

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**FERNANDA MARINHO MURARO**

**INFECÇÃO POR RIQUETSIAS EM CARRAPATOS DE CÃES E DO  
AMBIENTE NO ENTORNO DO PARQUE ESTADUAL DO PAU FURADO,  
NOS MUNICÍPIOS DE ARAGUARI E UBERLÂNDIA, MINAS GERAIS**

**UBERLÂNDIA – MG**

**2019**

**FERNANDA MARINHO MURARO**

**INFECÇÃO POR RIQUETSIAS EM CARRAPATOS DE CÃES E DO  
AMBIENTE NO ENTORNO DO PARQUE ESTADUAL DO PAU FURADO,  
NOS MUNICÍPIOS DE ARAGUARI E UBERLÂNDIA, MINAS GERAIS**

Projeto de pesquisa apresentado a coordenação do curso graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito à aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II.

Orientador: Prof. Dr. Matias Pablo Juan Szabó

**UBERLÂNDIA – MG**

**2019**

**FERNANDA MARINHO MURARO**

**INFECCÃO POR RIQUETSIAS EM CARRAPATOS DE CÃES E DO  
AMBIENTE NO ENTORNO DO PARQUE ESTADUAL DO PAU FURADO,  
NOS MUNICÍPIOS DE ARAGUARI E UBERLÂNDIA, MINAS GERAIS**

Projeto de pesquisa apresentado a coordenação do curso graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito à aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II.

Uberlândia, 29 de novembro de 2019

Banca Examinadora

---

Prof. Dr. Matias Pablo Juan Szabó  
Universidade Federal de Uberlândia/MG

---

Profa. Dr<sup>a</sup>. Roberta Torres de Melo  
Universidade Federal de Uberlândia/MG

---

Msc. Raissa Brauner Kamla Vieira  
Universidade Federal de Uberlândia/MG

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por toda a força que me proporcionou durante esses anos, fazendo com que eu jamais deixasse de tentar e continuar.

Agradeço eternamente aos meus pais, Antonio Muraro e Miriam Isabel, obrigada por terem acreditado em mim, por terem ajudado a trilhar meu caminho e a realizar meu sonho! Obrigada por serem seres tão iluminados!

Agradeço a minha irmã, Marcela, pelo apoio nas horas mais difíceis e pelas palavras de consolo.

A toda minha família, sou grata pelo suporte e pela torcida!

As minhas avós, em especial a vó Maria, pelos colos, pelas torcidas e pelo exemplo de mulher guerreira! Minha eterna gratidão!

Ao meu orientador, pelo suporte para que este e muitos outros trabalhos pudessem ser realizados. Obrigada professor pelos ensinamentos, pela paciência e compreensão. O senhor é um exemplo!

A Marlene por toda a paciência, ensinamentos laboratoriais e parceria. Jamais esquecerei a sua força de vontade.

A família LABIX, em especial a Laís, Raíssa, Vinícius, obrigada pela paciência, pelo companheirismo, pela troca de experiência.

Ao meu amigo de IC, Gabriel: Obrigada pelo suporte.

Aos meus amigos de curso: Tanajé, Beatriz, Bruna, Letícia, Juliana e Júlio e aos meus amigos de pensão: Lara, Gabriel, Victória, Fabiana, Florentino e tantos outros, muito obrigada por terem compartilhado momentos incríveis comigo!

Aos animais que proporcionaram que este trabalho fosse realizado, minha gratidão!

Agradeço a CNPq que proporcionou a realização deste trabalho.

A todos que de alguma maneira colaboraram com a realização deste trabalho, minha mais sincera e eterna gratidão!

## RESUMO

Microrganismos patogênicos em áreas naturais são integrantes da biodiversidade. De forma geral, estes patógenos ficam restritos ao ambiente original pelas necessidades biótica e abióticas evolutivamente impostas. Por outro lado, atitudes de preservação e reconstituição de áreas naturais bem como a procura para lazer e moradia com a aceitação da proximidade de animais selvagens, como a capivara no Brasil, são crescentes. Estas modificações aumentam a interface da vida selvagem com humanos e adicionaram complexidade às relações patógeno-hospedeiro. Desta maneira, o incremento de determinadas doenças infecciosas já conhecidas e o surgimento de novas é antecipável. Neste contexto, vetores como os carrapatos e um hospedeiro em especial, o cão, servem como ponte importante dos patógenos de áreas naturais para o homem. Destaca-se que riquetsias, bactérias intracelulares, são os principais agentes de zoonoses transmitidas por carrapatos no Brasil. Neste trabalho foram pesquisadas espécies de *Rickettsia* em carrapatos do ambiente e de cães em propriedades rurais no entorno do Parque Estadual do Pau Furado (PEPF), municípios de Araguari e Uberlândia, Minas Gerais, uma reserva natural de Cerrado. Ao todo foram coletados 167 carrapatos em cães de duas espécies: *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma sculptum*. Foi observada uma prevalência de 78,6%, intensidade média de infestação de 14,9 e abundância média de 11,7, de infestação por *R. sanguineus* e prevalência de 14,3%, intensidade média de 1,5 e abundância média 0,2 de infestação por *A. sculptum* nos cães. No ambiente foram coletados 42 carrapatos das espécies *Amblyomma sculptum* e *Amblyomma dubitatum*. A pesquisa de DNA de *Rickettsia* sp. pela PCR foi realizada em 58 amostras, resultando em duas amostras (um pool de larvas *Amblyomma spp.* e uma ninfa de *A. dubitatum*) positivas para *R. bellii* e uma amostra (pool de larvas *Amblyomma spp.*) amplificada para o gene *OmpA*. Das 12 amostras de soro de cães, nove (75%) apresentaram sororeatividade para alguma espécie de riquetsia, destes, seis (66,7%) apresentaram títulos para *R. rhipicephali*, sendo que dois (33,3%) apresentaram títulos  $\geq 1:1.024$ . A sororeatividade também foi observada com *R. rickettsii* em três (33,3%) cães sendo que um (33,3%) apresentou título  $\geq 1:1.024$ .

**Palavras-Chave:** Cães. Carrapatos. Cerrado. riquetsia. Zoonose.

## ABSTRACT

Pathogenic microorganisms in natural areas are part of biodiversity. In general, these pathogens are restricted to the original environment by biotic and abiotic constraints. On the other hand, attitudes of preservation and reconstitution of the natural environment, as well as the demand for recreation and living with the acceptance of proximity to wild animals, such as the capybara in Brazil, are increasing. These modifications increase the interface of wildlife with humans and added complexity to host-pathogen relations. So, the development of certain infectious diseases already known and the emergence of new ones is predictable. In this context, vectors like ticks, and a specific host, the dog, stands as an important bridge of pathogens from natural areas to the men. It should be noted that rickettsia, intracellular bacteria, are the principal zoonotic agents transmitted by ticks in Brazil. In this work, we studied *Rickettsia* species in ticks from the environment and from dogs of rural properties surrounding the Pau Furado's State Park, Araguari and Uberlândia, Minas Gerais, a nature reserve of Cerrado. On the whole 167 ticks were collected from dogs of two species: *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma sculptum*. An infestation prevalence of 78.6%, medium infestation intensity of 14.9 and average abundance of 11.7 was observed for *R. sanguineus* and of, respectively 14.3%, 1.5 and 0.2 for *A. sculptum* on dogs. In the environment 42 ticks from the species *Amblyomma sculptum* e *Amblyomma dubitatum* were collected. The search of *Rickettsia* sp. DNA was done in 58 tick samples and two samples (one larva *Amblyomma spp.* pools and one nymph of *A. dubitatum*) were positive to *Rickettsia bellii* and one sample (larva *Amblyomma spp.* pools) amplified for the *OmpA* gene.

Of 12 samples of dogs serum, nine (75%) showed sororeactivity for at least one *Rickettsia* species, of these, six (66.7%) reacted *R. rhipicephali*, and from these two (33.3%) showed titles  $\geq 1:1.024$ . The sororeactivity for *R. rickettsii* was observed in three (33.3%) dogs, and from these one (33,3%) showed title  $\geq 1:1.024$ .

**Key Words:** Dogs. Ticks. Cerrado. Rickettsia. Zoonosis.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>11</b>
<b>3.1</b>	<b>Área de Estudo</b> .....	<b>11</b>
<b>3.2</b>	<b>Coletas de Carrapatos</b> .....	<b>12</b>
<b>3.3</b>	<b>Coleta de Carrapatos do Ambiente</b> .....	<b>12</b>
<b>3.4</b>	<b>Coleta de Carrapatos de Cães</b> .....	<b>13</b>
<b>3.5</b>	<b>Pesquisa de <i>Rickettsia</i> em Carrapatos</b> .....	<b>13</b>
<b>3.6</b>	<b>Teste da Hemolinfa</b> .....	<b>14</b>
<b>3.7</b>	<b>Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)</b> .....	<b>15</b>
<b>3.8</b>	<b>Análise dos Resultados</b> .....	<b>16</b>
<b>3.9</b>	<b>Ética</b> .....	<b>16</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>22</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>23</b>
	<b>ANEXO I</b> .....	<b>26</b>
	<b>ANEXO II</b> .....	<b>27</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Três quartos das doenças infecciosas emergentes humanas são zoonóticas e a maioria dos patógenos se origina da vida selvagem (RYAN; SPRAKER, 2010). O aumento de doenças infecciosas de seres humanos associadas à vida selvagem pode ser atribuído, entre outros, ao contato maior estabelecido por atitudes antropogênicas (RYAN et al., 2010). Neste contexto, merece atenção um agente importante: o cão (OTRANTO et al., 2009). Trata-se de uma espécie que é privilegiada em sua convivência com o homem, além disso, explora o ambiente que o cerca e, se não restrito, percorre distâncias grandes, inclusive áreas selvagens (QUEIROGAS et al., 2010). Nesta situação o cão se expõe a uma variedade maior de ambientes e potencialmente estabelece um fluxo de vetores e/ou patógenos para seres humanos como, por exemplo, carrapatos e riquetsias (PINTER; LABRUNA, 2006; QUEIROGAS et al., 2010; SZABÓ et al., 2013a).

Neste trabalho estudou-se a infecção por riquetsias em carrapatos de cães e do ambiente através da pesquisa de DNA no potencial vetor e a exposição dos cães por soro-reatividade anti-riquetsias.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

O Cerrado é considerado um “hotspot” da biodiversidade global o que significa que possui um número particularmente elevado de espécies endêmicas e está muito ameaçado pelas atividades humanas (CINCOTTA et al., 2000). Este bioma também alberga grande parte da população brasileira. Sua pulverização pelas atividades produtivas e urbanização dos últimos séculos associada às medidas mais recentes de conservação e reconstituição de reservas (muitas urbanas) e alteração comportamental do homem face à vida selvagem, criaram áreas novas e diversas de interface. O efeito deste processo sobre a biodiversidade em pequenos remanescentes naturais, áreas reconstituídas, grandes reservas e seu entorno, áreas verdes de lazer e outros é uma incógnita. Neste contexto, porém é certo que outros elementos da biodiversidade, como insetos, artrópodes e microrganismos são também influenciados e as relações hospedeiro-vetor-microrganismo afetadas, algumas com potencial para originarem zoonoses emergentes ou reemergentes.

Doenças transmitidas por carrapatos exemplificam algumas das consequências deste complexo de modificações no Brasil. Por exemplo, a epidemiologia da Febre Maculosa Brasileira causada pela bactéria *Rickettsia rickettsii* é ainda pouco compreendida. Porém, a reemergência da enfermidade humana está vinculada ao crescimento de populações de capivaras em proximidade ao homem (quando é transmitida por carrapatos do complexo *Amblyomma cajennense*) ou associada aos cães que veiculam carrapatos *Amblyomma aureolatum* infectados de áreas de Mata Atlântica (PINTER; LABRUNA, 2006; revisto por SZABÓ et al., 2013a; KRAWCZAK et al., 2014).

Carrapatos, artrópodes ectoparasitas obrigatórios, são encontrados em todos os ambientes terrestres, desde desertos quentes a ambientes gelados, e parasitam todos os vertebrados terrestres incluindo aves, répteis e mamíferos (SONENSHINE, 2002). Notavelmente, carrapatos são vetores de diversos agentes infecciosos ao homem e animais e só perdem para os mosquitos como vetores de patógenos para o homem, muito embora possam transmitir uma variedade maior de agentes infecciosos (JONGEJAN; UILENBERG, 2004). Em ambientes naturais carrapatos integram a fauna parasitária que coexiste com hospedeiros (PEREIRA et al., 2000) estabelecendo relações que moldam ambos (parasita e hospedeiro) evolutivamente.

O Brasil possui, a saber, 72 espécies de carrapatos (LABRUNA, 2018). O conhecimento sobre a biologia e ecologia destes, entretanto, é majoritariamente sobre um

número reduzido de espécies, aquelas mais abundantes nas áreas urbanas e rurais. As outras espécies assim como seus hospedeiros e microrganismos associados, estão mais afastadas em ecossistemas e microambientes específicos às vezes em populações reduzidas. No entanto, as alterações ambientais, modificações de comportamento humano e trânsito de cães já mencionados tornam estas espécies alvo importante de pesquisa haja visto o incremento de contato com o ser humano. Exemplo disso, relatos recentes sobre carrapatos de animais selvagens em cães é comum (QUEIROGAS et al., 2010; SZABÓ et al., 2007, 2013a). O carrapato *Amblyomma ovale*, exemplifica esta situação de forma mais específica para a saúde pública. Parasita de carnívoros em sua forma adulta (LABRUNA et al., 2005) este carrapato é comum em cães que adentram áreas naturais do Cerrado e Mata Atlântica (QUEIROGAS et al., 2010; SZABÓ et al., 2013a). Constatou-se recentemente a associação de uma riquetsia patogênica para seres humanos no Brasil (SPOLIDORIO et al., 2010) com áreas naturais, cães e *A.ovale* (SABATINI et al., 2010; SZABÓ et al., 2013a).

Riquetsias são os principais agentes de zoonoses transmitidas por carrapatos no Brasil (LABRUNA, 2009). Até recentemente a única riquetsiose humana conhecida transmitida por carrapatos era a Febre Maculosa Brasileira causada pela bactéria *Rickettsia rickettsii*. Uma segunda riquetsiose humana, mais branda, foi recentemente identificada no Brasil e atribuído a uma riquetsia (cepa Mata Atlântica) transmitida por carrapatos *A. ovale*. Finalmente há de se considerar que nas últimas duas décadas novas espécies de riquetsias do grupo da febre maculosa foram identificadas no Brasil em carrapatos de áreas verdes mais preservadas ou em fragmentos (LABRUNA et al., 2004; OGRZEWALSKA et al., 2008).

Com a modificação acentuada entre a relação dos seres humanos com animais, ambientes prístinos e conservação da natureza, ocorreram conjuntamente alterações nas interfaces entre áreas rurais e urbanas e áreas naturais. Neste contexto, relações hospedeiro-parasita podem se modificar, entre outros, com a amplificação de populações de parasitas ou estabelecimento de novas interações.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Área de Estudo

O estudo foi conduzido no assentamento Águas Limpas (**figura 1**) (Coordenadas: - 18° 46' 47", - 48° 08' 51.7"), em Araguari, Minas Gerais, vizinha ao Parque Estadual do Pau Furado (coordenadas: - 18° 49' 17.4", - 48° 09' 55.2"). Ao todo foram realizadas três coletas, as quais ocorreram durante os meses de fevereiro e março de 2019. Parque Estadual do Pau Furado (PEPF) é uma reserva de Cerrado, administrada pelo Instituto Estadual de Florestas (IEF). O PEPF está localizado nos municípios de Uberlândia e Araguari, região do Triângulo Mineiro, Estado de Minas Gerais, ocupando uma área total de 2.186,849 hectares. A vegetação do PEPF é caracterizada pelo bioma Cerrado, apresentando pequenas áreas de ocorrência de Mata Atlântica, ao longo do rio Araguari. O PEPF abriga uma rica flora e fauna e encontra-se cercada por propriedades particulares que desenvolvem desde agricultura de subsistência a diversas atividades comerciais e turísticas. Muitas das propriedades do assentamento possuem um ou mais cães que, de forma variável, de local para local, acessam áreas naturais e fragmentos do cerrado.

**Figura 1.** Local de estudo localizado no interior do assentamento Águas Limpas. Na área circulada notamos a presença de um cão.



**Fonte:** Arquivo Pessoal.

### 3.2 Coletas de Carrapatos

Carrapatos foram coletados em propriedades localizadas do entorno do PEPF. Para tal foram selecionadas 05 propriedades por conveniência. Os critérios para a escolha destas propriedades foram em ordem de importância: 1) autorização do proprietário (**Anexo I**), 2) presença de cães e 3) presença de fragmentos de áreas naturais, na maioria das vezes a reserva legal, próximas à PEPF que permitam fluxo da fauna selvagem.

### 3.3 Coleta de Carrapatos do Ambiente

Estas coletas foram realizadas nas áreas naturais das propriedades. As coletas de carrapato foram feitas por meio de arraste de flanela e com armadilhas de gelo seco, o qual atua como fonte de CO<sub>2</sub>, para atrair carrapatos (CANÇADO, 2008), conforme descrito anteriormente (SZABÓ et al., 2007). Foram determinados cinco pontos de coleta, próximos a borda da mata, conforme ilustrado na **Figura 2**. Em cada um dos pontos foram posicionadas cinco armadilhas de gelo seco, com exceção do ponto de número 4, no qual foram colocadas de 06 armadilhas, totalizando 26 armadilhas de gelo seco. O arraste utilizando flanela (**figura 3a**) foi realizado nas trilhas de acesso e entorno dos pontos de número 1, 4 e 5 totalizando 1000 metros de arraste (área de 1000 m<sup>2</sup>).

### 3.4 Coleta de Carrapatos de Cães

Em cada propriedade visitada, todos os cães disponíveis foram contidos manualmente e a superfície de cada animal cuidadosamente inspecionada (**figura 3b**). Cada animal inspecionado foi identificado devidamente de acordo com o local de origem, raça e sexo. Foi ainda averiguado o acesso do cão aos ambientes da região (restrito ao domicílio do responsável, circulação pela propriedade, acesso às áreas naturais).

Todos os carrapatos coletados foram armazenados em frascos de acrílico e transportados até o Laboratório de Ixodologia da Universidade Federal de Uberlândia (LABIX-UFU) para posterior identificação de acordo com chaves dicotômicas (BARROS-BATTESTI et al. 2006, MARTINS et al. 2010).

**Figura 2.** Pontos de coleta de carrapatos, representados pelos números de 1 a 5, nas proximidades do assentamento Águas Limpas e Parque Estadual do Pau Furado, Araguari, MG.



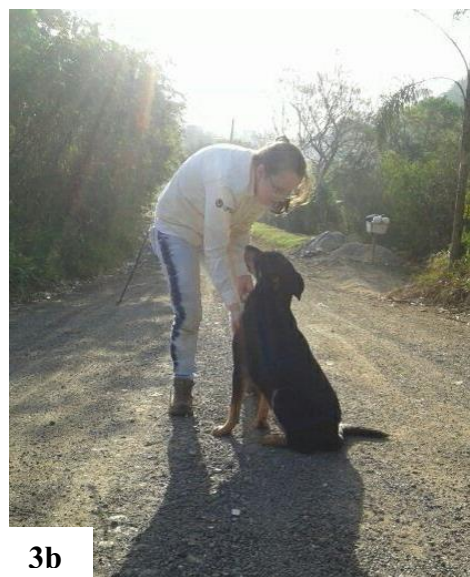
Fonte: Google Maps (2019).

**Figura 3a.** Técnica de Arraste com flanela. **Figura 3b.** Imagem ilustrativa da vistoria do corpo de um animal para procura de carrapatos.



3a

Fonte: Arquivo Pessoal.



3b

Fonte: Arquivo Pessoal.

### 3.5 Pesquisa de *Rickettsia* em Carrapatos

A pesquisa de DNA de *Rickettsia* em carrapatos foi feita através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras de carrapatos coletados do ambiente e dos cães presentes em cada propriedade. Para esse fim, carrapatos adultos e ninfas foram individualmente processados para extração de DNA pelo método de tiocianato de guanidina (SANGIONI et al. 2005). Larvas em “pools” de 9, 15 e 20 indivíduos foram processadas. O DNA extraído foi submetido à reação de PCR para gene 16S, a fim de confirmar o sucesso da extração e em seguida foi submetido à PCR para o gene *gltA* (CS2) - conforme descrito por Labruna et al. (2004) - o qual está presente em todas espécies de riquetsia. Como controle positivo nas reações DNA para 16S e *gltA* foi utilizada 1µL da amostra de *Rickettsia parkeri* gentilmente cedido por Marcelo Bahia Labruna, (FMVZ – USP). Para PCR do gene *R. bellii* e *OmpA*, foram utilizados como controle positivo 1µL de *R. bellii* e *R. rickettsii*. Após a realização destes procedimentos, as amostras que mostraram-se positivas para o gene *gltA* foram encaminhadas primeiro para PCR específica para *R. bellii* e as que mostraram-se negativas na reação anterior passaram por uma segunda PCR para gene *OmpA*, gene este presente nas riquetsias do Grupo da Febre Maculosa.

### 3.6 Teste da Hemolinfa

O teste de hemolinfa é um método de triagem que permite identificar, sob microscopia de luz, os carrapatos adultos que estejam infectados por organismos morfológicamente compatíveis com riquetsias (BURGDORFER, 1970). Cada carrapato adulto vivo teve a porção distal de uma das patas cortada e uma a duas gotas de sua hemolinfa foi instilada sobre lâmina de vidro limpa e desengordurada. As lâminas assim obtidas foram fixadas ao ar livre, coradas pelo método de Gimenez (1964) e examinadas ao microscópio óptico sob imersão (objetiva 100x). Após este procedimento os carrapatos foram congelados e armazenados individualmente a -80 °C.

### 3.7 Coleta de Amostra Sanguínea de Cães

Para a realização da coleta de sangue dos cães, os mesmos foram contidos manualmente e por meio da punção da veia cefálica, o sangue foi armazenado em tubos a vácuo e trazidos para o Laboratório de Ixodologia (LABIX- UFU), em temperatura ambiente. Para obtenção do soro, foi utilizada a centrífuga modelo Daiki 80-2B Centrifuge por 10 minutos a 160G, sendo posteriormente armazenado em freezer a -20°C em tubos de *ependorf* para posterior reação de imunofluorescência indireta (RIFI).

### 3.8 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Para a RIFI foram utilizados antígenos de cinco espécies de *Rickettsia* (*R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyommatis*, *R. rhipicephali* e *R. bellii*) gentilmente cedidas pelo Prof. Marcelo Bahia Labruna da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-USP.

Uma alíquota de soro foi diluída em solução tamponado com fosfato (PBS), na proporção de 1:64, sendo em seguida instilado 20 microlitros sobre cada antígeno (cinco espécies de *Rickettsia*) previamente fixado na lâmina. A lâmina foi incubada em estufa a 37°C durante 30 minutos em câmara úmida, enxaguada e deixada de molho em solução tampão com triton X-100 durante 10 minutos (este processo foi repetido duas vezes cada qual em solução nova), para em seguida ser seca a temperatura ambiente.

Após a secagem foi instilado sobre cada amostra da lâmina 20 microlitros da diluição contendo de conjugado anti-cão diluído 1:600 (Sigma®) e PBS, a qual passou novamente pelo processo de incubação (37°C, 30 minutos) e enxague com solução tampão com triton X-100. As lâminas foram deixadas de molho em uma solução detampão com triton X-100 e corante azul de Evans, sendo este processo e o de secagem agora realizada em câmara escura, tendo em vista que o conjugado não deve ficar exposto à luz devido a fluorescência.

Para leitura em campo escuro da reação em microscópio de imunofluorescência (aumento de 40x), foi adicionado as lâminas gotas de glicerina tamponada (pH=9,0) e lamínulas.

As amostras de soro passaram primeiramente por uma triagem, a qual as soro-reagentes a determinado antígeno (título  $\geq 64$ ) foram submetidas ao processo de titulação, através de diluição seriada do soro em PBS nas seguintes proporções: 1:64, 1:128, 1:256,

1:512 e 1:1024. Todo o processo incubação em estufa com câmara úmida teve a adição de conjugado anti-cão 1:600 e lavagem em solução tamponada de fosfato e triton X-100, com e sem Azul de Evans, realizado na triagem, foi repetido no processo de titulação.

### **3.9 Análise dos Resultados**

Os parâmetros de infestação dos cães foram avaliados conforme Bush et al. (1997), quais sejam; intensidade média (IM) (número total de carrapatos encontrados/número de hospedeiros infestados), prevalência (P) (número de hospedeiros infestados/número de hospedeiros vistoriados) e abundância média (AM) (número total de carrapatos encontrados/número de hospedeiros vistoriados). A pesquisa por riquetsias foi qualitativa, visando à detecção e identificação de espécies. A soroprevalência para animais reativos para *Rickettsia* sp. também foi determinada.

### **3.10 Ética**

A coleta de carrapatos conforme apresentado foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (Protocolo 042/15). (**Anexo II**).



#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a primeira e a terceira coleta, foram coletados carrapatos de 14 e o sangue de 12 animais foi colhido e armazenado em tubos devidamente identificados com o nome do animal, local e data da coleta.

A segunda coleta foi destinada ao ambiente, utilizando o arraste com flanelas por 1000 metros e posicionamento de 26 armadilhas de gelo seco por um período de 1,5 horas.

Ao todo foram coletados no corpo dos cães 167 carrapatos. Destes 145 (86,8%) adultos de *R. sanguineus* (47 fêmeas e 98 machos), três (1,7%) fêmeas de *A. sculptum* e 19 (11,3%) ninfas de *R. sanguineus*. Doze destes carrapatos adultos foram submetidos ao teste da hemolinfa, sendo que todos os mesmos apresentaram resultado negativo.

Como pode ser observado na **tabela 1**, a espécie que apresentou maior prevalência neste trabalho foi a de *R. sanguineus*, sobrepondo-se sobre a de *A. sculptum*. Apesar do número pequeno de cães se comparado ao trabalho realizado por Szabó et al. (2010), na região de Uberlândia, o mesmo resultado pode ser observado, sendo que tanto cães de áreas urbanas como de áreas rurais apresentaram maior infestação por *R. sanguineus*, se comparado a outras espécies de carrapatos.

Estes resultados já são diferentes do que foi descrito por O'dwyer et al. (2001) onde cães de áreas rurais apresentam frequentemente carrapatos do gênero *Amblyomma*, enquanto cães de áreas urbanas apresentam frequentemente infestações por *R. sanguineus*.

Uma possível explicação para os cães apresentarem maior prevalência de *R. sanguineus*, assim como descrito por Labruna et al. (2001) seria pelo fato de que estes hospedeiros possuem locais específicos de repouso próximo a residências. Esta espécie de carrapato apresenta hábitos nidícolas e realiza todo seu ciclo de vida não parasitário em ambiente doméstico seco. Outra possibilidade para a maior prevalência de *R. sanguineus* seria o baixo contato dos cães com locais ou animais silvestres que favorecessem a infestação com outros carrapatos do gênero *Amblyomma* (LABRUNA; PEREIRA, 2001; RODRIGUES et al., 2008).

**Tabela 1.** Prevalência, Intensidade Média e Abundância Média de carrapatos de acordo com a espécie encontrada em cães do município de Araguari, Minas Gerais, Brasil.

Espécie	Prevalência (%)	Intensidade Média	Abundância Média
<i>R. sanguineus</i>	78	14,91	11,71
<i>A. sculptum</i>	14	1,5	0,21

**Fonte:** Arquivo Pessoal.

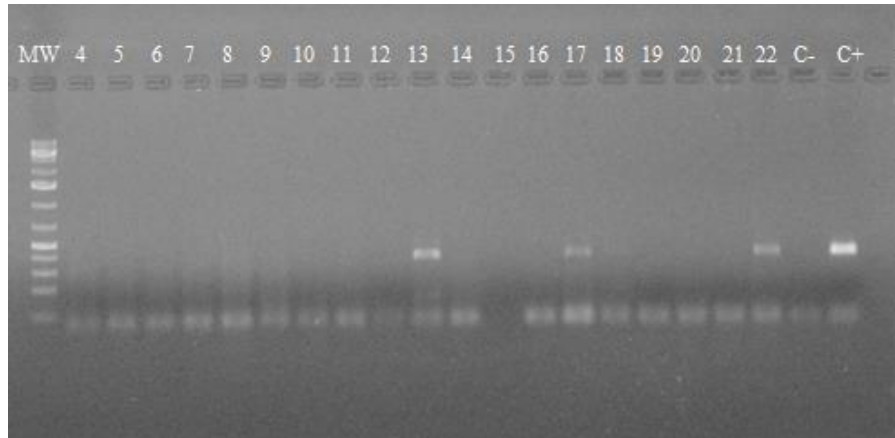
No ambiente ao todo foram coletados 42 carrapatos, sendo três (7,1%) *A. dubitatum* (1 fêmea e 2 ninfas), 33 (78,6%) *A. sculptum* (20 fêmeas, 8 machos e 5 ninfas) e 6 (14,3%) bolos de larvas. Dos 42 carrapatos coletados, 16 foram submetidos ao teste da hemolinfa, a qual apresentou resultados negativos.

Por se tratar de uma área de reserva natural de cerrado e a coleta ter sido realizada no verão, adultos de *A. sculptum* apresentaram maior prevalência no ambiente, assim como descrito por Szabó et al. (2007).

Ao todo 86 carrapatos, tanto do ambiente como de cães – 69 adultos (49 *R. sanguineus*, 19 *A. sculptum*, 1 *A. dubitatum*), 11 ninfas (2 *A. sculptum*, 2 *A. dubitatum*, 7 *R. sanguineus*), e 6 pools contendo 9, 15 ou 20 larvas, foram submetidos à PCR. O êxito na extração de DNA foi confirmado por meio da amplificação do gene 16S, onde 58 carrapatos mostraram-se positivos, sendo que a maioria (60,3%) era *R. sanguineus*. Apenas três destas amostras amplificaram para a porção gene *gltA*, sendo 1 ninfa de *A. dubitatum* e 2 pools de larvas do ambiente.

Como a maioria dos carrapatos que tiveram seu DNA extraído eram da espécie *R. sanguineus*, era de se esperar que não houvesse amplificação para o gene *gltA*, apesar de que estudos recentes vem mostrando que em regiões do Brasil como de Minas Gerais (Pacheco, R. C. et al., 2011) e Rio de Janeiro (Cunha, N. C. et al, 2009; Gehrke, F.S. et al., 2009), foi possível encontrar a presença da bactéria nessa espécie de carrapato.

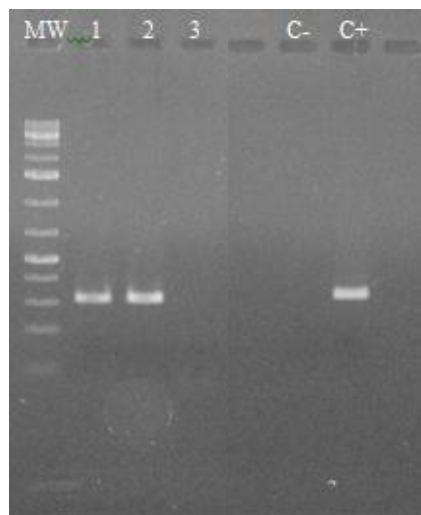
**Figura 4.** Gel de Agarose a 1,2% das amostras submetidas a PCR para amplificação do gene *gltA*. MW: Marcador molecular; C-: Controle negativo; C+: Controle positivo.



Fonte: Arquivo Pessoal.

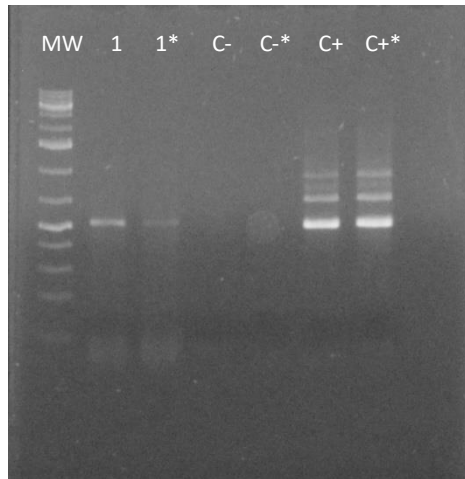
A PCR específica para *R. bellii* foi realizada em três amostras sendo que duas (uma ninfa de *A. dubitatum* e um bolo de larvas *Amblyomma sp.*) resultaram na amplificação de DNA (**figura 5**). A terceira amostra, um bolo de larvas, negativa para *R. bellii* foi submetida a PCR para amplificação do gene *OmpA* e resultou em produto amplificado (**figura 6**). Este resultado indica haver infecção do “pool” de larvas com uma espécie de *Rickettsia* do grupo da Febre Maculosa e que deverá ser identificada por sequenciamento do gene amplificado.

**Figura 5.** Gel de Agarose a 1,2% para *R. bellii* realizada em amostras positivas para *gltA*. MW: Marcador molecular; C-: Controle negativo; C+: Controle positivo.



Fonte: Arquivo Pessoal.

**Figura 6.** Gel de Agarose a 1,2% para *OmpA*. MW: Marcador molecular; C-: Controle negativo; C+: Controle positivo.



**Fonte:** Arquivo Pessoal.

Os soros dos cães reagentes e seus respectivos títulos para cada antígeno foram estão apresentados na **tabela 2**.

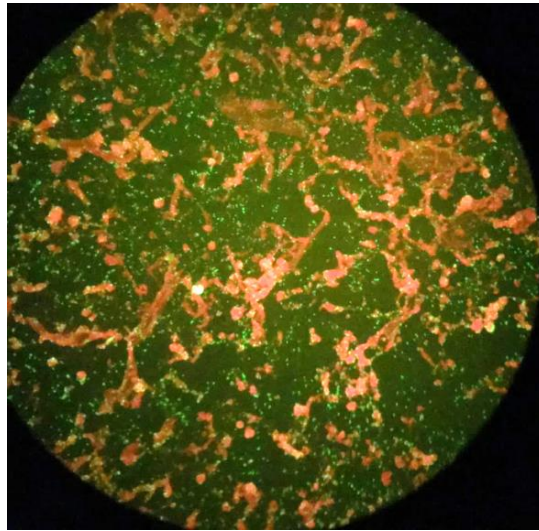
Nove cães (75%) soro-reagiram contra, pelo menos, um antígeno de riquetsia, sendo que dois (16,7%) apresentaram títulos quatro vezes superior quando comparado a outras espécies, considerando assim que o possível causador da infecção no cão 02 seja a *R. rhipicephali* e no cão 04 *R. rhipicephali* ou *R. rickettsii*.

A prevalência pode ser considerada elevada se comparada aos trabalhos realizados por Cardoso et al. (2006) e Silva et al. (2010), onde respectivamente nenhum dos 73 cães testados soro-reagiu e com apenas 3/453 (0,66%) cães soro-reagentes.

No conjunto os resultados indicam que os cães avaliados estão expostos à bactéria *R. bellii* e uma *Rickettsia* do grupo da febre maculosa. A identificação desta última depende do sequenciamento do DNA e comparação com as sequencias do banco genético (Genbank). O sequenciamento também do gene 16S das larvas de *Amblyomma* infectadas pela riquetsia, permitirão a identificação do vetor. Estas análises serão feitas posteriormente.

Considerando o título elevado de alguns animais contra as espécies de riquetsias do grupo da febre maculosa e *R. bellii* a exposição deve ser frequente e a mais de uma espécie de riquetsia. No entanto, o vetor específico para as riquetsias do grupo da febre maculosa permanece desconhecido.

**Figura 7.** RIFI de um cão positivo para uma das cinco espécies de rickettsia.



**Fonte:** Arquivo Pessoal.

**Tabela 2.** Títulos de anticorpos anti-*Rickettsia* spp. obtidos através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) em cães do município de Araguari, Minas Gerais, para 5 espécies de *Rickettsia*.

Soro	Títulos RIFI para os antígenos:				
	<i>R. rickettsii</i>	<i>R. parkeri</i>	<i>R. amblyommatidis</i>	<i>R. rhipicephali</i>	<i>R. bellii</i>
Cão 01	NR	NR	64	128	512
Cão 02	512	256	512	≥1024	512
Cão 03	256	NR	128	256	NR
Cão 04	≥1024	NR	256	≥1024	NR
Cão 05	NR	NR	NR	128	NR
Cão 06	NR	NR	NR	128	NR
Cão 09	NR	NR	128	NR	512
Cão 10	NR	NR	128	NR	NR
Cão 11	NR	NR	NR	NR	NR
Cão 12	NR	NR	NR	NR	256
Cão 13	NR	NR	NR	NR	NR
Cão 14	NR	NR	NR	NR	NR

**Fonte:** Arquivo Pessoal.

NR: Não reagente

## 5 CONCLUSÃO

Cães do entorno do Parque Estadual do Pau Furado são parasitados por carrapatos da espécie *R. sanguineus* e *A. sculptum* e estão expostos a riquetsias do Grupo da Febre Maculosa e *R. bellii*. O vetor específico das riquetsias do grupo da febre maculosa é por ora desconhecido.

## REFERÊNCIAS

- BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G.H. **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, p.223, 2006.
- BUSH, A.O. et al. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. **The Journal of parasitology**, v. 83, n.4, p. 575-583, 1997.
- CANÇADO, P. H. D. **Carrapatos de animais silvestres e domésticos no Pantanal Sul Mato-Grossense (sub-região da Nhecolândia): Espécies, hospedeiros e infestações em áreas com diferentes manejos**. Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 2008
- CARDOSO, L. D. et al. Caracterização de *Rickettsia* spp. circulante em foco silencioso de febre maculosa brasileira no Município de Caratinga, Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 3, p. 495-501, 2006.
- CINCOTTA, R. P.; WISNEWSKI, J.; ENGELMAN, R. Human population in the biodiversity hotspots. **Nature**, v. 404, n. 6781, p. 990-992, 2000.
- CUNHA, N. C. et al . First identification of natural infection of *Rickettsia rickettsii* in the *Rhipicephalus sanguineus* tick, in the State of Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 2, p. 105-108, 2009.
- GEHRKE, F. S. et al. *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia felis* and *Rickettsia* sp. TwKM03 infecting *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis* collected from dogs in a Brazilian spotted fever focus in the State of Rio De Janeiro/Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v.15, p. 267-268, 2009.
- JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v. 129, n. S1, p. S3-S14, 2004.
- KRAWCZAK, F. S. et al. *Rickettsial* infection in *Amblyomma cajennense* ticks and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in a Brazilian spotted fever-endemic area. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 7, 2014.
- LABRUNA et al. Prevalência de carrapatos em cães de áreas rurais da região norte do Estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 5, p. 553-556, 2001.
- LABRUNA, M.B.; PEREIRA, M.C. Carrapato em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, n. 30, p. 24-32, 2001.
- 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. Ecology of rickettsia in South America. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1166, n. 1, p. 156-166, 2009.

LABRUNA, M. B. Comparative survival of the engorged stages of *Amblyomma cajennense sensu stricto* and *Amblyomma sculptum* under different laboratory conditions. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 2018.

MARTINS, T. F. et al. New tick records from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. **Experimental and applied acarology**, v. 62, n. 1, p. 121-128, 2014.

O'DRWYER, L. H; MASSARD, C. L; SOUZA, J. C. P. *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 94, n. 3, p. 143 – 150, 2001.

OGRZEWALSKA, M. et al. Ticks (Acari: Ixodidae) Infesting wild birds in na Atlantic forest área in the state of São Paulo, Brazil, with isolation of *Rickettsia* from the tick *Amblyomma longirostre*. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n.4, p. 770-774, 2008.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F.; BREITSCHWERDT, E. B. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 4, p. 156-163, 2009.

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, p. 148-155, 2011.

PEREIRA, M. C. et al. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with wild animals in the Pantanal region of Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 37, n. 6, p. 979-983, 2000.

PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, n. 1, p. 523-529, 2006.

QUEIROGAS, V. L. et al. Carrapatos (Acari: Ixodidae) em cães domésticos no Parque Estadual Serra de Caldas Novas, Goiás: considerações epidemiológicas. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 1, p. 347, 2010.

RHYAN, J. C.; SPRAKER, T. R. Emergence of diseases from wildlife reservoirs. **Veterinary Pathology**, v. 47, n. 1, p. 34-39, 2010.

RODRIGUES, D. F; DAEMON, E.; RODRIGUES, A. F. S; Caracterização da população de ectoparasitos em cães de núcleos de expansão urbana de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 4, p. 185-188, 2008.

SABATINI, G. S. et al. Survey of ticks (Acari: Ixodidae) and their rickettsia in an Atlantic rain forest reserve in the State of São Paulo, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 47, n. 5, p. 913-916, 2010.



SANGIONI, L. A. et al. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 255-270, 2005.

SILVA, M.E., et al. Prevalência de anticorpos anti-Rickettsia spp. em cães da cidade de Belo Horizonte, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.4, p.1007-1010, 2010

SONENSHINE, D.E.; LANE, R.S.; NICHOLSON, W.L. Ticks (Ixodida). In: MULLEN, G., DURDEN, L. A. **Medical and Veterinary Entomology**. Nova York: Academic Press, p. 517-558, 2002.

SPOLIDORIO, M. G. et al. Novel spotted fever group rickettsiosis, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 16, n. 3, p. 521-523, 2010.

SZABÓ, M. P. J. et al. Species diversity and seasonality of free-living ticks (Acari: Ixodidae) in the natural habitat of wild Marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) in Southeastern Brazil. **Veterinary parasitology**, 143(2), p. 147-154, 2007.

SZABÓ, M. P. J.; OLEGÁRIO, M. M. M.; SANTOS, A. L. Q. Tick fauna from two locations in the Brazilian savannah. **Experimental and Applied Acarology**, v. 43, n. 1, p. 73-84, 2007.

SZABÓ, M. P. J et al. Ticks (Acari: Ixodidae) on Dogs from Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, V. 57, p. 72 – 74, 2010.

SZABÓ, M. P. J. et al. In vitro isolation from *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) and ecological aspects of the Atlantic rainforest *Rickettsia*, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. **Parasitology**, v.140, n.6, p.719-728, 2013a.

SZABÓ, M. P. J.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. **Frontiers Cellular and Infection Microbiology**, v.3, p.1-9, 2013b.

TAMURA, K. et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

## ANEXO I – TERMO DE CONSENTIMENTO DO RESPONSÁVEL PELO(S) ANIMAL(IS)



Universidade Federal de Uberlândia  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)  
Rua Ceará, S/N – Bloco 2T, sala 113 – CEP 38405-315  
Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Fone: 3239 4300 Ramal (VOIP) 3423;  
e-mail: ceua@propp.ufu.br

### TERMO DE CONSENTIMENTO DO RESPONSÁVEL PELO(S) ANIMAL(AIS)

Você está sendo convidado para participar de uma pesquisa intitulada Carrapatos e patógenos zoonóticos do Cerrado e da Mata Atlântica na interface com áreas antropizadas, sob responsabilidade do pesquisador Matias Pablo Juan Szabó. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais da Universidade Federal de Uberlândia, CEUA-UFU, CNPJ 25.648.387/0001-18, e tem por objetivo: Pesquisar por patógenos causadores de zoonoses em carrapatos de cão de áreas do Cerrado e Mata Atlântica em interface com atividade humana. Para participar deste estudo, o(s) animais serão contidos manualmente e submetidos a coleta de sangue (5 ml). Neste trabalho os animais poderão estar expostos a hematoma no local da punção venosa. Este estudo possibilitará fornecer parâmetros para avaliação do risco de exposição da população humana a patógenos transmitidos por carrapatos no Cerrado e Mata Atlântica. Esclarecemos ainda, que sua autorização para a inclusão do(s) seu(s) animal(is) nesse estudo é voluntária. Seu(s) animal(is) poderá(ão) ser retirado(s) do estudo, a qualquer momento, sem que isso cause qualquer prejuízo a ele(s). A confidencialidade dos seus dados pessoais será preservada. Os membros da CEUA ou as autoridades regulatórias poderão solicitar suas informações, e nesse caso, elas serão dirigidas especificamente para fins de inspeções regulares.

O Médico Veterinário responsável pelo(s) seu(s) animal(is) será o(a) Dr(a) Matias Pablo Juan Szabó, inscrito(a) no CRMV-MG sob o número 7816. Além dele, a equipe do Pesquisador Principal também se responsabilizará pelo bem estar do(s) seu(s) animal(is) durante todo o estudo e ao final dele. Quando for necessário, durante ou após o período do estudo, você poderá entrar em contato com o Pesquisador Principal ou com a sua equipe pelos seguintes contatos:

Tel. de emergência: (34) 99149 4107

Endereço: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia

Telefone: (34) 3225-8432

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, a declaração anexa.

### DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao(s) animal(is) pelo(s) qual(is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu(s) animal(is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, eu

\_\_\_\_\_ portador do RG \_\_\_\_\_ declaro que autorizo a participação do(s) meu(s) animal(is) identificado(s), a seguir, neste projeto.

Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará comigo e outra com o pesquisador. Identificação do(s) animal(is):

Nome ou Número de identificação:

Espécie:

Raça:

Uberlândia, \_\_\_\_ de \_\_\_\_ de 20\_\_.

*Matias Szabó*

-----  
Assinatura do Proprietário

-----  
Assinatura do Pesquisador

**ANEXO II – CERTIFICADO APROVADO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NA  
UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
UBERLÂNDIA**



Universidade Federal de Uberlândia

– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado “Carrapatos e patógenos zoonóticos do Cerrado e da Mata Atlântica na interface com áreas antropizadas”, protocolo nº 042/15, sob a responsabilidade de **Matias Pablo Juan Szabó** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião de **22 de maio de 2015**.

(We certify that the project entitled "Carrapatos e patógenos zoonóticos do Cerrado e da Mata Atlântica na interface com áreas antropizadas", protocol 042/15, under the responsibility of Matias Pablo Juan Szabó - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of May 22th, 2015..

Vigência do Projeto	Início: 20/06/2015 / Término: 28/02/2020
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Cão; Espécie silvestre brasileira
Número de animais	360
Peso / Idade	Variado / variado
Sexo	-
Origem / Local	Parque Nacional do Iguaçu
Número da Autorização SISBIO	48141-1
Atividade(s)	Captura

Uberlândia, 25 de maio de 2015.

**Prof. Dr. César Augusto Garcia**  
Coordenador da CEUA/UFU