

Comunicação

[Communication]

Prevalência de anticorpos anti-*Rickettsia* spp. em cães da cidade de Belo Horizonte, MG

[Prevalence of antibodies anti-*Rickettsia* in dogs from Belo Horizonte, MG, Brazil]

M.E. Silva¹, R.R. Ribeiro², J.O. Costa³, J. Moraes-Filho⁴, R.C. Pacheco⁴, M.B. Labruna⁴

¹EPAMIG – Pitangui, MG

²Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – Cruz das Almas, BA

³Escola de Veterinária - UFMG – Belo Horizonte, MG

⁴Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP – São Paulo, SP

Rickettsia é uma bactéria intracelular obrigatória, pertencente à família *Rickettsiaceae* e à ordem *Rickettsiales* (Raoult e Roux, 1997). As espécies desse gênero estão divididas em dois grupos, baseados nos padrões antigênicos, moleculares e ecológicos: i – grupo do tifo (GT), composto pelas espécies *Rickettsia prowazekii* e *Rickettsia typhi*, transmitidas por piolhos e pulgas, respectivamente; ii – grupo da febre maculosa (GFM), o qual está composto por mais de 23 espécies válidas, dentre as quais predomina a transmissão por meio de carrapatos, com exceção de *Rickettsia felis* e *Rickettsia akari* associadas a pulgas e ácaros, respectivamente. Outras espécies de rickettsias de patogenicidade desconhecida, tais como *Rickettsia bellii* e *Rickettsia canadensis*, não estão inseridas em nenhum desses dois grupos (Yu e Walker, 2003).

No Brasil, a doença causada por rickettsias do GFM é denominada febre maculosa brasileira (FMB), e *Rickettsia rickettsii* tem sido incriminada como o principal agente etiológico. Casos confirmados de infecção por *Rickettsia rickettsii* tem sido relatados nos quatro estados da região Sudeste, na Bahia, em Santa Catarina, no Paraná e no Rio Grande do Sul. A transmissão da FMB ao homem e aos animais ocorre por pelo menos três espécies de carrapatos: *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma aureolatum* e *Amblyomma ovale* (Guedes et al., 2005; Pinter e Labruna, 2006).

A importância do cão doméstico como hospedeiro amplificador para *Rickettsia rickettsii* permanece controversa na literatura, embora recentemente casos de febre maculosa por esta rickettsia no Arizona (EUA) reforçaram seu papel como hospedeiro amplificador (Demma et al., 2005).

Dentre os métodos diagnósticos, os testes sorológicos são os mais frequentemente utilizados e amplamente disponíveis em todo o mundo, sendo a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) considerada o método sorológico de referência, por apresentar sensibilidade de 84,6% a 100% e especificidade de 99,8 a 100% (Brouqui et al., 2004). No entanto, a RIFI não permite a identificação da espécie de *Rickettsia* envolvida na infecção, uma vez que todas as rickettsias do GFM apresentam reação sorológica cruzada entre si (Philip et al., 1978). A origem geográfica da infecção tem sido um dos melhores indicadores de identidade das diferentes espécies de rickettsias, sendo preconizada a avaliação de amostras de soro pela RIFI a partir de possíveis espécies de rickettsias de ocorrência local, pois normalmente títulos de anticorpos homólogos a uma determinada espécie de rickettsia são maiores que títulos heterólogos àquela espécie. Quando um título obtido para determinada espécie de *Rickettsia* for pelo menos quatro vezes maior que o título mais alto obtido para as demais espécies testadas, pode-se sugerir que os anticorpos são homólogos à primeira espécie (Labruna et al., 2007).

Recebido em 18 janeiro de 2010

Aceito em 20 de agosto de 2010

E-mail: manoelsilva@epamig.br

Apoio: FAPEMIG

Com o objetivo de avaliar a condição epidemiológica das riquetsioses e o monitoramento da FMB em Belo Horizonte, a prevalência de anticorpos anti-*Rickettsia* spp. em amostras de soros de cães, a partir de cinco antígenos de ocorrência no Brasil (*Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia amblyommii*, *Rickettsia felis* e *Rickettsia bellii*), foi instituída pela primeira vez no município. As amostras de soro foram coletadas em Belo Horizonte, MG, situada na região Sudeste do Brasil.

O cálculo da amostra foi realizado com auxílio do programa computacional EpiInfo version 6.0, considerando nível de confiança de 95%,

prevalência estimada de 4% (Labruna et al., 2007) e erro esperado de 2%, o que resultou em amostra de 369 cães. Para evitar que possíveis perdas de material durante a coleta e o processamento dos soros pudessem interferir no resultado final da pesquisa, foi estabelecida uma amostra total de 453 cães (Tab. 1). A amostra total foi obtida de maneira proporcional para cada um dos nove Distritos Sanitários que compõem a cidade, segundo o censo canino realizado no mesmo ano pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ-BH). Os animais selecionados foram cães saudáveis apresentados aos postos de vacinação na campanha de combate à raiva urbana organizada pelo CCZ-BH, durante o ano de 2005.

Tabela 1. Amostragem canina realizada durante a campanha de vacinação antirrábica, de acordo com as regionais da Prefeitura de Belo Horizonte, MG, 2005

Regional	População canina estimada (%)	Amostra calculada (%)	Amostra obtida (%)
Barreiro	42.334 (13,40)	50 (13,55)	67 (14,79)
Venda Nova	41.184 (13,04)	48 (13,01)	63 (13,91)
Noroeste	40.614 (12,86)	47 (12,74)	47 (10,38)
Leste	40.405 (12,79)	47 (12,74)	67 (14,79)
Nordeste	38.307 (12,13)	45 (12,19)	59 (13,02)
Centro-Sul	31.027 (9,82)	36 (9,76)	42 (9,27)
Norte	28.921 (9,16)	34 (9,21)	34 (7,51)
Oeste	28.909 (9,15)	34 (9,21)	38 (8,39)
Pampulha	24.123 (7,64)	28 (7,59)	36 (7,95)
Total	315.824 (100)	369 (100)	453 (100)

As amostras de sangue foram coletadas e transportadas em temperatura ambiente para um laboratório de sorologia, onde foram submetidas à centrifugação (1500 x g por 10 minutos) para obtenção do soro, o qual foi aliqüotado em microtubos, separado e congelado a - 20°C até a realização do teste sorológico. Todas as 453 amostras de soro foram avaliadas pela RIFI, contra cinco antígenos brutos: *Rickettsia rickettsii* cepa Taiacu, *Rickettsia parkeri* cepa At-24, *Rickettsia amblyommii* cepa Ac-37, *Rickettsia felis* cepa Pedreira e *Rickettsia bellii* cepa Mogi (Horta et al., 2006; Pinter e Labruna, 2006). A reação foi realizada conforme Labruna et al. (2007), e as amostras foram consideradas sororreagentes quando apresentavam títulos ≥ 64 . Todos os antígenos utilizados provieram de isolados de carrapatos, exceto *Rickettsia felis*, que foi isolada de pulgas.

Os soros foram diluídos a partir de 1:64 em PBS (15µL do material diluído foi depositado sobre

cada região demarcada das lâminas de RIFI) e incubados em câmara úmida a 37°C por 30 minutos, sempre na presença de controles positivo e negativo. As lâminas foram lavadas com solução de *washing buffer* e mantidas em cuba com a mesma solução durante 15 minutos, por duas vezes. Após secarem, foram incubadas a 37°C por 30 minutos com isotiocianato de fluoresceína conjugado com imunoglobulina G anticão (Sigma Diagnostics, St. Luis, Mo) na diluição de 1:600, novamente lavadas como descrito anteriormente e coradas em solução de *washing buffer*, mais 0,2% de azul de Evans. Após completamente secas, foram cobertas com glicerina tamponada e lamínula para posterior leitura em microscópio com luz ultravioleta (Olympus BX60, Japan) com objetiva de 40X.

A prevalência de anticorpos anti-*Rickettsia* spp. observada no presente trabalho foi de 0,66% (3/453). Ao se considerar a utilização de antígenos de diferentes espécies de rickettsias, os

Prevalência de anticorpos...

animais mostraram-se reagentes para *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri* e *Rickettsia amblyommii* (Tab. 2). Conforme interpretações previamente padronizadas (Labruna et al., 2007), determinou-se *Rickettsia rickettsii* como provável antígeno responsável pela infecção natural no cão identificado como BAR 19, uma vez que o título de anticorpos para essa espécie (1024) foi quatro ou mais vezes superior ao título para outras espécies (256 para *Rickettsia parkeri*

e 128 para *Rickettsia amblyommii*). Para os demais soros reagentes, não foi possível determinar qual espécie foi responsável pela infecção natural, pois os animais identificados como VN 09 e VN 12 apresentaram títulos de 128 e 256 para *Rickettsia rickettsii* e 64 e 128 para *Rickettsia parkeri*, respectivamente. Nenhuma amostra de soro apresentou qualquer título para os antígenos de *Rickettsia bellii* ou *Rickettsia felis*.

Tabela 2. Títulos apresentados pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para antígenos brutos de *Rickettsia* spp. em soros caninos de diferentes regionais administrativas da cidade de Belo Horizonte, MG

Soro canino	Título pela RIFI					PAIHR
	<i>Rickettsia rickettsii</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	<i>Rickettsia amblyommii</i>	<i>Rickettsia felis</i>	<i>Rickettsia bellii</i>	
BAR 19	1024	256	128	NR	NR	<i>R. rickettsii</i>
VN 09	128	64	NR	NR	NR	
VN 12	256	128	NR	NR	NR	

PAIHR: antígeno possivelmente envolvido em reação homóloga (título para determinada espécie de rickettsia pelo menos quatro vezes maior que o título mais alto obtido para as demais espécies foi considerado homólogo à primeira espécie).

NR: soro não reagente a um título ≥ 64 .

O presente trabalho é o primeiro estudo de soroprevalência de infecção por *Rickettsia* spp. em cães da cidade de Belo Horizonte. Até então, a maioria dos estudos sorológicos sobre prevalência de anticorpos anti-*Rickettsia* spp. em humanos e hospedeiros amplificadores havia se concentrado em áreas endêmicas, onde a ocorrência de casos fatais se apresenta frequente. A escolha da capital mineira foi oportuna, uma vez que Minas Gerais é o estado que apresenta a maior ocorrência de casos de FMB no país, com notificações registradas em quase todas as áreas do estado.

Os cães são animais próximos dos humanos e podem desempenhar importante papel na cadeia epidemiológica da febre maculosa. *Rhipicephalus sanguineus*, principal carrapato de cães no Brasil, já demonstrou capacidade vetorial para agentes da febre maculosa em outros países (Demma et al., 2005). Essas informações revestem de importância trabalhos dessa natureza, haja vista que muitas capitais reúnem condições epidemiológicas tais que proporcionam potencial biótico para a ocorrência da doença, como, por exemplo, numerosa população canina (Tab. 1), o que possibilita estreito convívio entre pessoas, animais e carrapatos.

Os estudos de prevalência de anticorpos para rickettsias do GFM em cães de área endêmica nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Espírito Santo registraram resultados discrepantes, variando entre 8% e 69,6% (Lemos et al., 1994; Lemos et al., 1996; Pinter et al., 2008). A prevalência de cães sororreagentes encontrada no presente trabalho (0,66%) foi considerada baixa, mesmo quando comparada a resultados de prevalência (12,9%) obtidos de área não endêmica (Lemos et al., 1996). A baixa prevalência encontrada está de acordo com as observações locais, onde nos últimos anos verificou-se um único caso humano de FMB notificado na cidade de Belo Horizonte (Calic, 2007 - comunicação pessoal, 2007 - FUNED-MG). Deve-se salientar, no entanto, que a circulação de rickettsias na natureza é um processo dinâmico que envolve a participação de diferentes espécies de carrapatos e animais vertebrados, de maneira que a vigilância epidemiológica ativa deve ser adotada continuamente, a fim de determinar precocemente o surgimento de novas áreas endêmicas para rickettsioses, mesmo antes da ocorrência de casos humanos da doença. Na condição de hospedeiro para os carrapatos vetores da FMB, o cão pode ser utilizado como

importante sentinela em estudos de vigilância epidemiológica.

Pode-se concluir que, sob as condições experimentais descritas e por ocasião da realização do trabalho, havia entre os cães de Belo Horizonte baixa circulação de *Rickettsia*

rickettsii ou de outra espécie homóloga, o que sugere que a cidade não se comportava como área endêmica para FMB ou outra riquetsiose do GFM.

Palavras-chave: cão, *Rickettsia*, soroprevalência

ABSTRACT

A cross-sectional study was conducted to determine the seroprevalence of anti-*Rickettsia* spp. in dogs from Belo Horizonte, MG. For this purpose, serum samples from 453 dogs were collected during the rabies vaccination campaign and tested by the indirect immunofluorescence assay (IFA) using five antigens: *Rickettsia bellii*, *Rickettsia amblyommii*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri*, and *Rickettsia felis*. The endpoint titer reacting with each antigen was determined and serum was considered positive if it reacted at the 1:64 dilution. Serum showing titer for a *Rickettsia* species at least four-fold higher than that observed for any other *Rickettsia* species was considered homologous to the first *Rickettsia* species. Only three (0.66%) dogs reacted positively to at least one *Rickettsia* species and one serum showed to be homologous to *R. rickettsii*. These results showed a low prevalence of antibodies anti-*Rickettsia* spp. in dogs from Belo Horizonte city. However, other serosurvey needs to be performed for surveillance of the endemic status of the disease in the municipal district.

Keywords: dog, *Rickettsia*, seroprevalence

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BROUQUI, P.F.; BACELAR, F.; BARATON, G. et al. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.*, v.10, p.1108-1132, 2004.
- DEMMA, L.J.; TRAEGER, M.S.; NICHOLSON, W.L. et al. Rock Mountain spotted fever from arizona an unexpected tick vector in Arizona. *N. Engl. J. Med.*, v.353, p.587-594, 2005.
- GUEDES, E.; LEITE, R.C.; PRATA, M.C.A. et al. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.100, p.841-845, 2005.
- HORTA, M.C.; LABRUNA, M.B.; DURIGON, E.L. et al. Isolation of *Rickettsia felis* in the mosquito Cell Line C6/36. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.72, p.1705-1707, 2006.
- LABRUNA, M.B.; HORTA, M.C.; AGUIAR, D.M. et al. Prevalence of *Rickettsia* infection in dogs from the urban and rural areas of Monte Negro municipality, western Amazon, Brazil. *Vector-Borne Zoon. Dis.*, v.7, p.249-255, 2007.
- LEMOS, E.R.; MACHADO, R.D.; COURA, J.R. et al. Epidemiological aspects of the Brazilian Spotted Fever: serological survey of dogs and horses in an endemic area in the state of São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.38, p.427-430, 1996.
- LEMOS, E.R.; MACHADO, R.D.; COURA, J.R. Rocky Mountain spotted fever in an endemic area in Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.89, p.497-501, 1994.
- PHILIP, R.N.; CASPER, W.; BURGDORPER, W. et al. Serologic typing of rickettsiae of the spotted fever group by microimmunofluorescence. *J. Immunol.*, v.121, p.1961-1968, 1978.
- PINTER, A.; LABRUNA, M.B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. *N. Y. Acad. Sci.*, v.1078, p.523-529, 2006.
- PINTER, A.; HORTA, M.V.; PACHECO, R.C. et al. Serosurvey for *Rickettsia* spp. in dogs and humans from a Brazilian spotted fever endemic area in the state of São Paulo. *Cad. Saúde Pública*, v.24, p.247-252, 2008.
- RAOULT, D.; ROUX, V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.10, p.694-719, 1997.
- YU, X.J.; WALKER, D.H. The Order Rickettsiales. In: DWORKIN, M. (Ed). *The Prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiology community*. 3.ed. New York: Springer-Verlag, 2003. Disponível em: <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125>. Acessado em: 27 abr.2004.