

**DETECÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *Rickettsia* EM
CARRAPATOS COLETADOS EM CAPIVARAS DE UM PARQUE PÚBLICO DA
CIDADE DE UBERLÂNDIA, MG**

Vinícius C. Miranda¹, Graziela Tolesano-Pascoli², Flávia L. Mundim¹, Leticia Silva¹, Luisa R. Benfatti¹,

Jamile O. Pascoal², Jean E. Limongi³, Matias P. J. Szabó², Elizete A. Naves⁴, Jonny Yokosawa¹

¹ Universidade Federal de Uberlândia – Instituto de Ciências Biomédicas, Laboratório de Virologia/Laboratório de Microrganismos do Cerrado; ² Universidade Federal de Uberlândia – Faculdade de Medicina Veterinária, Laboratório de Ixodologia; ³ Universidade Federal de Uberlândia – Instituto de Geografia; ⁴ Parque do Sábã – Uberlândia.

E-mail: viniciuscamposm@gmail.com

RESUMO

Sendo ectoparasitas hematófagos, os carrapatos podem ser vetores de transmissão de vários agentes infecciosos, sendo alguns desses agentes, bactérias do gênero *Rickettsia* que podem causar doenças a alguns mamíferos (ex: roedores e seres humanos), sendo classificadas como pertencentes ao grupo da febre maculosa (GFM). Algumas dessas riquetsioses possuem sintomatologia mais branda, porém a de maior impacto na saúde pública, por sua alta taxa de letalidade, é a febre maculosa causada por *Rickettsia rickettsii*. Os casos de febre maculosa brasileira (FMB) são atribuídos principalmente à expansão das populações de capivara e a presença do carrapato da espécie *Amblyomma sculptum*. Diante deste contexto, este trabalho avaliou, por meio de testes moleculares, a presença de *Rickettsia* spp. em carrapatos da espécie *A. sculptum*, coletados em 2010 e 2011 de capivaras do Parque Municipal do Sabiá, um parque público da cidade de Uberlândia, MG. Amostras de DNA extraídas de 12 carrapatos foram testadas por PCR para a presença do DNA de *Rickettsia* spp. e, apesar de nenhuma amostra ter se mostrado positiva, foi de suma importância a avaliação da presença dessa bactéria em carrapatos do parque, em especial aquelas que são potencialmente patogênicas à humanos, devido ao alto número de pessoas que visita o parque todos os dias.

ABSTRACT

Being hematophagous ectoparasites, ticks can carry and transmit many infectious agents, including *Rickettsia* spp. bacterium, which cause diseases to mammals as rodents and humans, classified as Spotted Fever Group. Some of these rickettsioses has a milder symptomatology, but one with greater impact on public health, due to its high lethality rate, is the spotted fever caused by *Rickettsia rickettsii* bacteria. BSF cases are related specially to the expansion of Capybaras population and *Amblyomma sculptum* ticks' presence. Given the

context, this study evaluated, through molecular tests, presence of *Rickettsia* spp. on *A. sculptum* ticks, collected from capybaras in Sabiá Municipal Park in 2010 and 2011. DNA samples were extracted from 12 ticks and tested by PCR to confirm *Rickettsia*'s DNA presence. Although none of the samples were positive, this study was extremely important to evaluate the presence of those bacterium, especially those who has a higher risk to humans due the continuous visitation of humans to the park.

INTRODUÇÃO

No período de 2000 até dia 01 de agosto de 2018, foram confirmados, no sudeste brasileiro, 1.418 casos de Febre Maculosa Brasileira (FMB), e destes 276 casos (19,46%) foram registrados em Minas Gerais (SINAN, 2018). De acordo com o Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN) a FMB até 2018, teve 47,6% de fatalidade em seus casos. A doença é de difícil diagnóstico, pois seus sintomas iniciais são parecidos com de outras doenças como dengue, pneumonia, leptospirose, entre outras, apresentando alguns sintomas como febre acima de 39°C, diarreia, náuseas, dores abdominais, dor de cabeça intensa (SINAN). A FMB é uma Riquetsiose, ou seja, uma doença causada por bactérias *Rickettsia* spp., que são seres intracelulares obrigatórios, pertencentes a família *Rickettsiaceae*.

Dentro da família, o gênero *Rickettsia* que é dividido em quatro grupos: o grupo tifo (GT), o grupo *Rickettsia canadenses*, grupo *Rickettsia bellii* e o grupo da febre maculosa (GFM), que possui quinze espécies descritas incluídas nele (*R. akari*, *R. australis*, *R. africae*, *R. conorii*, *R. honei*, *R. japonica*, *R. sibirica*, *R. helvetica*, *R. slovacae*, *R. massiliae*, *R. rhipicephali*, *R. aeschlimannii*, *R. montanensis*, *R. parker* e *R. felis*) (YU; WALKER, 2006; PASCOAL, 2017) (Fig. 1)

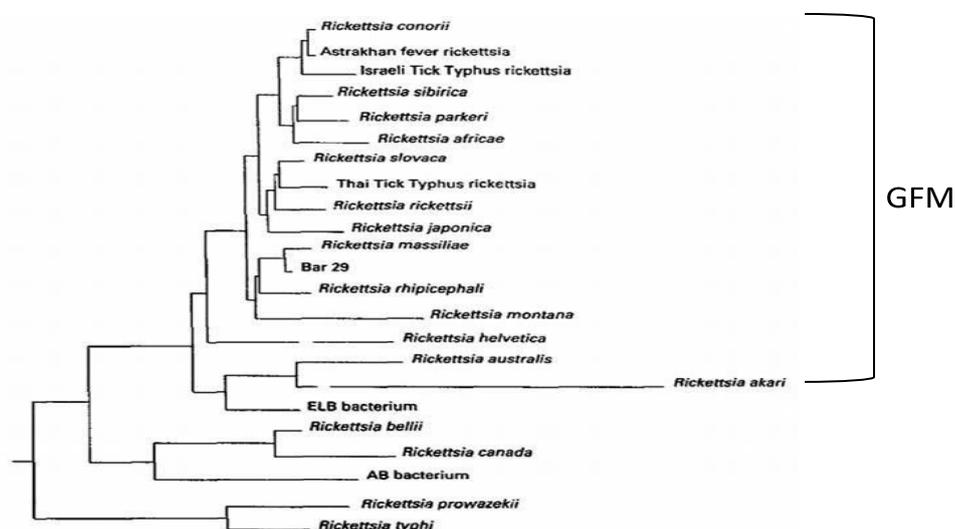


Figura 1: Árvore filogenética de riquetsias por análise de rDNA 16S, indicando as do grupo da febre maculosa (GFM) e do grupo tifo (GT). Modificado de ROUX; RAOULT, 1995.

Sendo parasitas intracelulares, essas bactérias se multiplicam apenas nas células de seus hospedeiros, sendo os artrópodes, como carrapatos, piolhos, pulgas e ácaros os mais comuns, os quais são também seus transmissores a outros animais em geral. Os principais vetores de *Rickettsia* do GFM são espécies de carrapatos pertencentes ao gênero *Amblyomma*, dentre quais a espécie *A. sculptum* (Berlese 1988) é típica do Cerrado (OGRZEWALSKA; PINTER, 2016) e apresenta um hábito forte de predação (PAJUABA NETO et al., 2018), tendo assim, uma maior potencialidade de transmissão de *Rickettsia* spp. a humanos.

Espécies de carrapatos do gênero *Amblyomma* são frequentemente encontradas em diversos animais, dentre eles os cachorros e as capivaras, sendo considerados sentinelas para riquetsioses, pois produzem anticorpos contra bactérias *Rickettsia* spp. e podem ser usadas para indicar a presença desses patógenos na região que vivem (FORTES et al., 2011). Estes animais também são considerados amplificadores dessas bactérias por viverem no mesmo ambiente em que o patógeno está presente, atraírem seus vetores e serem suscetíveis à infecção. É preciso também que esses animais consigam manter a bactéria por tempo suficiente para infectar outros vetores e que sempre haja uma reprodução constante, para que sempre tenha animais não-imunes (Labruna et al. 2009). As capivaras possuem todas as características necessárias para serem amplificadores da bactéria e estão em constante crescimento populacional na área, pois há poucos predadores naturais (a onça parda (*Puma concolor* Linneaus, 1771) como exemplo) (QUEIROGAS, 2010). Com o crescimento populacional, as cidades sentiram a necessidade da criação de áreas ecológicas em que a população tivesse um contato maior com a natureza, servindo também como abrigo para animais vetores de doenças. Dentro desse contexto, o presente estudo teve como proposta a investigação da presença de *Rickettsia* em carrapatos coletados em capivaras do Parque do Sabiá, um parque urbano de Uberlândia que é visitado por muitas pessoas em busca de lazer e para realizar atividades físicas.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1– Amostras

Os carrapatos utilizados no estudo pertencem à coleção do Laboratório de Ixodologia da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia. Os carrapatos

foram coletados em 2010 e 2011, identificados e armazenados em álcool isopropílico à temperatura ambiente (PASCOLI, 2014). As amostras utilizadas foram classificadas como *A. sculptum* e separadas por sexo (macho e fêmea) de acordo com seu hospedeiro (capivara).

2.2 – Extração

Foi realizada a extração do DNA de 175 carrapatos diferentes, provenientes de 24 capivaras distintas entre este estudo e estudos prévios (MUNDIM et al. 2016, SILVA et al., 2017). As amostras aqui testadas, foram identificadas de acordo com o experimento (Tabela 1). O método utilizado para extração de DNA em carrapatos foi descrito por Chomczynski (1993) e modificado por Sangioni et al. (2005). O método descrito utiliza o isotiocianato de guanidina e fenol como agentes principais na liberação do DNA no meio.

2.3 – PCR

Para avaliar a qualidade da amostra de DNA obtida, uma primeira PCR (reação em cadeia de polimerase) foi realizada com os *primers* 16S-F e 16S-R (MANGOLD et al., 1998) para a amplificação de um segmento do gene que codifica o RNA ribossomal *16S* de carrapatos (rDNA 16S). Após, realizou-se eletroforese para a observação do produto da reação. Em seguida, uma nova PCR para a detecção do gene *gltA*, que codifica a enzima citrato sintase 2 (CS2) de *Rickettsia* spp., com os *primers* CS-78 e CS-323 (LABRUNA et al., 2004) (Tabela 1) foi executada.

Tabela 1: Primers utilizados nas PCRs

GENE ALVO E PRIMERS	ESPECIFICIDADE	AMPLICON (pb)	REFERÊNCIA
GENE 16S <i>16S-F</i> E <i>16S-R</i>	Carrapatos	460	Mangold et al., 1998
<i>gltA</i> <i>CS-78</i> E <i>CS-323</i>	Gênero <i>Rickettsia</i>	401	Labruna et al., 2004

2.4 – Eletroforese

Ao final de cada PCR era realizada uma eletroforese a gel 1% de Agarose em TBE 0,5x.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras utilizadas no presente estudo estão descritas na tabela 2. Ao realizar a PCR para o gene de carrapatos (16S rDNA), resultados positivos para as amostras testadas foram obtidos (Figura 2), confirmando a presença do DNA do carrapato, através de sua amplificação, com exceção de 4 amostras (V7, V8, V9 e V16). Essa confirmação era necessária para certificar que a extração ocorreu de forma correta para poder, assim, seguir para a próxima PCR, para detecção do gene *gltA* de *Rickettsia* spp..

Tabela 2: Tabulação do hospedeiro, identificação das amostras de *Amblyomma sculptum* e resultados das PCRs.

Identificação da capivara	Identificação da amostra de DNA	PCR		
		16S	<i>gltA</i>	<i>R. bellii</i>
C5	V1	+	-	NT
C4	V12	+	-	NT
C2	V13	+	-	NT
C10	V15	+	-	NT
C21	V10	+	-	NT
C31	31 S.F.	+	-	NT
C31	31 S.M.	+	-	NT
C32	V6	+	-	NT
C33	33 S.M.	+	-	NT
C33	33 S.F.	+	-	NT
C35	V11	+	-	NT
C35	V14	+	-	NT
Vida livre	177 ^a	+	+	+

^a – amostra 177 é de *Amblyomma dubitatum* de vida livre, colhida no Parque Santa Luzia 4 (estudo da estudante Caroline Lopes Queiroz);

NT – Amostra não testada (somente foi testada a que apresentou amplificação para o gene *gltA*).

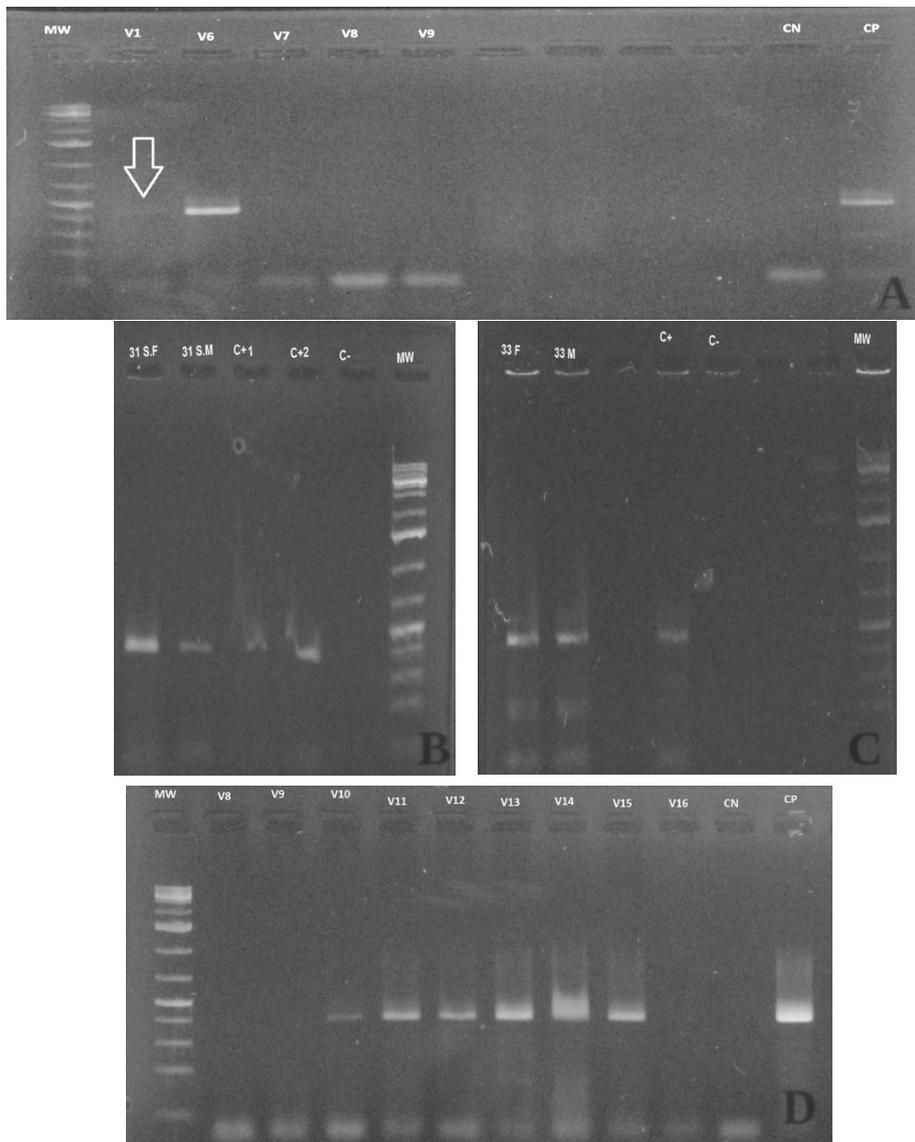


Figura 2: Eletroforese realizada após a amplificação do gene 16S, validando o resultado, onde a) amostras v1 e v6; b) amostras 31 S.F e 31 S.M; c) amostras 33F e 33M; d) amostras V10 a V15. A sigla CN/C- é para controle negativo, CP/C+ indica controle positivo e MW significa marcador molecular.

As amostras de DNA de carrapatos das capivaras 5 e 35 testadas anteriormente haviam apresentado resultados positivos para a presença do gene *gltA* (PASCOLI, 2014; SILVA, 2017). Porém, neste estudo, com amostras de DNA de outros carrapatos das mesmas capivaras, não foi observada a amplificação para este gene (figura 3). As amostras 177, 177 1:5 e 177 1:10 (diluições 1:5 e 1:10, respectivamente), de DNA de carrapatos *A. dubitatum*, apresentaram amplificação para o gene *gltA* de *R. bellii*.

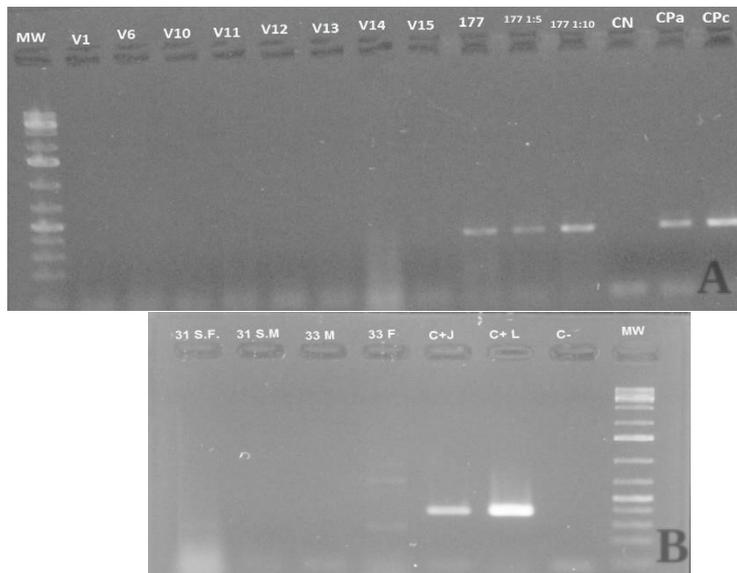


Figura 3: Eletroforese realizada para visualizar a amplificação do gene *gltA*. Onde (CPa; CPc; C+J; C+L) são controles positivos para CS2 e CN/C- são controles negativos e MW é o marcador molecular.

Em 2018, um estudo indicou a ausência de *Rickettsia* do GFM em carrapatos *Amblyomma* spp., principalmente *A. sculptum*, coletados no Praia Clube, às margens do Rio Uberabinha, em Uberlândia (PAJUABA NETO et al., 2018). No estudo, foram testadas 25 amostras de DNA de 244 ninfas (aproximadamente 10 ninfas/amostra; 204 de *A. sculptum* e 40 de *A. dubitatum*), 4 amostras de adultos de *A. sculptum* e 3 de adultos de *A. dubitatum*. É possível que o número de amostras testadas tenha sido um fator limitante para detecção de *Rickettsia* do GFM. O presente estudo teve enfoque maior em carrapatos *A. sculptum*, porém a avaliação de uma amostragem maior poderia ser necessária para descartar a presença de *Rickettsia* que causam a febre maculosa no local, pois são a espécie com uma taxa maior de parasitismo em humanos (GUGLIELMONE et al., 2016).

CONCLUSÃO

Doze amostras de DNA, extraídas de carrapatos coletados de capivaras do Parque do Sabiá, foram testadas por PCR e não indicaram a presença de *Rickettsia* spp.. O que pode indicar uma baixa taxa de presença dessa bactéria no ambiente característico da região. Como citado acima, *A. sculptum* tem um maior hábito predatório o que expõe humanos a uma maior chance de contágio com bactérias *Rickettsia* spp., mostrando,

assim, que é necessária uma amostragem maior de uma área maior para confirmar os dados obtidos no presente estudo. O mesmo deverá ser continuado para descartar a presença de *Rickettsia* do GFM em carrapatos que infestam as capivaras do Parque do Sabiá, em especial carrapatos da espécie *A. sculptum*, uma vez que há um grande fluxo de pessoas em áreas infestadas do parque.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHOMCZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **Biotechniques**, v. 15, n. 3, p. 532-4, 536-7, 1993.

FORTES, F. S. et al. Anti-Rickettsia spp. antibodies in free-ranging and captive capybaras from southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 11, p. 1014-1018, 2011.

GUGLIELMONE, A.A., BEATI, L., BARROS-BATTESTI, D.M., LABRUNA, M.B., NAVA, S., VENZAL, J.M., MANGOLD, A.J., SZABÓ, M.P.J., MARTINS, J.R., GONZÁLEZ-ACUÑA, D., ESTRADA-PEÑA, A. Ticks (Ixodidae) on humans in south america. **Exp. Appl. Acarol.** 40, 83–100, 2006.

LABRUNA, M. B. et al. Rickettsia Species Infecting Amblyomma cooperi Ticks from an Area in the State of Sao Paulo, Brazil, Where Brazilian Spotted Fever Is Endemic. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 42, n. 1, p.90-98, 1 jan. 2004.

LABRUNA, M. B.. Ecology of Rickettsia in South America. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 1166, n. 1, p.156-166, maio 2009.

MANGOLD, A. J.; BARGUES, M. D.; MAS-COMA, S. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among *Metastricata* (Acari: Ixodidae). **Parasitology research**, v. 84, n. 6, p. 478-484, 1998.

OGRZEWALSKA, M.; PINTER, A. Ticks (Acari: Ixodidae) as ectoparasites of Brazilian wild birds and their association with rickettsial diseases. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 53, n. 1, p. 1-31, 2016.

PAJUABA NETO, A. A., RAMOS, V. DO N., MARTINS, M. M., OSAVA, C. F., PASCOAL, J. DE O., SUZIN, A., SZABÓ, M. P. J. Influence of microhabitat use and behavior of *Amblyomma sculptum* and *Amblyomma dubitatum* nymphs (Acari: Ixodidae) on human risk for tick exposure, with notes on Rickettsia infection. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v.9, n.1, 67–71, 2018.

PASCOLI, G. V. T. Carrapatos e riquetsias em parque urbano de Uberlândia, Minas Gerais: ecologia e biodiversidade associadas. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais – Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2014.

QUEIROGAS, V. L. Capivaras (Rodentia) e Carrapatos (Acari: Ixodidae): alterações ecológicas e a interação do hospedeiro e parasita em áreas urbanas. Tese (Mestrado em Ecologia) – Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2010.

REGNERY, Russell L.; SPRUILL, Catherine L.; PLIKAYTIS, B. D. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 5, p. 1576-1589, 1991.

ROUX, V.; FOURNIER, P-E.; RAOULT, D. Differentiation of spotted fever group Rickettsiae by sequencing and analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR amplified DNA of the gene encoding the protein rompA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 9, p. 2058-2065, 1996.

ROUX, V.; RAOULT, D. Phylogenetic analysis of the genus *Rickettsia* by 16S rDNA sequencing. *Res. Microbiol.*, v. 146, p.385-396, 1995.

SANGIONI, L. A. et al. Rickettsial Infection in Animals and Brazilian Spotted Fever Endemicity. **Emerging Infectious Diseases**, [s.l.], v. 11, n. 2, p.265-270, fev. 2005.

SILVA, L. M. Pesquisa molecular de bactérias do gênero *Rickettsia* em carrapatos coletados de capivaras na cidade de Uberlândia-MG. Tese (Graduação em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2017.

Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN. Situação Epidemiológica, 2018. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/febre-maculosa/situacaoepidemiologica>. Acesso em: 20 de setembro de 2018

YU, X-J.; WALKER, D. H. The Order Rickettsiales. **The Prokaryotes**, [s.l.], p.493528, 2006.