disso, fatores como a alta taxa de letalidade, como é o caso das riquetsias, pode ser associado à falta de conhecimento dos profissionais de saúde sobre as características clínico epidemiológicas das doenças, ao histórico do paciente e ao desconhecimento de zonas endêmicas para cada uma delas (OLIVEIRA et al., 2016). Há diversas áreas consideradas silenciosas em que ocorre a circulação desses agentes, porém sem diagnóstico das doenças. Apesar de responderem bem ao tratamento, é necessário que esse seja estabelecido precocemente, antes do diagnóstico definitivo laboratorial (BLANTON, 2016). O principal meio de prevenção ainda é evitar a exposição a locais infestados por carrapatos, principalmente em áreas consideradas endêmicas. Caso ocorra o contato com o vetor, este deve ser retirado o mais rapidamente possível do corpo, reduzindo assim a possibilidade de ocorrer à infecção. O médico deve ser alertado do contato com carrapatos ou animais, para que suspeite dessas doenças (CARRADE et al., 2009).

Consideradas como patógenos emergentes com ampla distribuição global, *Rickettsia* spp. e *Anaplasma* spp. pertencem a ordem Rickettsiales, que é dividida nas famílias Rickettsiaceae e Anaplasmataceae, onde estão incluídos os gêneros *Rickettsia* e *Anaplasma*, respectivamente (BLANTON, 2016; DUMLER et al., 2001; THOMAS et al., 2016). No gênero *Rickettsia* estão os agentes de diversas doenças, que atingem diferentes espécies de animais e humanos, como a Febre Maculosa. Esta é uma zoonose que foi identificada pela primeira vez em Idaho/EUA em 1906, pelo pesquisador Howard Taylor Ricketts, que apontou o carrapato como seu principal vetor e denominou a doença como Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (MARTINS et al., 2016; SUCEN, 2011), por ser o foco natural principal da doença nos EUA. É causada, principalmente, pela espécie *Rickettsia rickettsii*. Outras espécies do mesmo grupo da Febre Maculosa, como *R. parkeri* e *R. amblyommatis* também são apontadas como agentes de infecção, apesar destas serem associadas com manifestações mais brandas, quando comparada a primeira (APPERSON et al., 2008; BLANTON, 2016; PADDOCK et al., 2004; KRAWCZAK et al., 2016 a). No Brasil a doença é conhecida desde 1929, onde recebeu diversos nomes como: febre petequial, tifo transmitido

por carrapato e Febre Maculosa Brasileira (FMB), nome que persiste até os dias atuais (MARTINS et al., 2016; SUCEN, 2011).

O gênero *Anaplasma* foi descoberto por Sir Arnold Theiler em 1910, e nele estão incluídas as espécies *Anaplasma marginale*, *A. centrale*, *A. ovis*, *A. bovis*, *A. platys* e *A. phagocytophilum* que infectam diferentes espécies de animais, sendo que algumas incluem o parasitismo humano. Estas espécies são agentes etiológicos das doenças conhecidas como Anaplasmoses, que comumente são transmitidas por carrapatos (ATIF, 2016; BATTILANI et al., 2017; DUMLER et al., 2001). *Anaplasma phagocytophilum* é um patógeno comumente reportado em diferentes partes do mundo causando infecções em animais e seres humanos, que podem ser fatais, quando não tratadas. Esta espécie é o agente da Anaplasmoses Granulocítica Humana (AGH), doença relatada, frequentemente, nos EUA, onde 30% dos pacientes diagnosticados necessitam de hospitalização e 0,6% vão a óbito (ATIF, 2015; BAKKEN & DUMLER, 2015; DAHLGREN et al., 2011; DUMLER et al., 2001, 2005; ISMAIL; BLOCH; McBRIDE, 2010; ST. CLAIR; DECKER, 2012; VIEIRA et al., 2011).

Tanto anaplasmoses, quanto as riquetsioses são transmitidas por vetores, principalmente carrapatos da família Ixodidae, e os animais vertebrados atuam como reservatórios do patógeno (BOWN et al., 2003; PASSOS, 2012; THOMAS et al., 2016). As transmissões destas bactérias podem ocorrer em qualquer estágio de vida do carrapato, devendo permanecer fixado no hospedeiro por um período mínimo para esta transmissão, que no caso das riquetsias, este período varia de seis a dez horas após o início do repasto sanguíneo (FORTES; BIONDO; MOLENTO, 2011; SUCEN, 2011).

Os principais sintomas clínicos nos seres humanos são parecidos em ambas as doenças, e incluem febre, dor de cabeça, mialgias, calafrios, leucopenia, trombocitopenia e ou anemia. No caso da febre maculosa também podem aparecer enxatemas distribuídas nos membros, que se iniciam nas mãos e pés, o que se torna um diferencial para o diagnóstico da doença quando estão presentes (DANTAS-TORRES, 2007; DUMLER et al., 2001; DUMLER, 2013; TUDDENHAM, 2017). Caso esse tratamento não ocorra, o enxatema chega a se transformar em hemorrágico, principalmente equimoses ou sufusões, que podem evoluir para necrose, sobretudo nos membros (BRASIL, 2016).

Já nos cães, a febre, letargia e anorexia são vistos como os sinais clínicos mais comuns para anaplasmoses, enquanto que para a febre maculosa, além destes, ainda ocorrem cefaleia, náuseas, deficiência vestibular com nistagmo e incoordenação motora. Esses sinais surgem entre duas a três semanas após a picada do carrapato, mas também podem ocorrer infecções

assintomáticas (ATIF, 2015; FORTES; BIONDO; MOLENTO, 2011; JOANNITTI et al., 2014; PACHECO, 2008; ST.CLAIR; DECKER, 2012).

Apesar de possuir uma rápida evolução no seu quadro clínico, e ser considerada a segunda zoonose mais letal, abaixo apenas da raiva, somente em 2001 a FMB passou a ser considerada pelo Ministério da Saúde como uma Doença de Notificação Compulsória. São registrados no SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação), tanto os casos confirmados da doença, como os casos suspeitos (LABRUNA e MACHADO, 2006; OLIVEIRA et al., 2016; SUCEN, 2011). Antes da obrigatoriedade da notificação, somente os estados de São Paulo e Minas Gerais mantinham uma vigilância ativa para a enfermidade, mesmo que diversos outros estados também já tivessem casos relatados da doença (SUCEN, 2011).

Não existem relatos de casos de AGH no Brasil, porém, como a enfermidade não consta como uma doença de notificação obrigatória, pode não ter sido diagnosticada ou relatada (DUMLER, 2013). Apesar disso, alguns pesquisadores têm relatado a presença de *A. phagocytophilum* em diversas espécies de animais distribuídos pelos estados brasileiros, incluindo os cães (FALCÃO et al., 2014; MAZZOTTI et al., 2018; NOGUEIRA et al., 2017; PINTO et al., 2018; PRADO et al., 2017; SANTOS et al., 2013; SILVEIRA et al., 2015; SILVEIRA et al., 2017; VIEIRA et al., 2013). Isso traz grande preocupação, pois os cães atuam como sentinelas, não só de anaplasrose, mas também de diversas outras zoonoses de importância para a saúde humana.

O diagnóstico laboratorial é essencial para a confirmação ou estabelecimento da terapia. Pode ser realizado empregando diversas técnicas como Reação de Cadeia de Polimerase (PCR), Imuno-histoquímica e Histopatologia. Para ambas as doenças a RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta) é considerada padrão ouro para o diagnóstico. É um método que apresenta baixo custo, boa sensibilidade e especificidade. Para a realização desse exame como comprovação, é necessária à coleta de duas amostras de sangue com intervalo de 14 a 21 dias no qual são realizadas a RIFI. A confirmação da infecção se dará quando a segunda amostra demonstrar título final quatro vezes maior que a primeira (BLANTON, 2016; CALIC, 2004; CARVALHO, 2016; DEL FIOLE et al., 2010; SUCEN, 2011).

Dessa forma, este estudo teve como objetivo determinar a presença de patógenos da ordem Rickettsiales circulantes no município de Lavras/MG, por meio de diagnóstico indireto pela técnica de RIFI em cães, considerando que não há relatos de casos humanos, ou animais na região.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Ordem Rickettsiales

A ordem Rickettsiales é constituída por bactérias gram negativas, pleomórficas e intracelulares obrigatórias, no qual inclui as famílias Rickettsiaceae e Anaplasmataceae. Na família Rickettsiaceae estão os gêneros *Rickettsia* e *Orientia*. Já a família Anaplasmataceae abrange *Anaplasma*, *Wolbachia*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia* e *Aegyptianella* (BLANTON, 2016; DUMLER et al., 2001; THOMAS et al., 2016).

As espécies são transmitidas principalmente por ectoparasitos, no qual incluem ácaros, carrapatos, pulgas e piolhos. Esses vetores podem transmitir a bactéria pela picada, ou mesmo através da inoculação de fezes no hospedeiro. Mas ainda existem espécies como as *Neorickettsia* que podem ser transmitidas através da ingestão de endoparasitos, como trematódeos (THOMAS et al., 2016).

Muitas das espécies dessa ordem causam doenças em seres humanos. Outras ainda necessitam de informações sobre sua patogenicidade, apesar de algumas antes reconhecidas como não patogênicas estarem atualmente envolvidas em sintomas clínicos no homem. Esse é o caso da *Rickettsia parkeri* e *R. amblyommatis* que recentemente foram diagnosticadas em seres humanos (APPERSON et al., 2008; BLANTON, 2016; PADDOCK et al., 2004).

Representantes da família Rickettsiaceae são coccobacilos não flagelados que infectam o citoplasma e ou núcleo da célula do hospedeiro. Dentre eles, as espécies mais reconhecidas por causar infecção humana estão: *Orientia tsutsugamushi* e *Rickettsia akari* que são transmitidas por ácaros; *R. prowazekii*, transmitida por piolhos; *R. typhi* e *R. felis* por pulgas; e as espécies *R. rickettsii*, *R. conorii*, *R. africae* e *R. australis* que são transmitidas por carrapatos (DAY e NEWTON, 2017; THOMAS et al., 2016). Algumas dessas espécies são causadoras de doenças conhecidas como Febre Maculosa e Tifo que ocorrem em diversas partes do mundo.

Já os membros da família Anaplasmataceae infectam e replicam-se principalmente, em neutrófilos, monócitos, macrófagos e em vacúolo intracitoplasmático de eritrócitos de animais vertebrados (DUMLER et al., 2001). O primeiro relato como causadora de doenças em humanos ocorreu na década de 1980, e as principais espécies reconhecidas por serem patogênicas a seres humanos foram: *Ehrlichia chaffeensis*, conhecida por causar a Erliquiose Monocítica Humana (HME); *Ehrlichia ewingii* patógeno da Ehrlichiose Granulocítica Humana (EGH); *Anaplasma phagocytophilum*, agente da Anaplasmoose Granulocítica

Humana (AGH) e *Neorickettsia sennetsu* (DUMLER, 2013; DUMLER et al., 2001, 2005; PACHECO, 2008).

A ordem Rickettsiales, durante muito tempo foi negligenciada como causadora de doenças em seres humanos, e com isso tem se tornado um grande desafio para a saúde pública, pois cada vez mais têm sido descobertas novas espécies, e identificado algumas como patogênicas a seres humanos (APPERSON et al., 2008; BLANTON, 2016; PADDOCK et al., 2004). Apesar dos hospedeiros responderem bem ao tratamento para a maioria desses, os sinais clínicos são inespecíficos, o que dificulta o diagnóstico, principalmente em locais considerados não endêmicos (BLANTON, 2016).

## 2.2 *Rickettsia* spp.

Riquetsias são bactérias Gram-negativas, pleomórficas, intracelulares obrigatória que estão distribuídas mundialmente e possuem uma variedade de hospedeiros (DANTAS-TORRES, 2007; DUMLER et al., 2001; MARTINS, 2014). O gênero é constituído por espécies que estão subdivididas em quatro grupos: Grupo Ancestral (*Rickettsia bellii* e *R. canadensis*), Grupo Tifo (*R. prowazekii* e *R. typhi*), Grupo de transição (*R. australis*, *R. akari* e *R. felis*) e o Grupo Febre Maculosa, no qual estão incluídas a maioria das espécies (*R. aeschlimanii*, *R. africae*, *R. conorii*, *R. heilongjiangensis*, *R. helvetica*, *R. honei*, *R. japonica*, *R. massiliae*, *R. montanensis*, *R. parkeri*, *R. peacockii*, *R. rhipicephali*, *R. rickettsii*, *R. sibirica* e *R. slovacica*, *R. amblyommatis*, *R. andeanae*). Este último grupo possui uma alta relevância para a saúde pública, com várias espécies que ocasionam desde infecções brandas até letais. Há outras espécies que tem patogenicidade desconhecida, levando a não notificação de alguns casos como Febre Maculosa (ALMEIDA et al., 2011; CALIC, 2004; COELHO, 2013; KARPATY et al., 2016; LABRUNA, 2009; LABRUNA et al., 2011; MARTINS et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2016, SCHROEDER et al., 2016; SUCEN, 2011; THOMAS et al., 2016).

No Brasil há relatos da presença das seguintes espécies: *R. belli* do Grupo Ancestral; *R. typhi* do Grupo Tifo; *R. akari* e *R. felis* do Grupo de Transição, além de *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyommatis*, *R. rhipicephali*, *R. andeanae*, *R. montanensis* e *R. africae* pertencentes ao Grupo da Febre Maculosa (CALIC, 2004; COSTA et al., 2015; LABRUNA, 2009; MARTINS et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2016; SUCEN, 2011). De todas essas espécies, quatro são consideradas as mais patogênicas aos seres humanos, sendo *R. typhi*, *R. felis*, *R. parkeri* e *R. rickettsii* (MARTINS, 2014).

*Rickettsia rickettsii* é considerada a riquetsia mais patogênica para seres humanos no mundo e pode infectar diversas espécies de animais, como cães, capivaras, eqüinos, gambás, coelhos, aves, entre outros. Alguns destes hospedeiros podem apresentar infecção ou serem portadores assintomáticos, e em hospedeiros vertebrados o tempo de infecção varia de alguns dias a semanas (LABRUNA, 2009). O genótipo circulante da bactéria tem apresentado variação quanto à virulência, dificultando ainda mais o tratamento dos indivíduos infectados podendo levar ao óbito caso a antibioticoterapia não seja prescrita a tempo, ou mesmo, nunca indicada (DANTAS-TORRES, 2007; LABRUNA, 2009; NICHOLSON et al., 2010; PAROLA; LABRUNA; RAOULT, 2009).

Casos humanos de FMB são frequentemente relatados no Brasil, onde em 2018, ocorreram 237 casos ocasionada por *R. rickettsii*. A região Sudeste do país é responsável pela maioria dos casos onde, apenas os estados de Minas Gerais e São Paulo notificaram juntos 74% dos casos, com taxas de letalidade em torno de 46% (BRASIL, 2019).

Nos cães, infecções causadas por *R. rickettsii*, levam a quadros clínicos como febre, anorexia, cefaleia, letargia, náuseas, depressão, trombocitopenia, deficiência vestibular com nistagmo, edema conjuntival e incoordenação motora (FORTES; BIONDO; MOLENTO, 2011; JOANNITTI et al., 2014; LABRUNA et al., 2009; PIRANDA et al., 2008). Existem poucas informações sobre a patogenicidade das outras espécies de riquetsias em cães, pois algumas causam infecções assintomáticas, mas também pode ser devido à incerteza no diagnóstico clínico, já que os sintomas são parecidos com outras doenças (FORTES; BIONDO; MOLENTO, 2011; JOANNITTI et al., 2014). A transmissão da bactéria é associada principalmente aos carrapatos *A. sculptum* e *A. aureolatum* (LABRUNA, et al., 2011; MORAES-FILHO et al., 2009).

Até 2004, considerava-se que *R. parkeri* era apatogênica para o homem, mas alguns autores têm relatado quadros clínicos causados pelo agente, inclusive no Brasil, no qual é diferenciada em duas cepas. *R. parkeri sensu stricto* (s.s.) é descrita no Rio Grande do Sul no qual é relacionada ao carrapato *Amblyomma tigrinum*. Já *R. parkeri* cepa Mata Atlântica já foi descrita nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste do país, estando associada a regiões de Mata Atlântica e principalmente ao carrapato *A. ovale* como vetor (FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2018; FORTES, 2010; KRAWCZAK, 2012; KRAWCZAK et al., 2016a, 2016b, 2016c; LABRUNA, 2009; MEDEIROS et al., 2011; PADDOCK et al., 2004; SPOLIDORIO et al., 2010; WECK et al., 2016). Outras espécies de carrapatos também são reconhecidas por participarem do ciclo de transmissão no Brasil como *A. triste*, *A. dubitatum*, *A. nodosum* e *A.*

*aureolatum* (DALL'AGNOL et al., 2017; FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2018; KRAWCZAK et al., 2012; KRAWCZAK et al., 2016 a, 2016 b, 2016 c; LABRUNA et al., 2011). Quanto à infecção, existem poucos casos confirmados, e é referenciada como de menor gravidade quando comparada à *R. rickettsii*, ainda não existindo relatos sobre a letalidade ocasionada pela mesma (FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2018; KRAWCZAK et al., 2016a; OLIVEIRA, et al., 2017; SPOLIDORIO et al., 2010).

Diversos trabalhos têm evidenciado a presença de anticorpos contra *R. parkeri* em soros caninos, sugerindo a importância desses animais no ciclo de transmissão da doença para o homem (KRAWCZAK et al., 2016 c; POUBEL et al., 2018). Estudos realizados nos Pampas Sul-Americanos, relataram que os cães domésticos eram frequentemente diagnosticados com *R. parkeri*. Na região os canídeos selvagens possuíam um papel importante na dispersão de carrapatos infectados em seu habitat que era frequentado pelos cães domésticos provocando assim a infecção desses últimos. Os cães domésticos por sua vez, levavam os carrapatos para o seu peri-domicílio, possibilitando a infecção humana (DALL'AGNOL et al., 2017; FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2018; LADO et al., 2014; WECK et al., 2016).

Há indícios de que humanos também desenvolve uma resposta imunológica para *R. amblyommatis*, mas esse organismo até há pouco tempo, nunca havia sido citado como causador de infecção humana. Atualmente tem sido associado como a causa de sintomas leves em pacientes nos Estados Unidos (AMORIM et al., 2013; APPERSON et al., 2008; FORTES et al., 2010; KARPATY et al., 2016). Estudos moleculares recentes comprovam que *R. amblyommatis* pode infectar cães provocando títulos sorológicos bastante elevados (BARRETT et al., 2014; COSTA et al., 2015; KARPATY et al., 2016). Esta bactéria, que possui larga distribuição no continente americano, ocorre em várias espécies de carrapato, incluindo *Amblyomma longirostre*, *A. cajennense* e *A. coelebs* no Brasil (COSTA et al., 2015; LABRUNA, 2004; LABRUNA et al., 2004; KARPATY et al., 2016).

*Rickettsia belli* é o agente da família Rickettsiaceae que mais infecta carrapatos no Brasil. Há relatos de infecção nas espécies *A. ovale*, *A. oblongoguttatum*, *A. sculpturatum*, *A. humerale*, *A. rotundatum*, *A. aureolatum*, *A. dubitatum*, *A. incisum*, *A. nodosum*, *Ixodes loricatus* e *Haemaphysalis juxtakochi*, no qual são transmitidos de forma transovariana e transestadial (COSTA et al., 2015; HORTA et al., 2006; LABRUNA et al., 2007; LABRUNA et al., 2011; PINTER et al., 2008). Não se conhece ainda a patogenicidade desta bactéria, apesar de estudos, em diversas regiões no país, indicarem a presença de uma resposta

imunológica a este agente em animais vertebrados, principalmente cães (AMORIM et al., 2013; FORTES et al., 2010; LABRUNA et al., 2011; MELO et al., 2011; SPOLIDORIO et al., 2013). Mesmo assim, alguns autores sugeriram que há a possibilidade de que *R. belli* não seja infeccioso aos cães, uma vez que em seus estudos não houve qualquer evidência de infecção nesses animais, apesar que foram encontrados carrapatos infectados nos mesmos locais de estudo (COSTA et al., 2015; LABRUNA et al., 2007; PINTER et al., 2008).

Os patógenos responsáveis pela FMB podem ser transmitidos por diversas espécies de carrapatos, mas são considerados como principais vetores e reservatórios das riquetsias, os carrapatos da família Ixodidae, principalmente, os do gênero *Amblyomma*. Nesse gênero a riquetsia é transmitida por transmissão transovariana ou transestadial. Há também a transmissão horizontal, quando o vetor se infecta ao parasitar um hospedeiro, que atua como amplificador da riquetsia (CARVALHO, 2016; COELHO, 2013; NICHOLSON et al., 2010).

Um hospedeiro vertebrado é definido como bom amplificador de riquetsias quando, esses são abundantes em área endêmica, são hospedeiros habituais do carrapato vetor, são susceptíveis à bactéria, desenvolve riquetsemia de modo a possibilitar à infecção dos carrapatos, e que suas proles não sejam resistentes a infecção (LABRUNA, 2009). São esses animais que irão influenciar a distribuição das riquetsias e também das espécies de vetores, como no caso de *R. rickettsii*, que possui como principais amplificadores as espécies *Hydrochoerus hydrochaeris* (capivara) e *Didelphis aurita* (gambá), e como vetores os carrapatos *A. sculptum*, *A. dubitatum* e *A. aureolatum* (LABRUNA, 2009; MORAES-FILHO et al., 2009). Esses animais mantêm uma riquetsemia durante vários dias, possibilitando assim a infecção dos vetores (FORTES; BIONDO; MOLENTO, 2011; PIRANDA et al., 2008).

*A. cajennense* durante décadas foi apontado como o principal vetor de riquetsias. Mas após análises com bases morfológicas e moleculares, essa espécie foi apontada como sendo um complexo de seis espécies, no qual inclui o *A. sculptum*. Esta última está geograficamente distribuída nos estados do Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Pernambuco, Piauí, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás (NAVA et al., 2014). Apesar de *A. sculptum* ser considerada como o principal vetor de riquetsias, sabe-se que outras espécies de carrapatos também participam do ciclo epidêmico e enzoótico, além de outras espécies de artrópodes como, *Ctenocephalides canis* e *C. felis* que também são considerados vetores de riquetsia (DURÃES, 2015; SANTOS E GAGLIANI, 2007; SUCEN, 2011). A tabela 1 demonstra as riquetsias já detectadas no Brasil e os carrapatos em que foram isolados.

**Tabela 1:** Espécies de riquetsias detectadas e/ou isoladas de carrapatos no Brasil.

RIQUÊTSIA	CARRAPATO	REFERÊNCIA
<i>R. amblyommatis</i>	<i>Amblyomma coelebs</i>	Krawczak et al., 2016c; Labruna et al., 2011; Labruna, 2004; Medeiros et al., 2011; Parola et al., 2009.
	<i>Amblyomma geayi</i>	
	<i>Amblyomma longirostre</i>	
	<i>Amblyomma sculptum</i>	
<i>R. belli</i>	<i>Ixodes loricatus</i>	Krawczak et al., 2016c; Labruna et al., 2011; Labruna, 2004; Moraes-Filho et al., 2009; Parola et al., 2009.
	<i>Amblyomma humerale</i>	
	<i>Amblyomma ovale</i>	
	<i>Amblyomma rotundatum</i>	
	<i>Amblyomma sculpturatum</i>	
	<i>Amblyomma oblongoguttatum</i>	
	<i>Amblyomma aureolatum</i>	
	<i>Amblyomma dubitatum</i>	
	<i>Amblyomma incisum</i>	
<i>Amblyomma nodosum</i>		
<i>R. parkeri</i> sensu stricto	<i>Haemaphysalis juxtakochi</i>	Dall'Agnol et al., 2017 Faccini-Martínez et al., 2018; Labruna et al., 2011.
	<i>Amblyomma tigrinum</i> ,	
	<i>Amblyomma aureolatum</i>	
	<i>Amblyomma triste</i>	
	<i>Amblyomma ovale</i>	
<i>R. parkeri</i> cepa Mata Atlântica	<i>Amblyomma dubitatum</i>	Barbieri et al., 2014; Faccini-Martínez et al., 2018; Krawczak et al., 2016 c; Medeiros et al., 2011;
	<i>Amblyomma nodosum</i>	
	<i>Amblyomma aureolatum</i>	
<i>R. rickettsii</i>	<i>Amblyomma ovale</i>	Labruna et al., 2011; Moraes-Filho et al., 2009;
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	
	<i>Amblyomma aureolatum</i>	

Fonte: Do Autor

*A. aureolatum* e *A. ovale*, vetores de espécies de riquetsias como *R. rickettsii* e *R. parkeri*, respectivamente, são comumente encontrados parasitando cães domésticos, quando na sua fase adulta. Em suas fases imaturas parasitam aves, roedores e outras espécies silvestres (CARVALHO, 2016; FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2018; SUCEN, 2011). *Amblyomma ovale* também é reconhecido por ter o hábito de parasitar seres humanos em sua fase adulta (FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2018; GUGLIELMONE et al., 2006; SZABÓ et al., 2006). É sugerido que *Rhipicephalus sanguineus* também seja um vetor de *R. rickettsii*, mas a infecção em condições naturais possui taxas muito baixas e essa bactéria é patogênica para esta espécie de carrapato (MORAES-FILHO et al., 2009; PIRANDA et al., 2008; PIRANDA et al., 2011).

A transmissão para o hospedeiro pode acontecer em qualquer fase de vida do carrapato (larva, ninfa ou adulto), por meio da saliva, porém é necessário que haja fixação à pele do hospedeiro por um período de seis a dez horas. Depois de ocorrer a fixação do parasito no hospedeiro ocorre a reativação da bactéria para o estado virulento, sendo regurgitada pelo artrópode no hospedeiro no momento do repasto sanguíneo. Outra forma de transmissão pode acontecer pelo esmagamento do carrapato e o contato do hospedeiro com distribuição de seu suco gástrico (DEL FIOLE, 2010; FORTES; BIONDO; MOLENTO, 2011; SUCEN, 2011).

### 2.3 *Anaplasma phagocytophilum*

*Anaplasma phagocytophilum* é uma bactéria Gram-negativa, intracelular obrigatória que até recentemente era reconhecida como *Ehrlichia phagocytophila* (ATIF, 2015; DUMLER et al., 2001; DUMLER et al., 2005; FALCÃO et al., 2014; ISMAIL; BLOCH; MCBRIDE, 2010). Dumler et al. (2001), através de análises moleculares reclassificaram a família Anaplasmataceae e transferiram algumas espécies de gênero, como foi o caso de *Ehrlichia phagocytophila*, *E. equi* e o agente da Anaplasmoose Granulocítica Equina (AGE) que hoje juntas formam a espécie *Anaplasma phagocytophilum* (BATTILANI et al., 2017; DUMLER et al., 2001; FALCÃO et al., 2014).

Apesar de o patógeno ter sido identificado em 1932, a doença só foi relatada, pela primeira vez, como causadora de infecção humana na década de 1990, e foi caracterizada como grave por poder levar ao óbito caso não seja tratada corretamente (ATIF, 2015; DUMLER et al., 2001. 2005; ISMAIL; BLOCH; MCBRIDE, 2010; ST.CLAIR; DECKER, 2012; VIEIRA et al., 2011).

*A. phagocytophilum* é citada como potencialmente endêmica em, pelo menos, 43 países onde apresenta uma letalidade mundial em torno de 5%. É comumente diagnosticada nos Estados Unidos, onde a soroprevalência humana varia de 15 a 36% com taxa de letalidade de 0,6%. Na Europa a soroprevalência está em torno de 1 a 20% (ATIF, 2015; BERGER, 2019; ST.CLAIR; DECKER, 2012)

No Brasil, não existem relatos de casos humanos, mas a falta de obrigatoriedade de notificação não nos proporciona o conhecimento do número de ocorrências no país (DUMLER, 2013; FALCÃO et al., 2014). Ainda assim, alguns estudos têm demonstrado a presença de *A. phagocytophilum* em algumas espécies de animais no país, como cervídeos, aves silvestres, pequenos ruminantes, equinos e em cães. Nesses últimos, já foram relatados em estados como Rio de Janeiro, Pernambuco, São Paulo, Paraná e Minas Gerais (CASTRO

et al., 2016; MACHADO et al., 2012; PINTO et al., 2018; SACCHI; DUARTE; MACHADO, 2012; SANTOS et al., 2011, 2013; SILVEIRA et al., 2017; VIEIRA et al., 2013).

Nos EUA e em diversas regiões da Europa, *A. phagocytophilum* é transmitido por carrapatos do gênero *Ixodes*. Mas Santos et al. (2013) consideraram as espécies do Complexo *Amblyomma cajennense* e *Rhipicephalus sanguineus* como os possíveis vetores da Anaplasmoze Granulocítica no Brasil. Alguns autores têm relatado ainda, casos de AGH transmitidas também através de transfusão sanguínea, contato perinatal ou nosocomial em seres humanos (ANNEN et al. 2012; DHAND et al., 2007; ST.CLAIR; DECKER, 2012).

A conservação da bactéria ocorre devido à transmissão transestadial nos vetores e as fases de ninfa e adultos são regularmente relatadas transmitindo a infecção para o homem (CARRADE et al., 2009; THOMAS et al., 2016). Quando *Anaplasma* spp. entra no organismo do carrapato, ocorre a colonização do epitélio do intestino médio para depois migrar para as glândulas salivares, onde, posteriormente é transferido para o hospedeiro vertebrado através da saliva do vetor (BATTILANI et al., 2017; THOMAS et al., 2016; UETI et al., 2007; UETI et al., 2009). A variedade de hospedeiros vertebrados muda de acordo com as regiões geográficas, mas os roedores são considerados os hospedeiros habituais da bactéria para realizar o ciclo enzoótico (BOWN et al., 2003; PASSOS, 2012; WOLDEHIWET, 2010). No Brasil, Sacchi, Duarte e Machado (2012), relataram o cervídeo *Blastocerus dichomotus* como um potencial reservatório para a bactéria.

A gravidade da anaplasmoze granulocítica varia de uma região para outra devido à presença de diferentes cepas circulantes. Infecções humanas podem ocorrer de forma assintomática a grave, com complicações fatais (BAKKEN; DUMLER, 2015; DAHLGREN et al., 2011; WOLDEHIWET, 2010). Os principais sinais e sintomas clínicos são parecidos com outras doenças virais e bacterianas e inclui febre, dor de cabeça, mialgias, calafrios, rigidez no pescoço, náusea, tosse, além de leucopenia, trombocitopenia e ou anemia nos homens. Nos cães a febre, letargia e lesões na pele são vistas como os mais comuns. Esses sintomas aparecem entre duas a três semanas após a picada do carrapato, mas também podem ocorrer casos onde a doença ocorre de forma assintomática, principalmente, em áreas endêmicas (ATIF, 2015; BAKKEN; DUMLER, 2015; DAHLGREN et al., 2011; DUMLER et al., 2001; DUMLER et al., 2005; PACHECO, 2008; SILVEIRA et al., 2015; ST.CLAIR; DECKER, 2012). A dificuldade em identificar os primeiros sinais da doença e a falta de testes mais rápidos e sensíveis impede o diagnóstico precoce, no qual quanto mais rápido é iniciado o tratamento mais eficaz ele se torna (BAKKEN; DUMLER, 2015).

Diversos testes são utilizados para o diagnóstico da anaplasmoze granulocítica como o da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), Imuno-histoquímica e Histopatologia. A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) é considerado “padrão ouro” para AGH pelo Centro de Controle de Zoonoses dos Estados Unidos. É um método de baixo custo, possui boa sensibilidade, mas a especificidade é considerada baixa, principalmente quando comparado ao teste de ELISA. A dificuldade deste teste é que os anticorpos também podem reagir com outras espécies de *Anaplasma*, principalmente *A. marginale* e *A. platys*, além da *Ehrlichia chaffeensis*. Por isso a confirmação da infecção, consiste em verificar a soroconversão e ou aumento do título final que deve ser no mínimo quatro vezes maior que o primeiro teste. Para animais como cães e cavalos, algumas empresas têm comercializado alguns kits de diagnósticos para detecção de anticorpos de *A. phagocytophilum* em plasma ou soro (ATIF, 2016; BAKKEN; DUMLER, 2015; BLANTON, 2016; CARRADE et al., 2009; DUMLER, 2013; FALCÃO et al., 2014; PRADO et al., 2017).

As infecções por Anaplasmatataceae são frequentemente reportadas nas Américas, e constituem um frequente risco de zoonoses para o homem (DUMLER, 2013). O diagnóstico muitas vezes é incerto, pois os sintomas são parecidos com diversas outras doenças. O principal meio de prevenção ainda é evitar a exposição a locais infestados por carrapatos, principalmente, em áreas consideradas endêmicas. E caso ocorra o contato com o vetor, este deve ser retirado o mais rápido possível do corpo, reduzindo assim a possibilidade de ocorrer à infecção (CARRADE et al., 2009). As anaplasmoses respondem bem a tratamento com antibióticos a base de tetraciclina, principalmente doxiciclina, que deve ser iniciado assim que houver a suspeita da doença (ATIF, 2015; DUMLER, 2013; ST.CLAIR; DECKER, 2012).

## **2.4 Animais sentinelas**

Há muito tempo os animais têm sido utilizados para monitorar os riscos para a população humana, seja por contaminação química, condições ambientais ou mesmo pela presença de doenças infectocontagiosas em determinados locais (AGUIRRE, 2009). Um exemplo clássico foi o uso de canários como sentinelas para a exposição por monóxido de carbono em minas de carvão na Grã-Bretanha e Estados Unidos no século 20. Esses pássaros eram levados para o interior das minas e, caso houvesse vazamento de monóxido, eles eram os primeiros a adoecer, caindo de seus poleiros, alertando os trabalhadores da liberação desses

gases no ambiente que saíam imediatamente do local (RABINOWITZ; SCOTCH; CONTI, 2009; RABINOWITZ; SCOTCH; CONTI, 2010).

As espécies sentinelas são utilizadas como um sistema de alarme, onde alertam antecipadamente as autoridades sobre determinadas situações, possibilitando atitudes que visam a prevenção, remediação ou mesmo o seu controle (AGUIRRE; TABOR, 2004). As espécies selecionadas como sentinelas podem fornecer diversas informações como mudanças em escalas espaciais, temporais e tróficas (AGUIRRE, 2009; TABOR; AGUIRRE, 2004).

Os animais são escolhidos como sentinelas ideais para fatores que afetam o ser humano, porque geralmente possuem uma resposta imunológica, alergênica ou outras, semelhante à de humanos, e muitas vezes compartilham o mesmo ambiente que este (RABINOWITZ; SCOTCH; CONTI, 2010; SHAN NEO e TAN, 2017). Além disso, alguns são mais susceptíveis que humanos, ou tem tempo de vida de bem menores que do homem, e quando sofrem exposição a determinados patógenos ou químicos, acabam por desenvolver sinais clínicos muito mais rápido, possibilitando o sinal de alerta (SHAN NEO e TAN, 2017).

A vigilância de agentes zoonóticos em animais sentinelas ocorre por meio do monitoramento da soroconversão do animal, da morbidade, mortalidade, mudanças na morfologia ou comportamento, fornecendo um alerta de que aqueles agentes circulam próximos aos seres humanos (RABINOWITZ; SCOTCH; CONTI, 2010; SHAN NEO e TAN, 2017).

Importantes sentinelas para a saúde humana são os animais domésticos e silvestres (equinos, cães, gambás, capivaras, por exemplo), pois estes não só compartilham o mesmo ambiente, incluindo o ar, água e comida, como também são mais expostos que seus proprietários não só a contaminantes químicos, como também a diversos vetores de agentes infecciosos (BACKER et al., 2001). Ao longo do tempo, os cães têm respondido como sentinelas a diversos contaminantes ambientais como amianto, chumbo e herbicidas que possuem uma grande chance de causar câncer tanto nestes animais como em seres humanos (BACKER et al., 2001). Esses animais também respondem a diversos patógenos transmitidos por vetores, principalmente os carrapatos e que também afetam os seres humanos. Além dos cães responderem a infecção, eles também atuam como carreadores de carrapato para o ambiente compartilhado com o homem, aumentando assim o risco de infecção humana (VIANNA et al., 2008).

Diversos estudos têm sido realizados nestes animais, principalmente para verificar infecções ocasionadas por *Anaplasma* spp. e *Rickettsia* spp.. Alguns autores têm demonstrado

que locais onde ocorre a soroprevalência de animais infectados com *Rickettsia* spp. também possui seres humanos positivos (VIANNA et al., 2008). Assim, estudos epidemiológicos utilizando cães, podem determinar novas áreas onde há a circulação de patógenos considerados graves a saúde pública, e assim alertar a população e autoridades para que preparem medidas preventivas (OTOMURA et al., 2010; PADDOCK et al., 2002).

## **2.5 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) no diagnóstico da Ordem Rickettsiales**

Atualmente, são utilizadas quatro técnicas padronizadas para o diagnóstico de Rickettsiales: as técnicas sorológicas, genômicas, detecção de antígeno e a técnica de isolamento (BLANTON, 2016; BRITES-NETO; RONCATO DUARTE, 2010; CALIC, 2004; CARVALHO, 2016; DEL FIOL et al., 2010; SUCEN, 2011).

A RIFI é a técnica sorológica mais utilizada, sendo recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), como “padrão ouro” para o diagnóstico de anaplasmoses e riquetsioses. Este método, que consiste em pesquisar imunoglobulinas IgM ou IgG em amostras sorológicas, apresenta baixo custo, boa sensibilidade e especificidade, apesar de a especificidade para anaplasma ser considerada baixa (ATIF, 2016; BAKKEN; DUMLER, 2015; BLANTON, 2016; CALIC, 2004; CARRADE et al., 2009; CARVALHO, 2016; DUMLER et al., 2013; FALCÃO et al., 2014; PRADO et al., 2017).

No geral, a detecção de anticorpos pode ocorrer a partir do sétimo dia da infecção. Para a confirmação de infecções ocasionadas tanto por riquetsias quanto por anaplasmas, devem ser coletadas duas amostras de soros, uma nos primeiros dias do aparecimento dos sintomas clínicos e a segunda de 14 a 21 dias após a coleta da primeira amostra, pois com a evolução da doença os títulos de anticorpos aumentam possibilitando a confirmação (BLANTON, 2016; FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2018; PORTILLO et al., 2017; SUCEN, 2011).

Um ponto negativo de alguns testes sorológicos como a RIFI, para Rickettsiales é a possibilidade da ocorrência de reações cruzadas. Por isso, para a confirmação do provável agente infectante é necessário que este apresente título final da soroconversão na segunda amostra, no mínimo quatro vezes maior que o título final da primeira amostra. Caso ocorra resposta sorológica positiva para mais de uma espécie, como no caso das riquetsias, o agente considerado infectante será aquele que apresentar título final também quatro vezes superior ao

título do outro patógeno testado (BLANTON, 2016; CALIC, 2004; CARVALHO, 2016; DEL FIOLE et al., 2010; PORTILLO et al., 2017; SUCEN, 2011).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

Foi realizado um estudo observacional de corte transversal com o objetivo determinar a presença de patógenos da ordem Rickettsiales circulantes no município de Lavras/MG, por meio de diagnóstico indireto pela técnica de RIFI utilizando um banco de soros caninos coletados para o estudo de Nogueira et al. (2013). Assim como, comparar a frequência da distribuição nas áreas urbana e rural.

#### **3.1 Áreas de Estudo**

O estudo foi realizado no município de Lavras (21°17'15''S - 44°58'59''W), localizado na região Sul de Minas Gerais. Esta região é caracterizada como área de transição entre os biomas Mata Atlântica e Cerrado. O clima é do tipo Cwa (Köppen), temperado chuvoso com invernos secos e verões úmidos, precipitação e temperatura média anual de aproximadamente 1460 mm e 20,4°C (DANTAS; CARVALHO; FERREIRA et al., 2007) e altitude média de 925m (OLIVEIRA-FILHO et al., 1994).

A área de estudo foi selecionada por ser uma cidade universitária e pólo comercial e de serviços na região, servindo a várias pequenas cidades circunvizinhas em que circulam pessoas de todo o país e com alta taxa de tráfego para várias localidades, inclusive outros países. Junto a isso, há falta de conhecimento sobre a ocorrência de espécies de bactérias da ordem Rickettsiales que circulam na região. Sabe-se que esses agentes muitas vezes circulam de forma silenciosa em populações animais e causam surtos com alta letalidade por ter o diagnóstico tardio. Isso já ocorreu em outras cidades universitárias brasileiras, como Piracicaba (2002), Campinas (2019), entre outras. Desta forma decidiu-se utilizar um banco de soros de cães já coletados e validado no estudo de NOGUEIRA et al. (2013), por considerar os cães sentinelas de circulação desses agentes na proximidade dos humanos (BACKER et al., 2001; SANGIONI et al., 2005).

### **3.2 Banco de Soros Caninos**

Um banco de soros de cães foi formado a partir da coleta de amostras, durante um estudo realizado para a pesquisa da presença de *Neospora caninum* em cães de áreas produtoras de leite e café, no estado de Minas Gerais NOGUEIRA et al. (2013). Esses soros ficaram armazenados no Laboratório de Patologia do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras (DMV/UFLA), sendo utilizado nesse estudo. Portanto, a amostragem foi determinada pela coleta de soros feita anteriormente e será explicada a seguir.

### **3.3 Coleta de dados e amostragem**

Foram coletados e armazenados 387 soros caninos, 99 de origem urbana e 288 rurais. Essa amostra foi representativa da população do município, calculada pela ferramenta Statcalc- EpiInfo para levantamento de prevalência segundo metodologia de Nogueira et al. (2013).

Os soros caninos foram coletados em 2010, durante a campanha de vacinação antirrábica realizada no município de Lavras/MG. Foram coletadas amostras de sangue por punção da veia jugular de cães residentes no município, conforme material e métodos de Nogueira et al. (2013), que posteriormente foram acondicionadas sobre refrigeração a -20°C. Os animais foram escolhidos aleatoriamente de um subconjunto da população selecionada com base na conveniência, após a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (protocolo nº012/11). Durante a coleta de sangue, foram realizadas entrevistas presenciais com os tutores dos animais. As variáveis selecionadas foram sobre: gênero, raça, procriação, local onde o animal era mantido, se o animal tinha acesso temporário à área urbana ou rural, alimentação e histórico de doenças.

Com o objetivo de comparar a circulação das bactérias da ordem Rickettsiales nas zonas urbana e rural de Lavras/MG para o atual estudo, foram selecionadas todas as 99 amostras coletadas na zona urbana e 100 amostras selecionadas aleatoriamente da zona rural, como forma de reduzir a amostra para processamento da RIFI e possibilitar a comparação. A zona rural é distribuída nas seguintes comunidades: Funil, Queixada, Cajuru do Cervo, Barreiro, Tanque, Serrinha, Faria e Tomba.

### 3.4 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Os soros foram processados para pesquisa de anticorpos IgG anti-*R. rickettsii*, anti-*R. parkeri*, anti-*R. belli*, anti-*R. amblyommatis* e anti-*A. phagocytophilum* por meio da RIFI, conforme descrito abaixo:

As amostras de soros foram diluídas em PBS 1X (solução fosfato tamponada), em título 1:64 para riquetsias e 1:40 para *A. phagocytophilum*, e colocadas individualmente nos orifícios da lâmina para RIFI, com o antígeno específico para cada espécie que seria testada. Para cada lâmina foi acrescentado um soro conhecidamente positivo e outro negativo, para que servissem de controles durante as avaliações.

As lâminas foram, então, incubadas em câmara úmida a 37°C, por 30 minutos e a seguir lavadas com PBS 1X e depois com água destilada. Após serem secas a temperatura ambiente, em cada orifício foi adicionado o conjugado específico IgG anti-cão (Sigma-Aldrich®) na diluição 1:32. Seguiu-se então uma nova incubação por 30 minutos e lavagem com PBS 1X e água destilada. Na seqüência foi adicionada uma gota de glicerina alcalina a cada orifício da lâmina que foi coberta com lamínula. Finalmente, a leitura foi realizada em microscópio de epifluorescência sob luz ultravioleta, com objetiva de 40x, por apenas um pesquisador.

Foram considerados positivos os soros reativos a 1:64 para riquetsias e 1:320 para *A. phagocytophilum*, a fim de se evitar reações cruzadas com outras espécies de *Anaplasma*. Os soros reativos foram testados em diluições seriadas, na base dois, até negativar para avaliar a titulação final para esses animais.

Em caso de soros reagentes para mais de uma espécie de riquetsia foi considerado como diagnóstico mais provável, o agente que apresentou o título final pelo menos quatro vezes maior que os dos outros agentes testados. Para *A. phagocytophilum* foram considerados positivos os soros que apresentaram titulação  $\geq 1:320$  na RIFI.

### 3.5 Análise estatística

Foi realizada análise descritiva dos dados obtidos a partir das variáveis elencadas, durante as entrevistas, e estratificadas entre zona urbana e rural. Foram testadas as associações entre as variáveis desfecho (positividade para cada espécie de bactéria) e a área (urbana e rural), por meio do teste qui-quadrado, considerando significância estatística  $p < 0,05$ . Co-variáveis obtidas por meio do questionário foram também testadas como variáveis

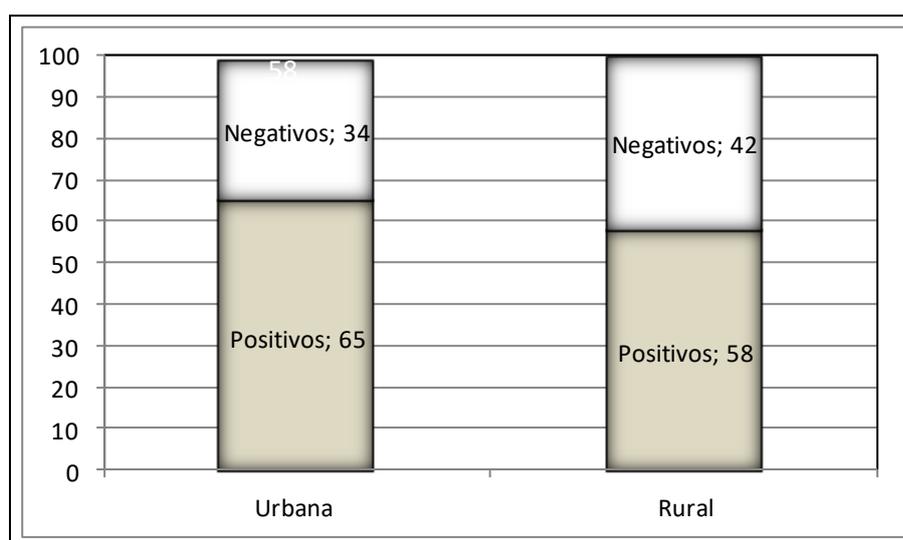
independentes. Foram calculadas as *odds ratio* com intervalo de confiança de 95%. Foi feita a regressão logística múltipla com as variáveis que apresentaram  $p < 0,2$  na análise univariada para o cálculo das *odds ratio* ajustadas. Os cálculos foram realizados utilizando o *software* IBM-SPSS 20.0®.

#### 4 RESULTADOS

Dos cães amostrados, 86 (43,3%) eram fêmeas e 113 (56,7%) machos, 121 (61%) não possuíam raça definida e o restante 78 (39%) eram de diferentes raças, as idades variaram de três meses a 18 anos. As amostras da zona rural foram procedentes de cinco comunidades rurais: Funil, Queixada, Cajuru do Cervo, Barreiro e Serrinha-Faria-Tomba. Ou seja, a aleatoriedade das amostras demonstrou ampla distribuição na zona rural do município, estando bem representado. Apenas, a comunidade Tanque não teve soro testado neste estudo.

Das 199 amostras, 123 (61,8%) resultaram positivas. Dessas, 65/123 (52,84%) foram de animais que residiam na zona urbana e 58/123 (47,15%) residiam na zona rural (Figura 1), sem diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as áreas.

**Figura 1:** Porcentagem de soros positivos para riquetsias de cães residentes nas zonas urbana e rural do município de Lavras/MG 2010 ( $p > 0,05$ ).



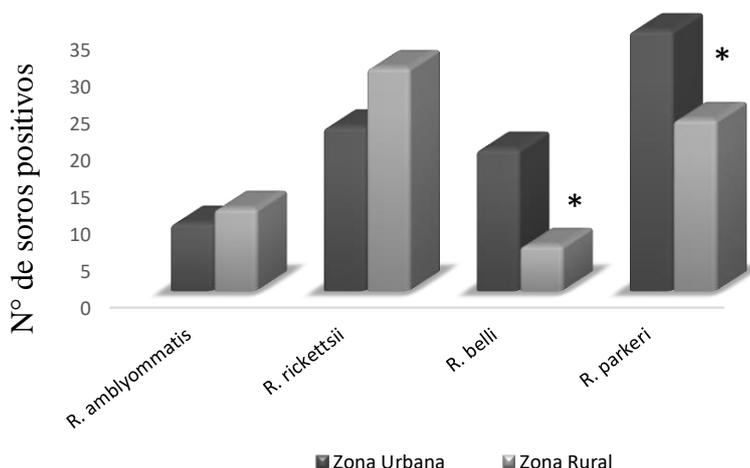
Fonte: Do Autor

Dos soros testados: 47,1% (58/123) foram reativos na RIFI para *R. parkeri* com títulos que chegaram a 1:2048; 42,3% (52/123) para *R. rickettsii* com títulos até 1:256; 20,3% (25/123) para *R. belli* e 16,3% (20/123) para *R. amblyommatidis* (Figuras 2 e 3).

Quando comparadas as diferenças entre as espécies e a frequência nas áreas urbana e rural, cães soropositivos para *R. parkeri* e *R. bellii* foram as espécies que mais prevaleceram na zona urbana, enquanto na área rural foram as espécies *R. rickettsii* e *R. amblyommatis* (Figura 2). Porém, para *R. rickettsii* e *R. amblyommatis* não houve diferenças entre os dois grupos.

Apenas *R. parkeri* e *R. belli* apresentaram uma diferença significativa entre áreas ( $p=0,037$  e  $p=0,017$ ) respectivamente. Na análise da estimativa de risco (*OR*), cães da área urbana apresentaram 5,16 (IC 0,13 a 0,85) vezes mais chance de soropositividade para *R. parkeri* e 3,39 (IC 0,27 a 0,96) vezes para *R. belli* se comparados aos animais da zona rural.

**Figura 2** - Distribuição das espécies de riquetsias em soros de cães residentes nas zonas urbana e rural do município de Lavras, 2010.



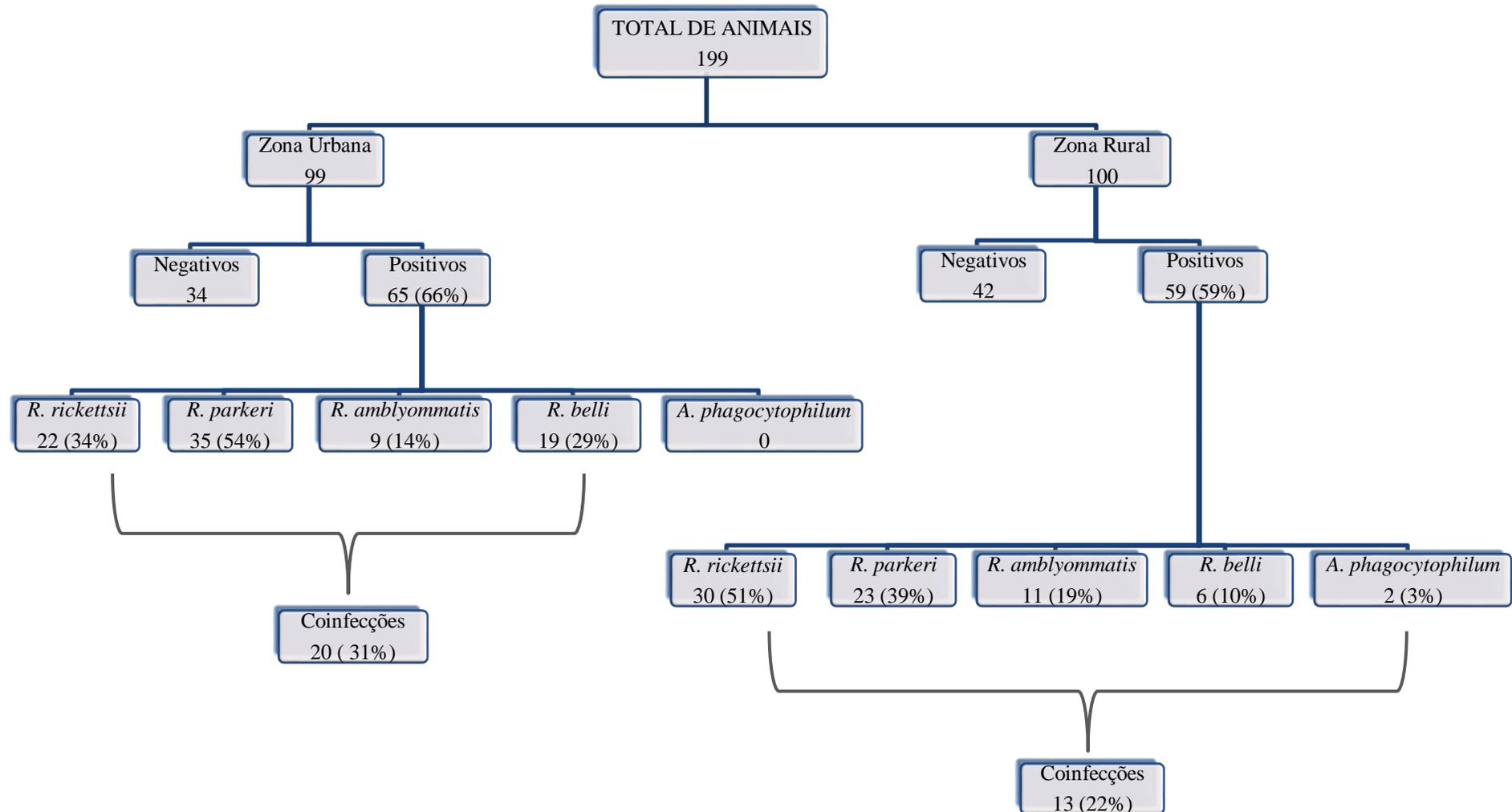
Legenda: \* $p < 0,05$

Fonte: Do Autor

Das amostras positivas 26% (32/123) apresentou reação para mais de uma espécie, sendo dez definidas como *R. parkeri* e uma como *R. rickettsii*, pois apresentaram títulos quatro vezes maior do que a diluição de corte (Tabela 2).

O restante (21/123) foi considerado como coinfeções devido ao valor do título final terem sido próximos. A espécie *R. rickettsii* apresentou a maior frequência em coinfeções nos animais, 71,88% (23/32), mantendo títulos que variaram de 1/64 a 1/256 (Tabela 2).

**Figura 3:** Números de animais positivos para *Rickettsia* spp. e *Anaplasma phagocytophilum* nas zonas urbana e rural de Lavras/MG em 2010.



Legenda: As porcentagens referem-se aos animais positivos dentro de cada zona estudada.

Fonte: Do Autor

**Tabela 2** -Títulos de soros que apresentaram reações para duas ou mais espécies de riquetsias pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em amostras de soro caninos, Lavras-MG, 2010.

Soro canino	Local	TÍTULO FINAL RIFI				PARI
		<i>R. rickettsii</i>	<i>R. parkeri</i>	<i>R. belli</i>	<i>R. amblyommatis</i>	
1	Rural	256	64	0	0	<i>R. rickettsii</i>
2		64	512	0	0	<i>R. parkeri</i>
3		64	256	0	64	<i>R. parkeri</i>
4		64	64	0	0	ND
5		64	64	0	0	ND
6		64	64	0	0	ND
7		64	64	0	0	ND
8		64	0	0	64	ND
9		64	0	0	64	ND
10		64	0	128	0	ND
11		64	0	128	0	ND
12		64	0	128	0	ND
13	Urbano	64	2058	0	0	<i>R. parkeri</i>
14		64	256	0	0	<i>R. parkeri</i>
15		64	256	0	0	<i>R. parkeri</i>
16		64	256	0	0	<i>R. parkeri</i>
17		64	256	0	0	<i>R. parkeri</i>
18		0	512	0	64	<i>R. parkeri</i>
19		0	256	0	64	<i>R. parkeri</i>
20		0	256	64	0	<i>R. parkeri</i>
21		64	128	0	0	ND
22		64	128	0	0	ND
23		64	64	0	0	ND
24		64	64	0	0	ND
25		64	0	0	64	ND
26		64	0	64	0	ND
27		64	0	64	0	ND
28		0	128	128	0	ND
29		0	128	64	0	ND
30		0	64	0	64	ND
31		0	64	0	64	ND
32		0	0	64	64	ND

PARI: Provável Antígeno Responsável pela Infecção (título final pelo menos quatro vezes maior); NR: Soro não reagente a um título  $\geq 64$  (negativo); ND: Não determinado (reações a mais de um antígeno, sem que nenhum seja 4 vezes maior) - consideradas como coinfeções

Fonte: Do Autor

Quando testadas as amostras para *A. phagocytophilum* somente dois soros (1%) demonstraram ser reativos para esta espécie, com título final de 1:640, sendo provenientes da zona rural (comunidades do Cajuru do Cervo e Funil). Ambos os animais eram machos, sem raça definida com idades entre dois a seis anos (Figura 3).

Um dos soros positivos para *A. phagocytophilum*, proveniente da comunidade do Cajuru, também foi reativo para a *R. parkeri* que teve como título final (1:64), demonstrando uma coinfeção entre as espécies.

Outros soros 38/199 (19,1%), foram reativos quando considerado 1:40, mas como seus títulos foram inferiores a 1:320 não foram considerados confirmados para *A. phagocytophilum* devido à grande chance de ter ocorrido reação cruzada com outras espécies de *Anaplasma*, como a *A. platys*, comumente encontrada infectando cães.

## 5 DISCUSSÃO

Das bactérias estudadas *R. rickettsii* e *R. parkeri* foram as mais prevalentes nas amostras, o que pressupõe estado de alerta, já que são as mais patogênicas para humanos. A FMB, doença causada pela bactéria *R. rickettsii* é uma das consideradas das mais graves do mundo, com elevada taxa de letalidade (37%) no Brasil. Nos últimos anos também houve diversos relatos sobre a patogenicidade de *R. parkeri*, que apresenta quadros clínicos mais brandos, quando comparados aos de *R. rickettsii* (FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2018; KRAWCZAK et al., 2016a; LABRUNA et al., 2009; MEDEIROS et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2017; SPOLIDORIO et al., 2010). Apesar de a infecção causada por essas espécies responderem bem à antibioticoterapia, o sucesso do tratamento depende do diagnóstico precoce. O atraso no início do tratamento, ou mesmo a não instituição deste, pode agravar o quadro, levando a lesões do sistema nervoso central, rins e pulmões (BRASIL, 2019b). Por isso, conhecer os locais onde circulam essas bactérias é importante para que o sistema de saúde esteja em alerta para essa suspeita e possibilitar o tratamento precocemente. Essa é a única forma de diminuir a letalidade da FMB, atualmente.

Não há relatos sobre a patogenicidade de *R. bellii* em seres humanos e em cães (HORTA et al., 2006; LABRUNA et al., 2007), mas foi encontrado um número razoável de animais sororeagentes, o que sugere a circulação desse agente no município. Alguns autores sugerem que a espécie não seja infecciosa para cães, pois seus estudos não evidenciaram a presença de cães soropositivos, mesmo em locais onde havia carrapatos infectados pela

mesma (COSTA et al., 2015; LABRUNA et al., 2007; PINTER et al., 2008). Já em nosso trabalho, demonstramos haver um número razoável de animais sororeagentes, mas como não foi possível identificar e examinar os carrapatos vetores nesses animais, não foi possível sugerir a possível espécie de carrapatos vetores. Talvez, o que tenha ocorrido com os trabalhos daqueles autores, tenha sido o fato de os vetores mencionados não terem sido capazes de transmitir a bactéria de forma horizontal, como a suspeita levantada por Labruna et al. (2007) e Pinter et al. (2008), que identificaram carrapatos infectados nos locais de estudo. Essa espécie de riquetsia é a que mais infecta carrapatos no Brasil (COSTA et al., 2015; HORTA et al., 2006; LABRUNA et al., 2007; LABRUNA et al., 2011; PINTER et al., 2006), e isso também pode favorecer a presença de sorologia positiva em cães, pois podem ser parasitados por diferentes espécies de carrapatos, aumentando assim a possibilidade de infecção. Estudos moleculares são necessários para determinar se as infecções encontradas são realmente de *R. belli*.

As frequências de soropositividade para riquetsias obtidas pelo presente trabalho são compatíveis com estudos realizados em áreas endêmicas para FMB. Como exemplo, no Estado de São Paulo, estudos realizados em zonas rurais dos municípios de Taiapuê (2002) e Santo André (2006), indicaram que 64% e 69,6% dos cães testados apresentaram soropositividade para riquetsias. Nesses locais a espécie *R. rickettsii* foi apontada como a possível causadora da infecção e os carrapatos *A. aureolatum* e *R. sanguineus* como possíveis vetores naqueles locais (MORAES-FILHO et al., 2009; PINTER et al., 2008). Outros estados como Rio de Janeiro (RJ) e Santa Catarina (SC), também demonstraram alta sorologia positiva para riquetsias em cães, onde nos municípios Barra do Piraí e Valença (RJ) apresentaram uma taxa de 58,7% dos cães positivos. Em Vila Itoupava, município de Blumenau (SC), a taxa foi de 67,3% (BARBIERI et al., 2014; GAZETA et al., 2009). Apesar desses municípios serem considerados endêmicos para FMB, Barbieri et al. (2014), discutem se os casos humanos diagnosticados em Blumenau (SC), não poderiam ter sido ocasionados pela *R. parkeri* cepa Mata Atlântica em vez de *R. rickettsii*, já que a maioria dos cães estudados por eles foram soropositivos para *R. parkeri*. Estes autores citam ainda, que os sintomas clínicos apresentados por pacientes neste município eram compatíveis com essa nova cepa.

Em Minas Gerais, no município de Itabira/MG, apesar da amostragem ter sido pequena (16 cães), Viana et al. (2008), encontraram um total de 81,3% de cães infectados com *R. rickettsii* em uma área rural, onde já havia relatos de casos humanos. Neste estudo o autor

relata que 8% da população humana daquela comunidade rural era soropositiva para FMB. Um dos indivíduos não havia manifestado os sintomas da doença. Esse trabalho, entre muitos, demonstra a importância do cão como sentinela para as riquetsioses, pois geralmente há significativa associação entre alta prevalência de animais positivos e a chance de haver infecção em seres humanos.

Em outros estudos, como os realizados em Santa Cruz do Escalvado e Pingo D'Água, nos anos de 2005 a 2007, e em Juiz de Fora (2008), foram encontrados 20,9% e 67,9% de cães soropositivos, respectivamente (MILAGRES et al., 2010; PACHECO et al., 2011). Os autores do estudo realizado em Pingo D'Água e em Santa Cruz do Escalvado, demonstram que apesar da baixa endemicidade desses municípios para FMB, as riquetsias permanecem circulando em animais (MILAGRES et al., 2010). No município de Juiz de Fora, *R. sanguineus* foi apontada como o possível agente de transmissão (PACHECO et al., 2011).

Pode-se perceber que em áreas onde frequentemente são diagnosticados casos humanos para FMB, são encontradas altas concentrações de cães soropositivos, enquanto que em locais reconhecidos por serem não endêmicos, como em São José dos Pinhais/PR e Cuiabá/MT os valores de cães soropositivos foram de 2,86 a 4,4%, respectivamente (AMORIM et al., 2013; FORTES et al., 2010).

Esses trabalhos demonstram a importância dos achados deste estudo, pois em Lavras/MG ainda não houve registros de casos de FMB, o que pode indicar que a região seja considerada área silenciosa e de risco, segundo a nova classificação de áreas (PINTER, 2018). Nesse caso, é fundamental o estudo e vigilância desses agentes e o alerta das autoridades de saúde para possíveis surgimentos e diagnóstico de casos humanos. O grande número de animais soropositivos para *R. parkeri*, indica a exposição e a possível circulação desta espécie. Isto deve influenciar o diagnóstico humano neste município, uma vez que os sintomas são mais brandos e podem ser confundidos com outras doenças endêmicas, como a dengue por exemplo. Em casos de febre, dor de cabeça e mialgia com contato com carrapatos, o diagnóstico da FMB deve ser considerado.

*R. parkeri* também tem sido frequentemente relatada infectando cães, onde estudos realizados na zona rural do município Cerro do Largo/RS, mostraram que 20% desses animais foram sororeativos para esta espécie de riquetsia, com títulos sorológicos bastante elevados, maiores que 4096. (KRAWCZAK et al., 2016a). O mesmo ocorreu em nosso trabalho, onde 29% dos cães estudados se encontravam positivos e um deles teve 2048 como título final, demonstrando uma possível infecção ativa no momento da coleta, como mencionado por

Pinter et al. (2008). Mas, quando comparado somente os animais que residiam na zona rural do município de Lavras, essa taxa cai para 15% dos animais sororeativos.

*R. parkeri* tem sido diferenciada em uma nova cepa, a *R. parkeri* cepa Mata Atlântica, que como o próprio nome já diz, tem sido relatada em regiões onde o bioma característico é a Mata Atlântica (FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2018; FORTES, 2010; KRAWCZAK, 2012; KRAWCZAK et al., 2016a, 2016b, 2016c; LABRUNA, 2009; MEDEIROS et al., 2011; PADDOCK et al., 2004; SPOLIDORIO et al., 2010). Considerando, que o município de Lavras/MG se encontra numa região considerada de transição entre Mata Atlântica e Cerrado, é possível que o agente causador da sorologia nos cães estudados possa ser dessa nova estirpe. Como não pôde ser realizado outros métodos confirmatórios como a PCR, não se pode confirmar essa hipótese, o que deverá ser feito em estudos posteriores.

*R. amblyommatis*, que também possui relatos de ocasionar infecção em seres humanos em outros países (APPERSON et al., 2008), tiveram uma sorologia positiva, apesar do número de cães reativos ser inferior, quando comparados a outras espécies. Esta espécie também foi relatada infectando cães em algumas partes do país, como no estudo realizado por Costa et al. (2015), que identificou 18,9% animais estudados soropositivos no município de Chapadinha, Maranhão. Assim como no nosso trabalho, aquele autor relata que os cães que residiam na zona rural possuíam resultado sorológico mais elevado (93%) quando comparado com os animais da zona urbana (7%). Porém, no presente estudo, que identificou 9% de cães soropositivos, não houve diferença significativa entre o número de animais positivos para *R. amblyommatis* e o local que residiam. Alguns autores demonstraram que essa espécie pode provocar títulos sorológicos bastante elevados em cães (BARRETT et al., 2014; COSTA et al., 2015; KARPATY et al., 2016). Neste estudo o título máximo foi somente 1:64, o que pode ter sido provocado por uma infecção antiga, ou os animais haviam sido recentemente infectados e não teriam desenvolvido uma resposta imunológica suficiente para provocar títulos elevados, o que é menos provável levando em conta o número de animais infectados.

Foram encontrados 20,3% de animais soropositivos para *R. belli*, e a maioria desses cães se encontravam na zona urbana. Achados de infecção canina ocasionado por *R. belli* também foi relatado em vários estados como Paraná, Mato Grosso (63%) e Pará. Pouco se sabe sobre a patogenicidade desta bactéria (AMORIM et al., 2013; FORTES et al., 2010; MELO et al., 2011; SPOLIDORIO et al., 2013), por isso é importante manter uma vigilância ativa para se conhecer o comportamento e os locais onde ocorre.

Esperava-se encontrar animais positivos com maior frequência na zona rural, uma vez que moradores da zona rural do município de Lavras possuem como costume criar seus cães soltos, possibilitando que frequentem áreas de matas, e com isso o contato dos cães com as diferentes espécies de carrapatos vetores, principalmente *A. sculptum*, é maior naquele ambiente. Além disso, nestas áreas pode haver grande quantidade de animais silvestres que poderiam estar agindo como amplificadores das bactérias nestes locais. Porém, houve presença de todas as riquetsias estudadas, tanto na zona rural, quanto na zona urbana, sem diferença significativa entre eles.

Melo et al., (2011) relata a presença de 47,5% dos animais soropositivos no município de Poconé, MT, onde os cães foram significativamente mais expostos na zona rural (75,5%), que na zona urbana (19,3%). Em contrapartida, Fortes et al. (2010) relataram a presença de riquetsias circulando em cães na zona urbana da cidade de São José dos Pinhais, e a ausência de soropositividade em animais residentes na zona rural. Esses autores discutem que o resultado pode ter ocorrido devido a distribuição de carrapatos associados à transmissão das bactérias e a concentração de espécies consideradas hospedeiras naquelas áreas urbana/rural. Mas Fortes et al. (2010) não puderam dar mais informações, porque não determinaram as espécies de carrapatos e as frequências de parasitismo nos cães estudados, enquanto Melo et al. (2011) citam *R. sanguineus* e *A. cajennense* como possíveis vetores.

A distribuição dos carrapatos também pode explicar a disseminação de riquetsias encontradas no presente trabalho. *R. sanguineus* são comumente encontrados parasitando cães em meio urbano, e já foi relatado um risco potencial dessa espécie transmitir *R. rickettsii* (PACHECO et al., 2011). Esta espécie pode estar infectando os cães urbanos neste município, enquanto no meio rural possivelmente sejam as espécies do gênero *Amblyomma*, como relatado por Melo et al. (2011) e Labruna e Pereira (2001). Mas não houve uma avaliação dos vetores parasitando cães, por isso não podemos determinar quais as espécies de carrapatos que podem estar disseminando infecção por riquetsias neste município. Em Lavras há animais de grande porte, como equídeos e bovídeos em determinados locais das áreas urbanas, assim como presença de roedores considerados silvestres, como capivaras e gambás. Além disso, há cães sem dono, que transitam entre zona urbana e rural. Essa situação demonstra a importância do estudo da epidemiologia desses agentes na região. Desde a fauna ixodídea, potenciais reservatórios, vetores e caracterização molecular dos agentes, que devem explicar a falta de diferença entre áreas rurais e urbanas.

Nesse estudo foram encontrados somente dois (1%) soros reagentes a *A. phagocytophilum*, com título final de 1:640 em ambos. Esse número é considerado baixo, quando comparamos com outros estudos realizados no Brasil, onde o número de animais soropositivos variou de 13,8 a 42,8% nos municípios de Campos dos Goytacazes/RJ, Belo Horizonte/MG e Londrina/PR (FALCÃO et al., 2014; SILVEIRA et al., 2017; VIEIRA et al., 2013). Em um trabalho realizado em Belo Horizonte/MG, Silveira et al. (2017), encontrou 43,8% dos animais estudados soropositivos a título de 1:40, no qual 74% seriam posteriormente confirmados como *A. phagocytophilum* por meio de testes moleculares. Com este mesmo título, neste estudo foram identificados 19,1% de soropositivos, mas como a soroconversão foi considerada com títulos baixos, assim como esses autores, julgamos a possibilidade de que no teste destes animais pode ter ocorrido reação cruzada com outras espécies de *Anaplasma*.

Os dois animais confirmados como positivos, eram provenientes de área rural. Vieira et al. (2013) também testaram animais, que residiam em área urbana e área rural, no qual identificaram 2,9% dos cães que residiam na área rural positivos, mas em contraste com nosso trabalho eles também identificaram 25% dos cães positivos em área urbana. Esses autores associaram a infecção dos cães ao fato de residirem em área urbana de Londrina/PR, e identificaram a espécie *Rhipicephalus sanguineus* como a mais prevalente nos cães estudados.

No presente estudo não foram avaliadas as espécies de carrapatos, que podem estar relacionadas a infecção por *Anaplasma* na região de Lavras/MG. Mas autores tem associado a transmissão pelos vetores complexo *A. cajennense* e *R. sanguineus* no Brasil (SANTOS et al., 2013; VIEIRA et al., 2013). Ambas as espécies são bastante abundantes na nossa região e podem ser as responsáveis pela infecção dos animais.

Não foram encontradas associações significativas de outras variáveis (sexo, idade, raça, tipo de manejo) com os resultados da sorologia para as riquetsioses ou *A. phagocytophilum*. Mas estudos epidemiológicos mais abrangentes são necessários para identificar os fatores de risco associados à infecção na população canina em questão. Muitos desses cães não tinham endereço fixo e podem circular entre a zona urbana e rural. Por se tratar de um estudo com banco de soros, que foram coletados anteriormente, alguns fatores que poderiam ser analisados como o estado clínico dos animais, presença de carrapatos e, mesmo uma sorologia pareada ou sangue total para diagnóstico molecular foram limitados.

Como os cães são considerados sentinelas para doença nos humanos, os resultados demonstram a circulação das bactérias *Rickettsia* spp. e *A. phagocytophilum*, expressando a

necessidade de vigilância para o diagnóstico dessas infecções no município de Lavras-MG. Devemos ainda nos atentar para associações demonstradas entre casos humanos e caninos ocorridos em áreas consideradas endêmicas para FMB, demonstrando a importância deste animal como sentinelas para essa doença (SANGIONI et al., 2005).

As pesquisas com populações desses animais são úteis para monitorar e estabelecer áreas de potencial risco de transmissão de doenças zoonóticas a seres humanos, o que possibilita medidas de prevenção nessas regiões. Principalmente, considerando que a letalidade da FMB e AGH em humanos está extremamente relacionada ao tratamento precoce dos casos, muitas vezes antes do diagnóstico laboratorial definitivo. Dessa forma, a circulação silenciosa desses agentes pode determinar o óbito de pacientes sem um diagnóstico definitivo.

## 6 CONCLUSÕES

Há indícios de circulação de bactérias da ordem Rickettsiales em Lavras/MG, com cães soropositivos pela RIFI para *R. parkeri*, *R. rickettsii*, *R. belli*, *R. amblyommatis* e *A. phagocytophilum*, nesta ordem de frequência. Inferindo a região como uma possível área silenciosa e de risco para FMB e AGH, e demonstrando a necessidade de vigilância para o diagnóstico dessas doenças no município de Lavras-MG.

*R. parkeri*, *R. belli* apresentaram soropositividade com maior frequência em cães na zona urbana e *R. rickettsii*, *R. amblyommatis* na zona rural. Soropositividade para *A. phagocytophilum* foi encontrada apenas em cães da zona rural.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRRE, A. A. Wild canids as sentinels of ecological health: a medicine perspective. **Parasites & Vectors**, Seville/Espanha, v. 2, n.1, p. 2-8, 2009.

AGUIRRE, A. A.; TABOR, G. M. Introduction: marine vertebrates as sentinels of marine ecosystem health. **EcoHealth**, v. 1, n. 1 p. 236–238, 2004.

ALMEIDA, A. P. **Pesquisa de Rickettsia, Ehrlichia, Anaplasma, Babesia, Hepatozoon e Leishmania em Cachorro-do-mato (Cerdocyon thous) de vida livre do Estado do Espírito Santo**, 2011. 82p. Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

AMORIM, M. V. et al. Detection of antibodies anti-*Rickettsia* spp. in dogs and horses in the state of Mato Grosso, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, p.

3755–3766, 2013.

ANNEN, K. et al. Two cases of transfusion-transmitted *Anaplasma phagocytophilum*. **Am. J. Clin. Pathol**, v. 137, n. 1, January, p. 562–565, 2012.

APPERSON, C. S. et al. Tick-borne diseases in North Carolina: is “*Rickettsia amblyommi*” a possible cause of rickettsiosis reported as Rocky Mountain Spotted Fever? **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, N.Y., v. 8, n. 5, p. 597–606, may 2008.

ATIF, F. A. Alpha proteobacteria of genus *Anaplasma* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): Epidemiology and characteristics of *Anaplasma* species related to veterinary and public health importance. **Parasitology**, v. 143, n. 06, p. 659–685, mar 2016.

ATIF, F. A. *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*: Rickettsiales pathogens of veterinary and public health significance. **Parasitol Res**, v.114, p. 3941–3957, set 2015.

BACKER, L. C. Pet dogs as sentinels for environmental contamination. **The Science of the Total Environment**, v. 274, n. 1, p. 161-169, 2001.

BAKKEN, J. S.; DUMLER, J. S. Human Granulocytic Anaplasmosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 29, n. 2, p. 341–355, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2015.02.007>>. Acesso 20 aug. 2018.

BARBIERI, A. R. M. Epidemiology of *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest in a spotted fever-endemic area of southern Brazil. **Ticks and Ticks-borne Diseases**, v. 5, n. 1, p. 848-853, Aug 2014.

BARRETT, A.; LITTLE, S. E.; SHAW, E. “ *Rickettsia amblyommi* ” and *R. montanensis* infection in dogs following natural exposure to ticks. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 14, n. 1, p. 20–25, 2014.

BATTILANI, M. et al. Genetic diversity and molecular epidemiology of *Anaplasma*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 49, p. 195–211, jan. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2017.01.021>>. Acesso 20 agosto 2018.

BERGER S. Anaplasmosis: global status. **Gideon Informatics**, Inc., Los Angeles, California, USA. Disponível em: [www.gideononline.com](http://www.gideononline.com). Acesso em: 21 Agosto 2019.

BLANTON, L.S. Treatment and Management of human disease. In: THOMAS, S. **Rickettsiales: biology, molecular biology, epidemiology and vaccine development**. Wynnewood: Ed. Springer International Publishing 2016. Cap. 5, p. 95-108.

BOWN, K. J. et al., Seasonal dynamics of *Anaplasma phagocytophilum* in a rodent-tick (*Ixodes trianguliceps*) system, united kingdom. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, jan 2003.

BRASIL, 2019. Sistema de Informação de Agravos de Notificação, Dados Epidemiológicos, **Ministério da Saúde**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Disponível em: <<http://portalsinan.saude.gov.br/dados-epidemiologicos-sinan>> Acesso em:18 de jul 2019.

BRASIL, 2019 b. Ministério da Saúde. Febre Maculosa: causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção. Brasília/DF. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/febre-maculosa>> Acesso em: 8 ago 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**, Brasília/DF:Ed. Atual, 2016.

BRITES NETO, J.; RONCATO DUARTE, K. M. R. Diagnostic assays for Rickettsiosis infecti-veness (review article). **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 161, n. 4, p. 167-172. Apr. 2010.

CALIC, S. B. Sorologia das riquetsioses. XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses, **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Ouro Preto/MG, v.13. n. 1, p. 185, 2004.

CARRADE, D. D. et al. Canine granulocytic anaplasmosis: a review. **J. Vet Intern Med**, v. 23, n.1, p. 1129-1141, 2009.

CARVALHO, A. S. **Inquérito sorológico de anticorpos anti-Rickettsia, em cães nos municípios de Cananéia e Itapeva, estado de São Paulo, Brasil**. 2016, 60 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária e Bem-estar Animal), Universidade de Santo Amaro-UNISA, São Paulo/SP, 2016.

CASTRO, G. N. S. et al. *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. em carrapatos de vida livre nas mesorregiões Sul Fluminense e Metropolitana do Rio de Janeiro, RJ. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 23, n. 3-4, p. 148-151, jul-dez 2016.

COELHO, M. G. **Evidência Sorológica de infecção por riquetsias do grupo da febre maculosa e *Rickettsia belli* em pequenos mamíferos na área periurbana de Uberlândia, MG**. 2013, 68 p. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG. 2013.

COSTA, A. P. et al. A serological and molecular survey of *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* and *Rickettsia* spp. among dogs in the state of Maranhão, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal/SP, v. 24, n. 1, p. 28-35, jan-mar 2015.

DAHLGREN, F. S. et al. Increasing incidence of *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* in the United States, 2000 – 2007. **Am J. Trop. Med. Hyg.** v. 85, n. 1, p. 124-131, 2011.

DALL'AGNOL, B. D. et al. *Rickettsia parkeri* in free-ranging wild canids from Brazilian Pampa. **Transboundary and Emerging Diseases**. p. 1-7, July-2017.

DANTAS, A. A. A.; CARVALHO, L. G. & FERREIRA, E. Classificação e tendências climáticas em Lavras, MG. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1862-1866, nov/dez., 2007.

DANTAS-TORRES, F. Rocky Mountain Spotted Fever. **The Lancet Infect Dis**, v. 7, n. 1, p. 724-732, nov 2007.

DAY, N. J.; NEWTON, P. N. Scrub Typhus and Other Tropical Rickettsioses. In: COHEN, J.; POWDERLY, W.G.; OPAL, S. M. **Infectious Diseases**. Ed. Springer International Publishing, 2017. Cap. 128, p. 1091-1097.

DEL FIOL, F. S. et al. A febre maculosa no Brasil. **Rev Panam Salud Publica**. v. 27, n. 6, p. 461–466, 2010.

DHAND, A. et al. Human Granulocytic Anaplasmosis During Pregnancy: Case Series and Literature Review. **Brief Report Human**, v. 45, n. 1, p. 589-593, sept 2007.

DUMLER, J. S. Human Ehrlichiosis and Anaplasmosis in America. **Acta Médica Costarricense**, v. 1, p. 29–33, 2013.

DUMLER, J. S. et al. Human Granulocytic Anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. **Emerging Infectious Diseases**. v. 11, n. 12, dec 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. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 2145–2165, 2001.

DURÃES, L. S. **Biodiversidade de potenciais vetores de Rickettsias spp. em áreas de vulnerabilidade para febre maculosa no município de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil**. 2015, 145 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora- MG, 2015.

FACCINI-MARTÍNEZ, A. A. et al. Febre Maculosa por *Rickettsia parkeri* no Brasil: condutas de vigilância epidemiológica, diagnóstico e tratamento. **J. Health Biol Sci**, v. 6, n. 3, p. 299–312, 2018.

FALCÃO, A. et al. Ocorrência de reagentes positivos para agentes da Anaplasmosis Granulocítica por testes imunoenzimáticos de animais sentinelas em Campos dos Goytacazes, RJ. **Revista Científica da FMC**, v. 9, n. 22, p. 35–42, 2014.

FORTES, F. S. et al. Seroprevalence of *Rickettsia bellii* and *Rickettsia felis* in dogs, São José dos Pinhais, State of Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 4, p.222-227, 2010.

FORTES, F. S. **Infecção por Rickettsia spp. em cães no município de São José dos Pinhais e em capivaras no município de Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil**. 2010, 105p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2010.

FORTES, F.S.; BIONDO, A.W.; MOLENTO, M.B. Febre Maculosa Brasileira em Cães. **Ciências Agrárias**. v. 32, p. 339-354, jan.-mar. 2011.

GAZETA, G. S. Potential vectors and hosts of *Rickettsia* spp: epidemiological studies in the Vale do Paraíba, state of Rio de Janeiro / Brazil. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 15, n. 2, p. 269-270, 2009.

GUGLIELMONE, A. A. et al. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Experimental and Applied Acarology**, v. 40, n. 2, p. 83–100, 2006.

HORTA, M. C. et al. Natural infection, transovarial transmission, and transestadial survival of *Rickettsia bellii* in the tick *Ixodes loricatus* (Acari: Ixodidae) from Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, n.1, p. 285–290, 2006.

ISMAIL, N.; BLOCH, K. C.; MCBRIDE, J. W. Human Erlichiosis and Anaplasmosis. **Clin Lab Med**, v. 30, p. 261–292, 2010.

JOANNITTI, L.H.L. et. al., Estimativa de positividade da febre maculosa em cães para a vigilância e o seu monitoramento no município de Botucatu, SP. **Vet. E Zootec.** v. 21, n. 3, p. 451-461, 2014.

KARPATY, S. E. et al. *Rickettsia amblyommatis* sp. nov., a spotted fever group *Rickettsia* associated with multiple species of *Amblyomma* ticks in no North, Central and South America. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5236–5243, 2016.

KRAWCZAK, F. S. **Avaliação da dinâmica da infecção por *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica, agente etiológico de uma nova riquetsiose brasileira, em carrapatos *Amblyomma ovale* Koch, 1844 naturalmente infectados.** 2012, 89 p. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

KRAWCZAK, F. S. et al. Case Report: *Rickettsia* sp. Strain Atlantic Rainforest Infection in a Patient from a Spotted Fever-Endemic Area in Southern Brazil. **Am J. Trop. Hyg.**, v. 95, n. 3, p. 551-553, 2016a.

KRAWCZAK, F. S. et al. Comparative evaluation of *Amblyomma ovale* ticks infected and noninfected by *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest, the agent of an emerging rickettsiosis in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 1, p. 502-507, 2016b.

KRAWCZAK, F. S. et al. Ecology of a tick-borne spotted fever in southern Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 70, n. 2, p. 219–229, 2016c.

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. Carta Acarológica. In XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses, 2004, Ouro Preto, MG. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 1, 2004.

LABRUNA, M. B. et al. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. **Revista MVZ Córdoba**, v. 16, n. 2, p. 2435–2457, 2011.

LABRUNA, M. B. et al. Rocky Mountain Spotted Fever in Dogs, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, p. 249–255, 2009.

LABRUNA, M. B., et al. Prevalence of *Rickettsia* Infection in Dogs from the Urban

and Rural Areas of Monte Negro Municipality, Western Amazon, Brazil . **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 7, n. 2, p. 249–255, 2007.

LABRUNA, M. B. et al. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the State of Rondonia, Western Amazon, Brazil. **Journal of Medical Entomology**. v. 41, n. 6, p. 1073–1081, 2004.

LABRUNA, M. B.; MACHADO, R. Z. Agentes transmitidos por carrapatos na região neotropical. In: BARROS-BATTESTI, D. M. ARZUA, M.; BECHARA G.H. (Ed.). **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: um guia ilustrado para a identificação de espécies**. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, p.155 164, 2006.

LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C. Carrapato em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 6, n. 30, p. 24-32, jan.-fev. 2001.

LADO, P. et al. First molecular detection of *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma tigrinum* and *Amblyomma dubitatum* ticks from Uruguay. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 6, p. 660–662, 2014.

MACHADO, R. Z.; et al. Migratory and Carnivorous Birds in Brazil: Reservoirs for *Anaplasma* and *Ehrlichia* Species?. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 8, p. 705–708, 2012.

MARTINS, G. P. **Detecção sorológica de riquetsias do grupo da febre maculosa e levantamento acarológico em equinos no Distrito Federal, Brasil**. 2014, 41p. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal), Universidade de Brasília-Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília/DF, 2014.

MARTINS, M. E. P. et al. Identificação e pesquisa de *Rickettsia* spp. em carrapatos colhidos em cães e equinos de Quirinópolis, Goiás, Brasil. **Multi-Science Journal**.v.1 n. 1 p. 120-127, 2015.

MARTINS, M. E. P. et al., Inquérito epidemiológico de suposto foco de febre maculosa. **Cienc. Anim. Bras**, v.17, n.3, p. 459-471, jul/set. 2016.

MAZZOTTI, G. A. et al. Investigação molecular de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* e *Rickettsia* spp. em felídeos selvagens cativos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 528–535, março 2018.

MEDEIROS, A. P. et al. Spotted fever group *Rickettsia* infecting ticks (Acari: Ixodidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. **Mémoires do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro/RJ, v. 106, n. 8, p. 926-930, dec 2011.

MELO, A. L. T. et al. Seroprevalence and risk factors to *Ehrlichia* spp. and *Rickettsia* spp. in dogs from the Pantanal Region of Mato Grosso State, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 2, n. 4, p. 213–218, 2011.

MILAGRES, B. S. et al., *Rickettsia* in Synanthropic and Domestic Animals and Their Hosts from Two Areas of Low Endemicity for Brazilian Spotted Fever in the Eastern Region

of Minas Gerais, Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 83, n. 6, p. 1305-1307, 2010.

MORAES-FILHO, J. et al. New Epidemiological Data on Brazilian Spotted Fever in an Endemic Area of the State of São Paulo, Brazil. **Vector-Borne And Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 1, p. 73-79, 2009.

NAVA, S. et al. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844, and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 1, p. 252-276, 2014.

NICHOLSON, W. L. et al. The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 4, p. 205–212, 2010.

NOGUEIRA, C. I., et al., Risk factors associated with seroprevalence of *Neospora caninum* in dogs from urban and rural areas of Milk and coffee production in Minas Gerais state, Brazil. **Epidemiol. Infect**, Cambridge, n. 141, p. 2286-2293. 2013.

NOGUEIRA, R. M. S. et al. Molecular and serological detection of *Theileria equi*, *Babesia caballi* and *Anaplasma phagocytophilum* in horses and ticks in Maranhão, Brazil. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 37, n. 12, p. 1416–1422, dez. 2017.

OLIVEIRA, S. V. et al. *Amblyomma* ticks and future climate: Range contraction due to climate warming. **Acta Tropica**, v. 176, n. 1, p. 340–348, set. 2017.

OLIVEIRA, S. V. et. al., Vigilância de ambientes da febre maculosa: explorando as áreas silenciosas do Brasil. **Vet. Pan-Amaz Saude**. v. 7 n. 3 p. 65-72, 2016.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; SCOLFORO, J. R. S. & MELLO, J. M. de. Composição florística e estrutura comunitária de um remanescente de floresta semidecídua Montana em Lavras, MG. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.17, n. 2, p. 167-182,dez. 1994.

OTOMURA, F.H. et al., Anticorpos anti-rickettsias do grupo da febre maculosa em equídeos e caninos no norte do Estado do Paraná, Brasil. **Arq. Bras. Vet. Zootec**, v. 6, n. 3, p. 761-764, 2010.

PACHECO, R. C. et al., Rickettsial infections of dogs, horses and ticks in Juiz de Fora, southeastern Brazil, and isolation of *Rickettsia rickettsii* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 25, n. 1, p. 148-155, 2011.

PACHECO, R. C. Zoonoses transmitidas por carrapatos. **XXXV Semana Capixaba do Médico Veterinário e III Encontro Regional de Saúde Pública em Medicina Veterinária**, v. 1, p. 1–11, set. 2008.

PADDOCK, C.D. et al. *Rickettsia parkeri*: A newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 1, p. 805–811, mar. 2004.

PADDOCK, C. D., et al. Short Report: Concurrent Rocky Mountain Spotted Fever in

a dog and its owner. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 66, n. 2, p. 197-199, 2002.

PAROLA, P.; LABRUNA, M. B.; RAOULT, D. Tick-borne rickettsioses in America: unanswered questions and emerging diseases. **Current Infectious Disease Reports**, v. 11, n. 1, p. 40-50, 2009.

PASSOS, L. M. F. In vitro cultivation of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in tick cell lines: a review. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinaria**, Jaboticabal/SP, v. 2961, p. 81–86, abr.-jun. 2012.

PINTER, A. Vigilância da Febre Maculosa Brasileira no estado de São Paulo. In: III Congresso Latinoamericano de Acarologia e VI Simpósio de Acarologia. Pirenópolis/GO. **Anais do III Congresso Latinoamericano de Acarologia e VI Simpósio Brasileiro de Acarologia**. Pirenópolis/GO, jul/ago. 2018. Disponível em: <http://www.sibac.net.br/CD/busca-nos-anais.html>

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**, Rio de Janeiro/RJ, v. 24, n. 2, p. 247-252, fev. 2008.

PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in Cell Culture from the Tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Ann. New York Academy of Sciences**, v. 1078, n. 1, p. 523-530, 2006.

PINTO, A. B. T. et al. Anaplasmataceae em gatos (*Felis catus*) no município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 6, p. 1137–1150, jun. 2018.

PIRANDA E.M. et al., Experimental infections of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical and laboratorial findings. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro/RJ, v. 103, n. 7 p. 696-701, nov. 2008.

PIRANDA, E. M. et al. Experimental infection of *Rhipicephalus sanguineus* ticks with the bacterium *Rickettsia rickettsii*, using experimentally infected dogs. **Vector-Borne and Zoonotic Disease**, v. 11, n. 1, p. 29-37, 2011.

PORTILLO, A. et al. Guidelines for the Detection of *Rickettsia* spp. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 17, n. 1, p. 23–32, 2017.

POUBEL, I. T. et al. Seroprevalence of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia parkeri* in dogs during a Brazilian Spotted Fever outbreak in the State of Rio de Janeiro. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 70, n. 3, p. 667–674, 2018.

PRADO, L. G. et al. Detecção Direta e Evidência de Exposição à *Anaplasma phagocytophilum* em Equinos de Minas Gerais, Brasil. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal/SP, v. 33, n. 2, p. 57–63, 2017.

RABINOWITZ, P. M.; SCOTCH, M L.; CONTI, L. A. Animals as sentinels: Using comparative medicine to move beyond the laboratory. **ILAR Journal**, v. 51, n. 3, p. 262-263, 2010.

RABINOWITZ, P. M.; SCOTCH, M. L.; CONTI, L. A. Human and animal sentinels for shared health risks. **Vet. Ital.**, v. 45, n. 1, p. 23-24, feb. 2009.

SACCHI, A. B. V.; DUARTE, M. R.; MACHADO, R.Z. Prevalence and molecular characterization of Anaplasmataceae agents in free-ranging Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 35, n. 4, p. 325–334, 2012.

SANGIONI, L. A. et al., Rickettsial infection in animals and Brazilian Spotted Fever endemicity. **Emerging Infectious diseases**, v. 11, n. 2, p. 265-269, feb. 2005.

SANTOS, H. A. et al. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Brazilian dogs by real-time polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 4, p. 770–774, 2011.

SANTOS, H. A. et al. Molecular epidemiology of the emerging zoonosis agent *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) in dogs and ixodid ticks in Brazil. **Parasites and Vectors**, v. 6, n. 1, p. 1–10, 2013.

SANTOS, M. G.; GAGLIANI, L. H. Febre Maculosa; **Revista Unilus Ensino e Pesquisa**, v. 4, n. 6, p. 17-21, 2007.

SCHROEDER, C. et al. Human rickettsioses: host response na molecula pathogenesis. In THOMAS, S. **Rickettsiales: biology, molecular biology, epidemiology and Vaccine development.** Wynnewood: Ed. Springer International Publishing, 2016. Cap. 19, p. 399-446.

SHAN NEO, J. P.; TAN, B. H. The use of animals as a surveillance tool for monitoring environmental health hazards, human health hazards and bioterrorismo. **Veterinary Microbiology**, v. 203, n. 1, p. 40-48, 2017.

SILVEIRA, J. A. G. et al. Important frequency of *Anaplasma phagocytophilum* infection in a population of domiciled dogs in an urbanized area in south-eastern Brazil. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 37, n. 9, p. 958–962, set. 2017.

SILVEIRA, J.A.G et al., The first clinical and laboratory evidence of co-infection by *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia canis* in a Brazilian dog. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v 6, p. 242-245, 2015.

SPOLIDORIO, M. G. et al. Survey for Tick-borne diseases in dogs from the Eastern Amazon, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet**, Jaboticabal/SP, v. 22, n. 2, p. 241-219, abr-jun. 2013.

SPOLIDORIO, M. G.; LABRUNA, M. B.; MANTOVANI, E.; et al. Novel spotted fever group rickettsiosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 521–523, mar. 2010.

ST.CLAIR, K. S.; DECKER, C. F. Ehrlichioses: Anaplasmosis and Human Ehrlichiosis. **Dis Mon**, v. 58, n. 6, p. 346–354, 2012.

SUCEN/ SES-SP - SECRETARIA DO ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Febre Maculosa Brasileira. **Sucen, Técnico**, 2011.

SZABÓ, M. P. J. et al. Ticks (Acari: Ixodidae) parasitizing humans in an Atlantic rainforest reserve of Southeastern Brazil with notes on host suitability. **Experimental and Applied Acarology**, v. 39, n. 3–4, p. 339–346, 2006.

TABOR, G. M.; AGUIRRE, A. A. Ecosystem Health and Sentinel Species: Adding an Ecological Element to the Proverbial “Canary in the Mineshaft”. **EcoHealth**, v. 1, n. 1, p. 226-228, p. 2004.

THOMAS, S. et al. The importance of Rickettsiales Infections. In: THOMAS, S. **Rickettsiales: biology, molecular biology, epidemiology and Vaccine development..** Wynnewood: Ed. Springer International Publishing 2016.

TUDDENHAM, S. *Ehrlichia, Anaplasma, and Rickettsia*. In: CHANMUGAM et al. **Infectious Diseases Emergencies**. New York: Ed. Oxford University Press, 2017. Cap.51, p. 285-290.

UETI, M. W. et al. Identification of midgut and salivary glands as specific and distinct barriers to efficient tick-borne transmission of *Anaplasma marginale*. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 6, p. 2959-2964, jun. 2007.

UETI, M. W. et al. Quantitative differences in salivary pathogen load during tick transmission underlie strain-specific variation in transmission efficiency of *Anaplasma marginale*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 1, p. 70-75, jan. 2009.

VIANNA, M. C. B. et al.; Rickettsial Spotted Fever in Capoeirão Village, Itabira, Minas Gerais, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 50, n. 5, p. 297-301, sep-oct, 2008.

VIEIRA, R. F. C. et al. Ehrlichiosis in Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 20, n. 1, p. 1–12, jan-mar 2011.

VIEIRA, T.S.W.J. et al. Serosurvey of tick-borne pathogens in dogs from urban and rural areas from Parana State, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet**, Jaboticabal/SP, v. 22, n.1, p. 104-109, jan-mar 2013.

WECK, B. et al. Spotted Fever Group Rickettsia in the Pampa Biome, Brazil, 2015–2016. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 11, p. 2014–2016, 2016.

WOLDEHIWET, Z. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. **Veterinary Parasitology**, v. 167, n. 2–4, p. 108–122, 2010.