

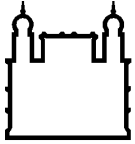
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Medicina Tropical

**ESTUDO DE RICKETTSIAS *LATO SENSU* EM AMOSTRAS DE QUIRÓPTEROS  
DE DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL**

**MICHELLE DOS SANTOS FERREIRA**

Rio de Janeiro  
Janeiro de 2016



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

***MICHELLE DOS SANTOS FERREIRA***

**ESTUDO DE RICKETTSIAS *LATO SENSU* EM AMOSTRAS DE QUIRÓPTEROS  
DE DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo  
Cruz como parte dos requisitos para obtenção do  
título de Mestre em Medicina Tropical

**Orientador:** Profa. Dra. Elba Regina Sampaio de Lemos

**RIO DE JANEIRO**

Janeiro de 2016

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

F383 Ferreira, Michelle dos Santos

Estudo de Rickettsias lato sensu em amostras de quirópteros de diferentes regiões do Brasil / Michelle dos Santos Ferreira. – Rio de Janeiro, 2016.

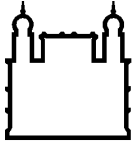
xvii, 82 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2016.

Bibliografia: f. 62-77

1. Quirópteros. 2. Rickettsia spp. 3. Coxiella burnetii. 4. Bartonella spp. 5. Ehrlichia spp. 6. Anaplasma spp. 7. PCR. I. Título.

CDD 579.327



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

**AUTOR: MICHELLE DOS SANTOS FERREIRA**

**ESTUDO DE RICKETTSIAS *LATO SENSU* EM AMOSTRAS DE QUIRÓPTEROS  
DE DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL**

**ORIENTADOR: Profa. Dra. Elba Regina Sampaio de Lemos**

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dra. Cristiane da Cruz Lamas - Presidente (revisora)**

**Prof. Dr. Ricardo Moratelli Mendonça da Rocha**

**Prof. Dr. Marcelo Alves Pinto**

**Prof. Dra. Maria Inês Doria Rossi**

**Prof. Dr. Sotiris Missailidis**

Rio de Janeiro, 29 de Janeiro de 2016

À minha amada mãe, Ana Maria (*in memoriam*),  
dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, meu pilar de sustentação, por não deixar faltar nada do que precisei – amor e apoio constante.

À minha orientadora, Dra Elba Lemos, pela confiança e encorajamento. Agradeço por me ensinar a trabalhar com perseverança e vivacidade em prol daquilo que acredito.

À Dra Tatiana Rozental e à Dra Angélica Mares-Guia, pela parceria e amizade. Agradeço pelos ensinamentos, pela companhia e estímulo. Muito obrigada por terem estado ao meu lado.

Aos doutorandos Alexandro Guterres e Jorlan Fernandes, por me auxiliarem em todas as etapas do processo de confecção desta dissertação. Agradeço por compartilharem comigo um pouco de seus conhecimentos e pelas palavras de incentivo. Vocês são de ouro.

À querida amiga e colaboradora do LHR, Endiá Barros, pelo apoio e palavras certas nos momentos certos. Espero que caminhemos por estradas paralelas durante muitos anos.

Aos colegas profissionais do Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses, pela capacitação técnica e acolhimento desde o primeiro dia. Sinto orgulho em fazer parte desse grupo.

À Dra Renata Carvalho pelo auxílio na logística e execução dos trabalhos de campo.

À Dra Alexsandra Favacho pelos conhecimentos compartilhados sobre as bartonelas e ajuda no desenvolvimento desta dissertação.

À Dra Maria Ogrzewalska, pelo apoio técnico no processamento das amostras para ehrlichioses e anaplasmoses.

Ao colaborador técnico do LHR, Adonai Pessoa por auxiliar na captura dos quirópteros envolvidos neste estudo.

Aos colaboradores, Dr Ricardo Moratelli e equipe Fiocruz Mata Atlântica, Dr Luiz Flamarion e Dr Rui Cerqueira e equipe PPBio, por disponibilizarem as amostras de quirópteros.

Ao Dr. Jairo Barreira pela identificação taxonômica dos ectoparasitas coletados.

Ao Dr. José Pascoal Simonetti coordenador da plataforma NB3, pela disponibilidade do espaço e capacitação técnica.

Aos meus colegas de turma, que fizeram os meus dias mais leve durante todo esse processo.

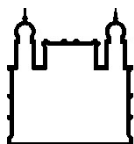
Aos coordenadores e professores da pós-graduação em Medicina Tropical, pelos ensinamentos e por me proporcionarem uma visão diferenciada da saúde pública brasileira.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

*“Deus ao mar o perigo e o abismo deu, mas  
nele é que espelhou o céu.”*

Fernando Pessoa





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

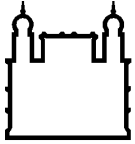
### ESTUDO DE RICKETTSIAS LATO SENSU EM AMOSTRAS DE QUIRÓPTEROS DE DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL

#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

**Michelle dos Santos Ferreira**

O contínuo processo de urbanização e o avanço humano sobre as áreas florestais têm provocado mudanças nos habitats naturais, possibilitando, conseqüentemente, o contato de populações humanas com endozootias e epizootias, antes restritas ao ciclo silvestre. Os quirópteros têm chamado a atenção da comunidade científica nos últimos tempos por serem hospedeiros importantes para doenças humanas emergentes. Embora o número de publicações sobre proteobactérias dos gêneros *Rickettsia*, *Bartonella*, *Coxiella*, *Ehrlichia* e *Anaplasma* (*Rickettsias lato sensu*) em animais vertebrados e invertebrados venha aumentando nos últimos 20 anos, no Brasil, o papel dos quirópteros no ciclo natural destes agentes é desconhecido. Com o objetivo de analisar a participação dos quirópteros na epidemiologia das doenças causadas por rickettsias no Brasil, um estudo epidemiológico descritivo foi desenvolvido em três diferentes regiões do território brasileiro. Análises moleculares foram realizadas em amostras de baço de morcegos coletados na localidade do Rio de Janeiro, Bahia e Santa Catarina no período de 2014-2015. Um total de 119 animais foi capturado e submetido à reação de PCR utilizando oligonucleotídeos para genes específicos de cada agente estudado. O DNA de *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* e *Anaplasma* não foi amplificado em nenhuma das amostras testadas. Quatro amostras (3,4%) foram positivas para o gene *htpAB* de *Coxiella burnetii*. O resultado do sequenciamento destas amostras revelou 100% de identidade com sequências do gene homólogo completo de *C. burnetii* depositadas no GenBank. Vinte e duas amostras (18,5%) foram positivas para *Bartonella* spp. A análise filogenética revelou a formação de três clados independentes, sugerindo tratar-se de novas espécies. A sequência obtida do morcego *Phyllostomus discolor* capturado no estado da Bahia apresentou relação com a sequência de *Bartonella doshiae*, anteriormente descrita associada a roedores silvestres. Ectoparasitas foram coletados dos morcegos coletados no estado do Rio de Janeiro e foram classificados como ácaros do gênero *Periglischrus* e dípteros do gênero *Trichobius* e *Strebla*. Este é o primeiro estudo no Brasil que relata a infecção por *C. burnetii* e *Bartonella* spp. em quirópteros. Estudos futuros são necessários para determinar o papel dos morcegos e seus ectoparasitas na ecologia destes patógenos, bem como a influência que essa relação patógeno-hospedeiro pode ter sobre a saúde humana e animal.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### STUDY OF RICKETTSIA LATO SENSU ON BAT SAMPLES FROM DIFFERENT REGIONS OF BRAZIL

#### ABSTRACT

#### MASTER'S THESIS IN TROPICAL MEDICINE

**Michelle dos Santos Ferreira**

The ongoing process of urbanization and human occupation over forest areas has caused changes in natural habitats, enabling thus the contact of human populations with animal diseases, previously restricted to the wild cycle. In recent years, bats have drawn the attention of the scientific community in recent times as important hosts for emerging human diseases. Although the number of publications on proteobacteria of *Rickettsia*, *Bartonella*, *Coxiella*, *Ehrlichia* and *Anaplasma* genera (*Rickettsia lato sensu*) in vertebrate and invertebrate animals has been increasing over the last 20 years, in Brazil, the role of bats in the natural cycle of these agents is unknown. In order to analyze the role of bats in the epidemiology of diseases caused by rickettsia in Brazil, a descriptive epidemiological study was conducted in three different regions of Brazil. Molecular analysis was performed on captured bats spleen samples in Rio de Janeiro, Bahia and Santa Catarina states between 2014 and 2015. A total of 119 animals were captured and PCR was performed using primers for specific genes for each agent studied. *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp. and *Ehrlichia* spp. DNA was not amplified in any of the samples tested. Four samples (3,4%) were positive for *Coxiella burnetii* gene *htpAB*. The sequencing results revealed 100% identity to the complete sequences of *C. burnetii* homologous gene deposited in the Genbank. Twenty-two samples (18,5%) were positive for *Bartonella* spp. Phylogenetic analysis revealed three separate clades, suggesting that these could be new species. The sequence obtained from a *Phyllostomus discolor* bat captured in Bahia state was related to the sequence of *Bartonella doshiae* previously described in association with wild rodents. Ectoparasites were collected from bats captured in Rio de Janeiro state and were classified as mites of the *Periglischrus* genus and bat flies of the genus *Trichobius* and *Strebla*. This is the first study in Brazil reporting *C. burnetii* infection and *Bartonella* spp. in bats. Future studies are needed to determine the role of bats and their ectoparasites in the ecology of these pathogens as well as the influence that this host-pathogen relationship may have on human and animal health.

# ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>IX</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Considerações Gerais</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Características Gerais – <i>Rickettsia</i> spp.</b> .....	<b>3</b>
1.2.1 Rickettsias do grupo da febre maculosa .....	4
1.2.2 Transmissão .....	4
1.2.3 Situação Epidemiológica da Febre Maculosa Brasileira .....	6
1.2.4 Aspectos Clínicos .....	6
1.2.5 Diagnóstico Laboratorial .....	8
<b>1.3 Febre Q</b> .....	<b>8</b>
1.3.1 Características Gerais – <i>Coxiella burnetii</i> .....	9
1.3.2 Transmissão .....	10
1.3.3 Situação Epidemiológica da Febre Q .....	11
1.3.4 Aspectos Clínicos .....	12
1.3.5 Diagnóstico Laboratorial .....	13
<b>1.4 Bartoneloses</b> .....	<b>14</b>
1.4.1 Características – <i>Bartonella</i> spp. ....	17
1.4.2 Transmissão .....	17
1.4.3 Situação Epidemiológica das Bartoneloses .....	17
1.4.4 Aspectos Clínicos .....	18
1.4.5 Diagnóstico .....	19
<b>1.5 Ehrlichioses e Anaplasmoses</b> .....	<b>20</b>
1.5.1 Características Gerais – <i>Ehrlichia</i> spp. / <i>Anaplasma</i> spp. ....	21
1.5.2 Transmissão .....	21
1.5.3 Situação Epidemiológica das Ehrlichioses.....	22
1.5.4 Aspectos Clínicos .....	23
1.5.5 Diagnóstico .....	23
<b>1.6 <i>Rickettsia lato sensu</i> e Quirópteros</b> .....	<b>24</b>
1.6.1 <i>Rickettsia</i> spp. ....	24
1.6.2 <i>Coxiella burnetii</i> .....	26
1.6.3 <i>Bartonella</i> spp.....	28
1.6.4 <i>Ehrlichia</i> spp. e <i>Anaplasma</i> spp.....	30

<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>32</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
	3.1 Objetivo Geral .....	33
	3.2 Objetivos Específicos .....	33
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>34</b>
	4.1 Desenho do Estudo .....	34
	4.2 Considerações Éticas .....	34
	4.3 Local do Estudo.....	35
	4.4 Captura dos Animais e Metodologia de Campo .....	36
	4.5 Metodologia Laboratorial.....	38
	4.5.1 Procedimento de Extração de DNA .....	38
	4.5.2 Procedimento de PCR Convencional .....	39
	4.5.3 Eletroforese em Gel de Agarose.....	40
	4.5.4 Sequenciamento e Análise Filogenética .....	40
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>42</b>
	5.1 População de Estudo .....	42
	5.2 <i>PesquisadeRickettsia, EhrlichiaeAnaplasma</i> .....	45
	5.2.1 Análise molecular das amostras para os gêneros <i>Rickettsia</i> spp., <i>Ehrlichia</i> spp. e <i>Anaplasma</i> spp. ....	45
	5.3 Pesquisa de <i>Coxiella burnetii</i> .....	45
	5.3.1 Análise molecular das amostras para <i>Coxiella burnetii</i> .....	45
	5.3.2 Análise do sequenciamento das amostras positivas para <i>Coxiella burnetii</i> .....	47
	5.4 Pesquisa de <i>Bartonella</i> spp.....	47
	5.4.1 Análise molecular das amostras para <i>Bartonella</i> spp. ....	47
	5.4.2 Análise filogenética das amostras positivas para o gênero <i>Bartonella</i> .....	48
	5.5 Identificação dos ectoparasitas coletados .....	51
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>52</b>
	6.1 Quirópteros e <i>Coxiella burnetii</i> .....	52
	6.2 Quirópteros e <i>Rickettsia</i> spp.....	55
	6.3 Quirópteros e <i>Ehrlichia</i> spp. / <i>Anaplasma</i> spp. ....	55
	6.4 Quirópteros e <i>Bartonella</i> spp. ....	56

6.5	Ectoparasitas .....	58
7	CONCLUSÕES	60
8	PERSPECTIVAS	61
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
10	ANEXOS	78

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1-</b> Sistemática das rickettsias <i>lato sensu</i> .....	<b>2</b>
<b>Figura 1.2</b> - Ciclo de Transmissão – Rickettsias do grupo da febre maculosa.....	<b>5</b>
<b>Figura 4.1</b> - Mapa representativo das três regiões de captura de quirópteros. Maciço da Pedra Branca, Jacarepaguá/RJ, Município de Igrapiúna – APA do Pratigi/BA e Parque Estadual da Serra do Tabuleiro (PEST)/ SC.....	<b>36</b>
<b>Figura 4.2</b> - Captura de quirópteros utilizando redes de neblina na localidade da APA do Pratigi - BA.....	<b>37</b>
<b>Figura 5.1</b> - Eletroforese em gel de agarose de <i>Coxiella burnetii</i> , produto da PCR nested amplificado a partir de DNA total do fígado de quiróptero capturado na região de Jacarepaguá, Rio de Janeiro. Amostra RM 557, morcego da espécie <i>Artibeus lituratus</i> . A seta indica a amplificação do segmento de 440 pb do gene <i>htpAB</i> . .....	<b>46</b>
<b>Figura 5.2-</b> Relações filogenéticas dos genótipos de <i>Bartonella</i> com base nas sequências parciais do gene <i>gltA</i> detectados nos morcegos capturados em diferentes regiões do Brasil em comparação com genótipos similares de bartonelas descritas na literatura. Os numerais romanos marcam os três clados formados pelas sequências obtidas das amostras de morcegos.....	<b>50</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 5.1</b> - Identificação dos quirópteros capturados na região de Jacarepaguá/RJ nos meses de dezembro/ 2013, março, maio e setembro/ 2014.....	<b>43</b>
<b>Tabela 5.2</b> - Identificação dos quirópteros capturados na região da APA do Pratigi/BA no mês de agosto / 2014 .....	<b>44</b>
<b>Tabela 5.3</b> - Identificação dos quirópteros capturado na região do Parque Estadual da Serra do Tabuleiro (PEST)/ SC no mês de maio/ 2015.....	<b>45</b>
<b>Tabela 5.4</b> - Amostras positivas para <i>C. burnetii</i> após análise molecular .....	<b>46</b>
<b>Tabela 5.5</b> - Amostras positivas para <i>Bartonella</i> spp. provenientes da localidade de Jacarepaguá–RJ .....	<b>47</b>
<b>Tabela 5.6</b> - Amostras positivas para <i>Bartonellas</i> pp. provenientes da localidade da APA do Pratigi – BA .....	<b>48</b>
<b>Tabela 5.7-</b> Amostras positivas para <i>Bartonella</i> spp. provenientes da localidade do Parque Estadual da Serra do Tabuleiro (PEST – SC).....	<b>48</b>
<b>Tabela 5.8</b> - Identificação taxonômica dos ectoparasitas coletados em quirópteros capturados na região de Jacarepaguá – RJ.....	<b>51</b>

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.1</b> - Espécies de <i>Bartonella</i> spp. descritas e sua relação com doença humana. ....	<b>16</b>
<b>Quadro 1.2</b> - Espécies de <i>Ehrlichia</i> e <i>Anaplasma</i> causadores de doenças humanas e veterinárias.....	<b>21</b>
<b>Quadro 4.1</b> - Set de <i>primers</i> utilizados para detecção de DNA de <i>Rickettsia lato sensu</i> .....	<b>40</b>



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%	Percentual
µl	Microlitro
APA	Área de Proteção Ambiental
BA	Bahia
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FMB	Febre Maculosa Brasileira
FMMR	Febre Maculosa das Montanhas Rochosas
HGA	<i>Human Granulocytic Anaplasmosis</i>
HGE	<i>Human Granulocytic Ehrlichiosis</i>
HME	<i>Human Monocytic Ehrlichiosis</i>
IFI	Imunofluorescência indireta
Ig	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobulina G
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
LCV	<i>Large Cell Variant</i>
LHR	Laboratório de Hantavirose e Rickettsioses
LPS	Lipopolissacarídeo
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NB	Nível de Biossegurança
Omp	<i>Outer Membrane Protein</i>
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEST	Parque Estadual da Serra do Tabuleiro
RGFM	Rickettsias do grupo da febre maculosa
RJ	Rio de Janeiro
rpm	Rotação por minuto
SC	Santa Catarina
SCV	<i>Small Cell Variant</i>
SNC	Sistema Nervoso Central

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Considerações Gerais

Nas últimas décadas, apesar dos esforços para erradicar as doenças infecciosas, patógenos, predominantemente zoonóticos, até então desconhecidos ou subestimados, emergiram com impacto na saúde humana. O número destas zoonoses (re)-emergentes associadas com animais silvestres, que se encontram mundialmente distribuídos, tem crescido como consequência, entre outros fatores, de um maior contato humano com animais e artrópodes capazes de transmitir doença, do aumento do interesse da comunidade científica e de uma maior disponibilidade de novas técnicas diagnósticas.

Neste cenário de zoonoses e animais silvestres, embora tenham sido identificados quirópteros naturalmente infectados por mais de 68 vírus, só recentemente os morcegos (ordem Chiroptera) têm sido mais estudados, considerando que muito pouco ainda se sabe sobre a patogênese e a transmissão de qualquer agente infeccioso, mesmo o vírus rábico (1, 2).

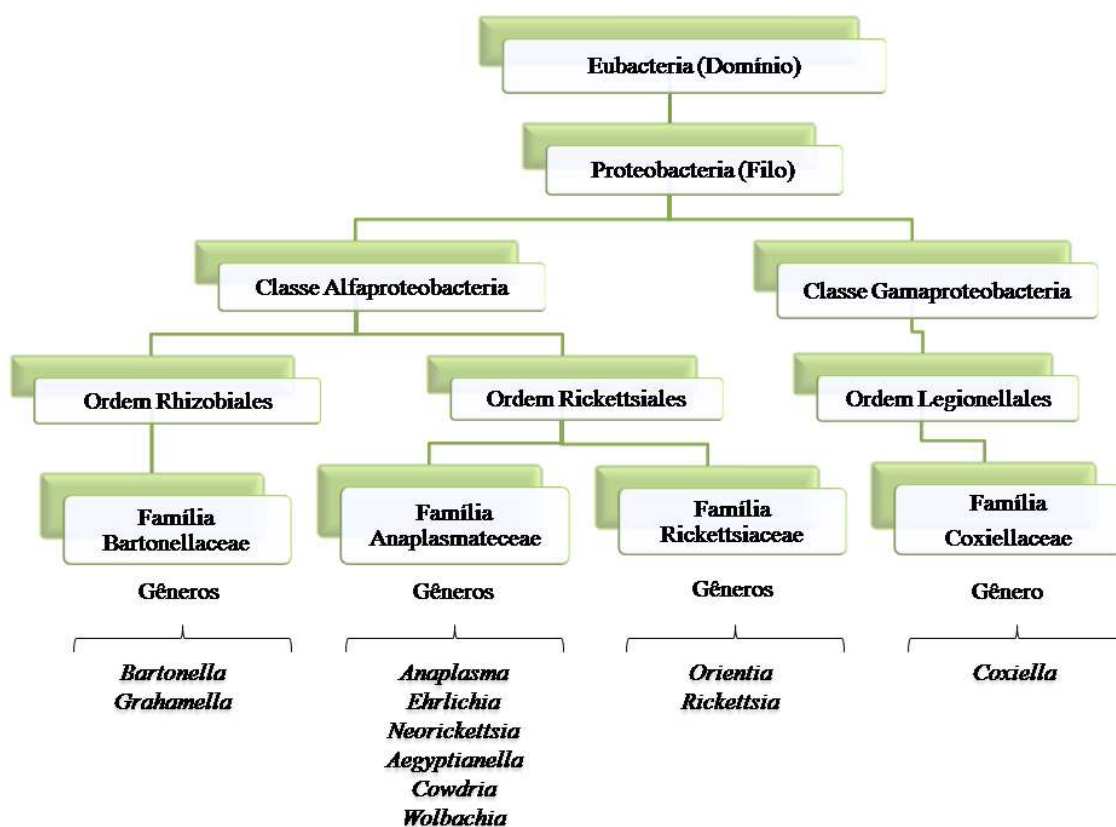
Fonte potencial de infecções zoonóticas, os morcegos representam quase 20% dos mamíferos, perdendo apenas para roedores (50% de todas as espécies de mamíferos) e, assim como os roedores, eles são encontrados em todos os continentes. Além disso, morcegos diferem de outros reservatórios de doenças silvestres pelo seu estilo de vida único e diversificado, incluindo a sua capacidade de voar, as estruturas sociais, muitas vezes altamente gregários, expectativa de vida longa, e por atuarem como hospedeiros de ligação, geralmente sem transmitir a infecção diretamente aos seres humanos. Estas características, associadas com o maior contato do homem com ambientes dos morcegos, aumentam as oportunidades de transmissão de agentes infecciosos para os seres humanos (3-5).

Segundo uma ampla revisão de literatura em 2001, das 1.415 espécies de organismos infecciosos conhecidas por serem patogênicas para os seres humanos, 868 (61%) são zoonóticas e 175 espécies patogênicas são associadas com doenças emergentes (6). Deste modo, a compreensão do comportamento biológico e patológico de um agente infeccioso através de diferentes espécies animais, pode fornecer indicadores úteis na epidemiologia das doenças infecciosas. Pode-se

deduzir, portanto, que o aumento de estudos em quirópteros certamente reforçará a importância destes mamíferos na manutenção não somente de vírus, fungos e protozoários, mas também de agentes bacterianos.

Em relação às rickettsias *lato sensu* (7), aqui definidas como proteobactérias dos subgrupos alfa 1 (gênero *Rickettsia*, *Ehrlichia* e *Anaplasma*), alfa 2 (gênero *Bartonella*) e gama (gênero *Coxiella*), historicamente estudada no campo da rickettsiologia (Figura 1.1), publicações sobre a participação dos quirópteros e de seus ectoparasitas no ciclo de manutenção de tais bactérias na natureza são escassas e muito incipientes(8-15).

Considerando a crescente importância dos quirópteros como reservatórios e transmissores de diferentes patógenos no mundo, a investigação da presença de infecção por rickettsias *lato sensu* nestes animais poderá, além de fornecer mais subsídios para a vigilância, auxiliar na compreensão da dinâmica destes agentes no território nacional.



**Figura 1.1-** Classificação das rickettsias *lato sensu*. Fonte: Adaptado de Lemos, 2013 (16)

## 1.2 Características Gerais – *Rickettsia* spp.

O gênero *Rickettsia* compreende um grupo de bactérias estritamente geneticamente relacionadas que se apresentam em forma de bacilos ou cocobacilos (7, 17). São parasitas intracelulares obrigatórias, tanto das células do hospedeiro vertebrado como das células do vetor invertebrado, podendo ser encontradas no interior do núcleo ou livre no citoplasma e se dividem por fissão binária. Metabolicamente, utilizam nutrientes do meio intracelular da célula infectada, sem que haja necessidade de síntese de proteínas específicas para seu metabolismo e outras funções vitais (18). A composição de sua parede celular é semelhante à de bactérias Gram-negativas, contendo lipopolissacarídeo, além de peptidoglicano, uma proteína de 135 kDa (*Outer membrane protein*), uma lipoproteína de 17 kD e uma proteína de superfície específica (OmpA) para rickettsias do grupo da febre maculosa (RGFM) que conferem características antigênicas e imunológicas que as identificam e possibilitam a sua sorotipagem (7, 17-19).

A definição "*Rickettsia*" foi muito utilizada como um termo genérico para muitas bactérias pequenas intracelulares que, transmitidas por ectoparasitas, não podiam ser cultivadas em meio axênico até a década de 1980, quando o progresso taxonômico alterou profundamente esta definição, com a introdução de técnicas moleculares. Desde então, foi possível realizar novas abordagens para inferências filogenéticas e taxonômicas a partir do estudo da genética e da evolução no conhecimento do genoma. Como resultado desse avanço, o termo "rickettsia" atualmente só se aplica a bactérias transmitidas por artrópodes, pertencentes ao gênero *Rickettsia* dentro da família Rickettsiaceae na Ordem Rickettsiales,  $\alpha$ -Proteobacteria (17).

Atualmente os agentes pertencentes ao gênero *Rickettsia* têm sido genomicamente divididos em quatro grupos: (i) Grupo Ancestral, que abriga as espécies *Rickettsia belii* e *Rickettsia canadensis*; (ii) Grupo do Tifo, composto por *Rickettsia typhi* e *Rickettsia prowazekii*; (iii) Grupo Transicional, constituído por *Rickettsia felis*, *Rickettsia akari* e *Rickettsia australis* e (iv) Grupo da Febre Maculosa (RGFM) que abriga mais de 25 espécies com 16 confirmadamente associadas com doença humana, incluindo a espécie *Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia parkeri* no continente americano, *Rickettsia africae* na Europa e África, *Rickettsia japonica* na

Ásia e *Rickettsia conorii* subsp.*israelensis* na Ásia, no Oriente Médio e alguns países da Europa (20-23).

### **1.2.1 Rickettsias do grupo da febre maculosa**

Em 1899, Maxcy descreveu nos Estados Unidos, as manifestações clínicas da febre maculosa das Montanhas Rochosas (FMRR), a mais bem conhecida dentre as RGFM. Entre os anos de 1906 e 1909, Ricketts identificou o carrapato como vetor e observou rickettsias em esfregaços preparados a partir de tecidos de carrapatos consolidando o conceito de doença infecciosa — causada por bactérias. No período de 1916 a 1919, Wolbach, além de visualizar pela primeira vez o agente etiológico — as rickettsias — no interior de células endoteliais lesadas, demonstrou a presença da bactéria no interior de exemplares de carrapatos em todas as fases de vida. A FMRR foi a primeira doença humana na qual o papel dos carrapatos enquanto vetor foi estabelecido, sendo o protótipo das rickettsioses transmitidas por esse grupo de vetores (7, 18). Na América do Sul, há evidências da existência da febre maculosa transmitida por carrapatos desde o século XIX, embora a febre maculosa tenha sido descrita pela primeira vez oficialmente no Brasil, em São Paulo, por José Toledo Piza em 1929. Piza iniciou a distinção da febre maculosa das demais doenças exantemáticas no Brasil, inclusive chegando a demonstrar sua semelhança com a FMRR descrita pelos norte-americanos. (7, 24).

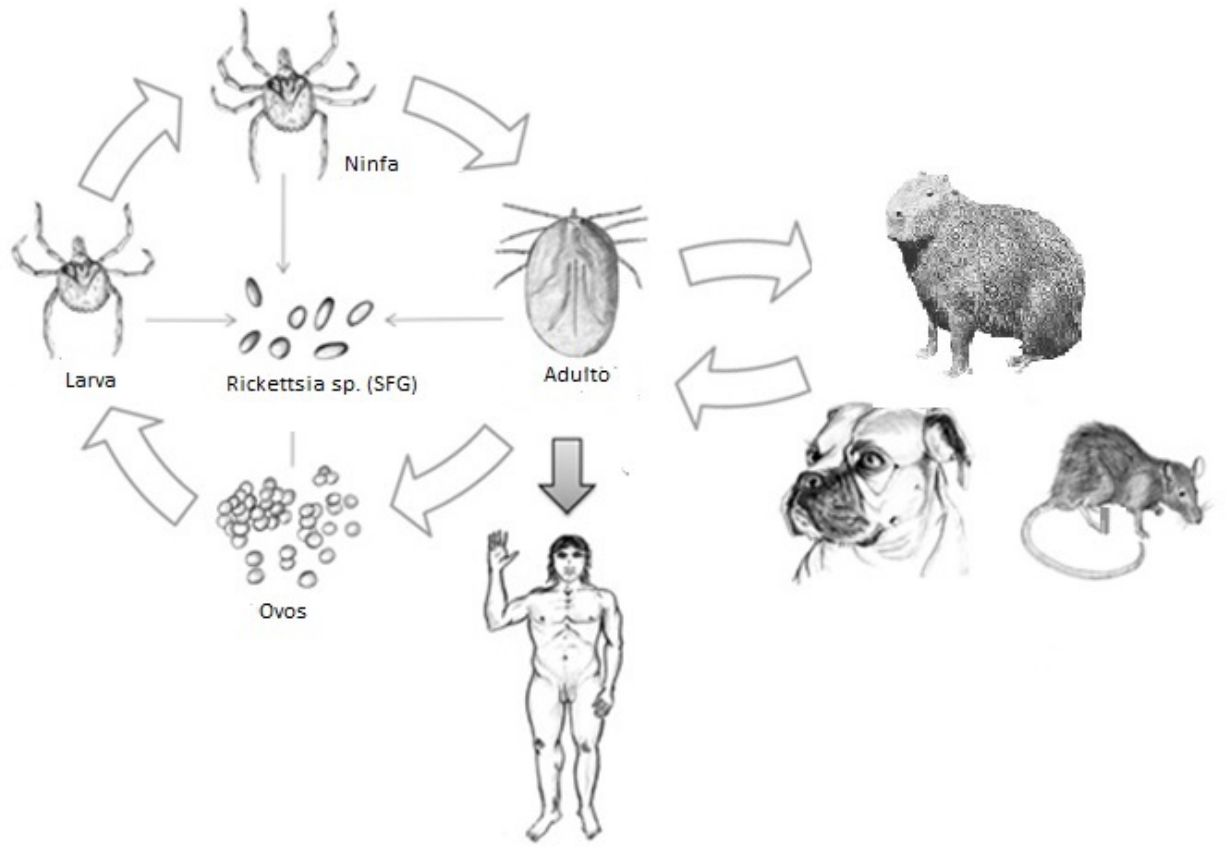
Atualmente, das rickettsias descritas na literatura, as pertencentes ao grupo da febre maculosa são as de maior relevância para a saúde pública no Brasil. *Rickettsia rickettsii*, o protótipo do grupo da febre maculosa, é a espécie mais patogênica no mundo e a mais importante além de melhor caracterizada no Brasil (25-27).

### **1.2.2 Transmissão**

A transmissão das RGFM está associada a carrapatos ixodídeos. O carrapato é responsável pela manutenção da bactéria na natureza, são hospedeiros naturais, reservatórios e vetores das rickettsias pertencentes a esse grupo (28).

No carrapato a bactéria pode ser transmitida pela via transovariana (transmissão da bactéria entre sucessivas gerações), transtadial (sobrevivência do agente em todos os estágios de vida) e horizontal, durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro com rickettsemia; essas características permitem ao carrapato

permanecer infectado durante toda a vida e também por muitas gerações após uma infecção primária. (29-31). Entretanto, apenas esses mecanismos de transmissão entre os carrapatos não são suficientes para a manutenção da bactéria na natureza, tendo em vista os efeitos deletérios que a mesma causa nos carrapatos (31, 32).



**Figura 1.2 - Ciclo de Transmissão – Rickettsias do grupo da febre maculosa.** Fonte: Adaptação de Vélez et al., 2012 (33).

Ainda não é claro o papel dos animais vertebrados como reservatórios para as rickettsias, porém algumas espécies de animais selvagens estão sendo indicados como hospedeiros amplificadores, entre eles, pequenos roedores, aves, antas, capivaras, répteis, gambás e morcegos (Figura 1.2) (15, 34-36).

Os seres humanos são hospedeiros ocasionais para carrapatos e raramente têm um papel na transmissão subsequente da bactéria. Neste contexto, a infecção por *Rickettsia* na população humana pode ser considerada um evento acidental no ecossistema das rickettsias, já que o homem é um hospedeiro que não desempenha papel na manutenção dessas bactérias na natureza (28).

### 1.2.3 Situação Epidemiológica da Febre Maculosa Brasileira

No ano de 2001 a febre maculosa brasileira (FMB) passou a estar sob a vigilância epidemiológica e tornou-se doença de notificação compulsória regulamentada pela Portaria 2325/GM. Desde então, mais de 1.100 casos de FMB foram notificados no país (37), embora este número possa estar subestimado devido à baixa suspeição clínica, em especial, em períodos de epidemias de doenças como dengue e leptospirose, cuja manifestação clínica se confunde com a FMB.

Atualmente, a maioria dos casos da FMB se concentra na região sudeste, com casos esparsos em outros estados brasileiros. Essa maior incidência coincide com a presença do principal vetor e reservatório, o carrapato da espécie *Amblyomma sculptum* pertencente ao complexo *Amblyomma cajennense* (38). Em 2009 foi identificada pela primeira vez a infecção natural por *R. rickettsii* no carrapato conhecido popularmente como carrapato marrom do cão, *Rhipicephalus sanguineus*, um conhecido vetor de *R. rickettsii* no México e nos Estados Unidos. Este fato tem merecido atenção, uma vez que esta espécie vive em ambientes peridomiciliares, alimentando-se de animais domésticos e mantendo uma estrita relação com o homem (26, 39, 40).

A incidência da FMB ocorre na maioria das vezes de forma esporádica, mas a ocorrência simultânea da doença entre membros da mesma família ou grupos de indivíduos com atividade em comum pode ocorrer (7). A sazonalidade da doença está relacionada como o aumento da atividade reprodutiva do carrapato, com grande número de larvas e ninfas, promovendo maior contato com o ser humano. Portanto, apesar de poder ocorrer em qualquer época do ano, observa-se um aumento no número de casos entre os meses de maio a outubro (25).

### 1.2.4 Aspectos Clínicos

Uma vez ocorrido o parasitismo pelo vetor, o tempo médio para que ocorra a inoculação da bactéria é, em média, de 6 a 10 horas. Considera-se que este seja o período necessário para que as rickettsias que se encontram latentes nas glândulas salivares do carrapato sejam reativadas pela elevação da temperatura decorrente do sangue sugado pelo vetor, e então inoculado no local da picada (18, 41).

Em vista da capacidade das rickettsias de infectar células endoteliais de todo organismo, uma grande gama de manifestações clínicas são frequentemente observadas: cutâneas, musculoesqueléticas, cardíacas, pulmonares,

gastrintestinais, renais e neurológicas. As manifestações clínicas da febre maculosa apresentam gravidade variável, de acordo com o tempo de evolução da doença, a espécie e o estado imunológico do paciente, entre outros fatores. Após um período de incubação de 2 a 14 dias com uma média de 7 dias, o quadro é de febre, cefaleia intensa, mialgia, artralgia, astenia, dor abdominal, náusea e vômito (18, 42, 43).

Febre, cefaleia e exantema constituem a tríade clínica clássica da FMB causada por *R. rickettsii* que, semelhante à FMRR, pode ocorrer com frequência variável. Assim, menos de 5% dos pacientes apresentam esse conjunto de manifestações clínicas nos três primeiros dias de sintoma, 60 — 70% até o fim da 2ª semana de doença e 30% não apresentam a tríade clássica, tornando o diagnóstico difícil (7, 18, 44).

O exantema, sinal mais importante da FMB, aparece geralmente entre o terceiro e o quinto dia de doença, podendo não estar presente em 15-20% dos pacientes (7). O exantema, inicialmente, se caracteriza pelo padrão macular, podendo evoluir posteriormente, em dois a cinco dias, para um padrão maculopapular e petequial, acometendo punhos e tornozelos, disseminando-se para o tronco, face, pescoço, palmas e solas. A doença pode evoluir em duas ou três semanas para a forma grave com lesões equimóticas e hemorrágicas. Estas lesões podem determinar áreas de necrose e gangrena tecidual, decorrentes das lesões extensas na microcirculação (18, 25, 45).

A ausência ou a não identificação de exantema em alguns pacientes, principalmente em indivíduos idosos, negros ou nos pacientes que são submetidos a tratamento específico precocemente, pode impedir a confirmação diagnóstica e o tratamento específico para a doença. Tal fato pode determinar a morte dentro de 8-15 dias após o início dos sintomas. Na forma fulminante, o paciente pode evoluir ao óbito dentro de cinco dias (7).

Com a identificação mais recente de uma nova espécie de RGFM associada com doença humana no Brasil, a cepa Floresta Atlântica /cepa Bahia associada com *R. africae*, *R. parkeri* e *R. sibirica*, o paciente desenvolve, quando comparado com os casos da FMB um quadro mais benigno, no qual se observa a presença de um cancro de inoculação no local da picada do carrapato (46, 47).

Devido às manifestações clínicas inespecíficas na fase inicial, a doença é frequentemente confundida com um grande número de outros diagnósticos, como leptospirose, dengue, hepatite viral, salmonela, encefalite, malária ou pneumonia por



*Mycoplasma pneumoniae*. Com o surgimento do exantema, os diagnósticos diferenciais são: meningococemia, dengue, sepse por estafilococos e por Gram-negativos, viroses exantemáticas (enteroviroses, mononucleoses infecciosa, rubéola, sarampo), outras rickettsioses do grupo do tifo, ehrlichioses, borrelioses e febre purpúrica brasileira (45).

### **1.2.5 Diagnóstico Laboratorial**

O teste de imunofluorescência indireta (IFI) é considerado hoje, pela Organização Mundial de Saúde, o teste de referência para o diagnóstico sorológico das rickettsioses. O diagnóstico é geralmente retrospectivo e realizado a partir da análise de duas amostras de soro pareadas e obtidas num prazo ideal de 2-4 semanas entre elas. O aumento de quatro vezes no título de anticorpos da classe imunoglobulina (Ig) M ou G confirma o diagnóstico. A análise molecular a partir da reação em cadeia de polimerase (PCR, polymerase chain reaction) se encontra disponível e deve ser realizada na fase inicial da doença, quando anticorpos anti-rickettsias ainda não são detectados, especialmente em casos graves e óbitos (48). A imunohistoquímica é outra técnica diagnóstica que pode ser utilizada em amostras de biópsia de pele ou em material de necropsia.

## **1.3 Febre Q**

Em 1935, Edward Derrick foi convidado a investigar um surto de doença febril não identificada que afetava trabalhadores de abatedouros em Brisbane, Queensland, na Austrália. Uma vez que casos esporádicos da doença continuaram a ocorrer regularmente, Derrick começou a descrever a doença, adotando em 1937 o termo "febre Q" ('Q' para o termo 'query') para descrevê-la. Após tentativas frustradas de isolamento, especulou-se que se tratava de um agente viral. A hipótese da origem rickettsial da doença foi levantada por MacFarlane Burnet e Mavis Freeman, a partir da análise de amostra de material infeccioso enviado por Derrick. Subsequentemente Burnet e Freeman após reproduzirem a infecção em cobaias e outros animais, observaram vacúolos intracelulares preenchidos com material granular em diversas secções de baço coradas pela hematoxilina-eosina. O estudo histopatológico permitiu a visualização de numerosos pequenos bastonetes

que pareciam de natureza rickettsial. Com estes resultados, Derrick e seus colaboradores investigaram a epidemiologia da doença, especialmente o papel potencial de um vetor artrópode. Eles concluíram que os animais silvestres eram o reservatório natural de febre Q, com animais domésticos como reservatórios secundários, e que a doença poderia ser transmitida por carrapatos ou outros artrópodes (49-51).

Independente do trabalho de Derrick, em 1935, Gordon Davis, do laboratório Rocky Mountain em Hamilton, Estados Unidos, ao investigara ecologia da febre maculosa observou que carrapatos coletados no distrito de Nine Mile causavam uma resposta febril nas cobaias nos quais eles se alimentavam. Como o quadro clínico observado nestes animais não sugeria a FMRR, em 1936, Herald Cox associou-se com Davis para estudar o “agente de Nile Mile” e, assim como Burnet e Freeman, demonstraram que o agente etiológico era filtrável e que exibia propriedades de vírus e de rickettsias. Em 1938, Cox conseguiu cultivar agente infeccioso em ovos embrionados. Uma ligação definitiva entre o “agente de Nile Mile” e o agente da febre Q australiano se estabeleceu quando no ano de 1938, Rolla Dyer, diretor do National Institute of Health, EUA, infectou-se com o organismo com o qual Cox e Davis trabalhavam em Hamilton. A inoculação do agente da febre Q australiano, enviado por Burnet, em cobaias que em seguida foram desafiadas com cepas isoladas do sangue de Dyer possibilitou demonstrar a existência de imunidade cruzada. Essa imunidade foi um indicativo de que o “agente de Nile Mile” e o agente da febre Q eram, de fato, isolados de um único microrganismo. Em homenagem a Cox e Burnet, que identificaram o agente da febre Q como uma nova espécie de rickettsia e a criação proposta por Cornelius B. Philip de um novo gênero chamado *Coxiella*, o agente etiológico passou a se chamar *Coxiella burnetii* (51).

### **1.3.1 Características Gerais – *Coxiella burnetii***

Originalmente *C. burnetii* foi chamada de *Rickettsia burnetii* por compartilhar características da família Rickettsiaceae, como ser um organismo intracelular obrigatório e ter um ectoparasita como reservatório. No entanto, a análise da sequência 16S rRNA da bactéria revelou que *C. burnetii* se encontra mais estreitamente relacionada com *Legionella* spp. e que portanto se classifica na subdivisão gama da Proteobactéria (52, 53).

*Coxiella burnetii* é um cocobacilo, pleomórfico com parede celular semelhante à das bactérias Gram-negativas, que possui a característica única entre as bactérias intracelulares de se proliferar dentro do ambiente hostil de um fagolisossoma. Esta bactéria possui uma capacidade de sobrevivência extracelular e uma resistência à ruptura física e química que ultrapassa grandemente a das células bacterianas vegetativas (54).

A resistência de *C. burnetii* é atribuída a um desenvolvimento ainda incompletamente definido que envolve duas variações morfológicas distintas: uma variante de pequenas células (SCV), resistente a tensões extracelulares, e uma variante de grandes células (LCV), metabolicamente ativa e sensível a stress ambiental. A hipótese sugere que as LCVs sofrem diferenciação esporogênica para produzir formas resistentes 'sporo-like', as SCVs (55, 56).

*Coxiella burnetii* apresenta tropismo por células do sistema monocítico fagocitário e, caracteristicamente, pode existir em duas fases antigênicas. O lipopolissacarídeo (LPS) representa um dos principais determinantes de virulência de *C. burnetii*. A fase I é a fase naturalmente encontrada em animais, artrópodes e humanos infectados. Trata-se da fase virulenta na qual o LPS, com sua estrutura de carboidratos estendida, bloqueia o acesso dos anticorpos às proteínas de superfície. Induzida laboratorialmente, a fase II, não virulenta, é obtida após passagens em culturas celulares ou ovos embrionados. Deleções do cromossomo resultam em mudanças na estrutura do LPS, tornando-o acessível aos anticorpos (53, 57).

A resposta de anticorpos na doença aguda é principalmente para os organismos na fase II. A fase natural I é apenas fracamente internalizada por monócitos e macrófagos, mas podem sobreviver no interior dessas células. Em contraste, a fase II é facilmente internalizada, mas é rapidamente eliminada. O receptor utilizado por cada fase de *C. burnetii* para entrada em monócitos e macrófagos é provavelmente crucial para a sua sobrevivência dentro destas células fagocíticas (51).

### **1.3.2 Transmissão**

Uma grande variedade de animais pode ser infectada com *C. burnetii*, incluindo mamíferos, pássaros e artrópodes, principalmente carrapatos (58). Os carrapatos podem ser encontrados naturalmente infectados com *C. burnetii*, apesar disso, eles parecem não ser importantes para a manutenção das infecções em seres

humanos (51). O organismo se multiplica nas células do intestino dos carrapatos e um grande número de bactérias é eliminado nas fezes. Couro e lã contaminados podem se tornar uma fonte de infecção para as pessoas por contato direto ou após as fezes secarem, sendo inaladas como partículas de poeira no ar (59).

Todos os mamíferos quando infectados excretam *C. burnetii* resistente à dessecação na urina, fezes, leite, e, principalmente em produtos de nascimento. As fontes de infecção humana mais comumente identificados são animais de fazenda, como gado, cabras e ovelhas, além de cães e gatos, estes últimos associados a surtos urbanos. Devido à sua resistência a agentes físicos, provavelmente relacionados ao seu processo de esporulação, *C. burnetii* sobrevive por longos períodos no ambiente (51, 57, 59).

Não há dúvida de que os aerossóis contaminados são o principal mecanismo pelo qual *C. burnetii* é transmitida aos seres humanos, contudo, a transmissão também pode ocorrer por ingestão, através do consumo do leite cru contaminado e, mais raramente, via pessoa-a-pessoa. Há relatos de propagação por via respiratória após autópsias, disseminação nosocomial respiratória, transmissão por transfusão de sangue e também durante trabalho de parto humano (51, 60-62).

### **1.3.3 Situação Epidemiológica da Febre Q**

Embora os dados epidemiológicos indiquem que a febre Q deva ser considerada um problema de saúde pública em muitos países, em poucos deles a febre Q se encontra incluída na listadas doenças de notificação compulsória. Sendo assim, sua epidemiologia vem sendo estudada a partir de investigações de surtos definidos, de inquéritos sorológicos realizados no homem ou nos animais em algumas áreas, ou a partir de dados obtidos por laboratórios de referência para rickettsioses (51).

A primeira descrição de febre Q no Brasil data de 1953, em São Paulo (63). Nas últimas seis décadas os dados sobre a prevalência da doença em território brasileiro estiveram restritos a publicações científicas, e as informações existentes, em sua maioria, concentradas na região sudeste. Existem relatos de evidência sorológica em humanos e animais nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro e Bahia (64-68).

Em 2010, foi reportado o primeiro caso de infecção por *C. burnetii* confirmada por evidência molecular no Brasil, em um paciente residente no município de

Itaboraí, no estado do Rio de Janeiro, que apresentava febre associada com trombocitose. Uma investigação epidemiológica foi realizada na região de Itaboraí com coleta de amostras de humanos, vertebrados e artrópodes. O DNA de *C. burnetii* foi identificado em cães, ovelhas, cabras, pulgas e carrapatos, além da identificação de anticorpos anti- *C. burnetii* em amostra humana, confirmando a circulação do agente da febre Q na região (69, 70). Somente em 2014 a febre Q foi incluída na lista de doenças de notificação compulsória no Brasil.

#### **1.3.4 Aspectos Clínicos**

A apresentação clínica da febre Q é extremamente variável. A infecção pode ser assintomática, pode se manifestar como uma doença aguda ou como doença crônica (71). É provável que fatores tais como a via de infecção e do tamanho do inóculo afete a expressão de infecção por *C. burnetii* (72). A maioria dos pacientes (50%-60%) infectados com febre Q é assintomática; para pacientes sintomáticos a apresentação clássica é uma doença semelhante à gripe que se manifesta por febre, tosse, dor de cabeça, mialgias e artralgias. Alguns pacientes também desenvolvem pneumonia, geralmente leve e hepatite (73).

Gravidez, imunossupressão, lesões nas válvulas cardíacas e alterações vasculares estão associadas com maior suscetibilidade de evoluir para febre Q crônica. A febre Q crônica ocorre em aproximadamente 5% dos pacientes infectados com *C. burnetii* e pode desenvolver-se de forma insidiosa, meses ou anos após a doença aguda. Na forma crônica da doença, tipicamente, o coração é o órgão mais comumente envolvido, seguido de artérias, ossos e fígado, com hepatite possivelmente complicada por fibrose hepática ou cirrose (57).

A infecção animal com *C. burnetii* é, na maioria dos casos, assintomática e o termo coxiellose é considerado uma designação mais apropriada (74). Em animais, durante a fase aguda, a bactéria pode ser encontrada no sangue, pulmões, baço e fígado. No entanto, a bactéria pode persistir após a doença aguda ou subclínica inicial, sendo liberada persistentemente de nas fezes e urina. A infecção crônica nos animais pode causar aborto, parto prematuro ou descendentes fracos em ovinos, bovinos e caprinos (75).

### 1.3.5 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico de febre Q baseia-se principalmente no exame sorológico. A detecção de anticorpos por imunofluorescência é o método mais comumente utilizado devido à sua alta sensibilidade e especificidade. A PCR é capaz de detectar a presença do DNA de *C. burnetii* no sangue ou em tecidos (73).

O diagnóstico sorológico é fácil de estabelecer, embora os anticorpos sejam detectados apenas depois de 2 a 3 semanas a partir do início da doença. Assim, os testes sorológicos deverão ser realizados em ambos os soros; o de fase aguda e o de fase convalescente. A IFI, referência para o diagnóstico da febre Q, permite a diferenciação de infecções de febre Q aguda e crônica. As duas fases antigênicas distintas de infecção por *C. burnetii* são detectadas pelo teste sorológico. Na febre Q aguda, o título de IgG anti-fase II é elevado e é maior do que o título de IgG anti-fase I. Na febre Q crônica, o título de IgG anti-fase I também é elevada e é tipicamente mais elevado do que o título de IgG anti-fase II (51, 76).

Reações cruzadas são a maior fonte de confusão na interpretação dos resultados sorológicos. Elas têm sido descritas entre *C. burnetii* e *Legionella* spp., além de *Bartonella* spp. O diagnóstico diferencial é facilmente estabelecido quando os títulos de anticorpos quantitativos contra os antígenos de *C. burnetii* de fase I e de fase II são determinados (51).

Durante os últimos anos, vários ensaios de diagnóstico baseados em PCR foram desenvolvidos para detectar o DNA de *C. burnetii*. A PCR vem sendo utilizada com sucesso para detectar a bactéria em culturas de células e amostras clínicas, incluindo válvulas cardíacas ou biópsias vasculares (ex. de aneurisma, de aorta), biópsia do fígado, da placenta, no leite, em tecidos fetais, em carrapatos e em amostras de sangue (77). A disponibilidade de iniciadores derivados a partir de genes específicos para *C. burnetii* tem permitido um método simples e confiável para a detecção da bactéria. Além disso, a PCR tem provado ser mais sensível do que técnicas de cultura padrão para o diagnóstico retrospectivo com amostras congeladas e para o acompanhamento dos pacientes tratados para a febre Q crônica (57).

## 1.4 Bartoneloses

As doenças infecciosas causadas por *Bartonella* spp. foram descritas há mais de 1.000 anos. Historicamente, as infecções com *Bartonella bacilliformis* têm sido conhecidas desde as dinastias Incas. *Bartonella quintana* foi detectado em tecido humano de 4.000 anos de idade provenientes do sudeste da França e nos restos mortais de soldados do Grande Exército de Napoleão em Vilnius, Lituânia (78-80).

Apesar de historicamente *Bartonella* spp. estar associada com doença humana há séculos, cientificamente, a descrição destas doenças ocorreu mais recentemente. *Bartonella bacilliformis*, como exemplo, foi descrita como causadora de doença humana em 1870 entre trabalhadores ferroviários na região montanhosa dos Andes do Peru. Entre 1869 e 1873, cerca de 7.000 trabalhadores morreram com anemia hemolítica aguda causada pela infecção por esta bactéria. Após anos de pesquisas e descobertas, a doença exótica de ocorrência restrita à região dos Andes causada por *B. bacilliformis* foi denominada Doença de Carrión (81).

*Bartonella quintana*, a causadora da febre das trincheiras, foi descrita pela primeira vez durante a Primeira Guerra Mundial. Esta doença afetou mais de um milhão de soldados envolvidos na guerra de trincheiras na Europa. O organismo foi originalmente designado *Rickettsia quintana* em 1917, mas mais tarde, quando isolado em cultura de células, o nome foi mudado para *Rochalimaea quintana*. A ligação entre *B. henselae* e a doença da arranhadura do gato (CSD) foi confirmada em 1989. No entanto, a primeira descrição da doença foi apresentada 40 anos antes com base no exame histopatológico dos gânglios linfáticos inflamados. Anteriormente conhecido como *Rochalimaea henselae*, o organismo foi reclassificado como *B. henselae* em 1993 (81-83).

Brenner e colaboradores propuseram em 1993 que as espécies anteriormente pertencentes ao gênero *Rochalimaea* fossem unidas com o gênero *Bartonella*, que abrigava, até então, a espécie *B. bacilliformis*. A proposta de fundir os gêneros foi baseada em dados de hibridização DNA-DNA e comparação das sequências de genes 16S rRNA existentes. Esta reclassificação também resultou na transferência destes organismos a partir da família Rickettsiaceae à família Bartonellaceae, e removeu a família Bartonellaceae da ordem Rickettsiales. Em 1995, Birtles e colaboradores propuseram a unificação do gênero *Grahamella* com o gênero *Bartonella*, o que resultou na adição de cinco novas espécies ao gênero. Como

efeito, estas reclassificações eliminaram os gêneros *Rochalimaea* e *Grahamella* (84-86).

Desde o início da década de 1990, o número de espécies e subespécies de *Bartonella*, identificadas a partir de uma ampla variedade de mamíferos, tem aumentado consideravelmente. Atualmente, são relatadas na literatura mais de 30 espécies de *Bartonella*, das quais, 15 são conhecidas ou suspeitas de ser patogênica ao homem (Quadro1.1) (87-89). Considerando que *B. bacilliformis* causa doença humana restritamente na região andina, informações referentes a este agente não serão apresentadas nos tópicos seguintes.



**Quadro 1.1** - Espécies de *Bartonella* spp. descritas e sua relação com doença humana.

<i>Bartonella</i> spp.	Reservatório/Vetor	Doença Humana
<i>B. alsatica</i>	Coelho/ desconhecido	Endocardite, linfadenopatia
<i>B. australis</i>		Sem descrição
<i>B. bacilliformis</i> *	Humanos/ Flebotomíneos	Febre de Oroya e Verruga Peruana
<i>B. birtlesii</i>	Roedores	Sem descrição
<i>B. bovis</i> ( <i>B. weissii</i> )	Bovinos	Sem descrição
<i>B. capreoli</i>	Ruminantes	Sem descrição
<i>B. chomelii</i>	Isolado pela primeira vez em bovinos	Sem descrição
<i>B. clarridgeiae</i>	Gatos/ Pulgas de gatos	Linfadenopatia
<i>B. coopersplainsensis</i>	Primeira descrição em roedores	Sem descrição
<i>B. doshiae</i>	Roedores	Sem descrição
<i>B. elizabethae</i>	Roedores	Endocardite, neuroretinite
<i>B. grahamii</i>	Roedores e insetívoros	Neuroretinite
<i>B. henselae</i>	Gatos/ Pulgas de gatos	Linfadenopatia, endocardite, angiomatose bacilar, peliose bacilar, neuroretinite, osteomielite, artropatia, bacteriemia com febre
<i>B. koehlerae</i>	Gatos/desconhecido	Endocardite, linfadenite
<i>B. peromysci</i>	Roedores	Sem descrição
<i>B. phoceensis</i>	Primeira descrição em roedores silvestres	Sem descrição
<i>B. queenslandensis</i>	Primeira descrição em roedores silvestres	Sem descrição
<i>B. quintana</i>	Humano/ Piolho humano	Febre das trincheiras, endocardite, angiomatose bacilar, linfadenite
<i>B. rattimassiliensis</i>	Primeira descrição em roedores silvestres	Sem descrição
<i>B. rattiaustraliensis</i>	Primeira descrição em roedores silvestres	Sem descrição
<i>B. rochalimae</i>	Canídeos/pulgas	Bacteremia, febre, esplenomegalia
<i>B. schoenbuchensis</i>	Ruminantes/desconhecido	Sem descrição
<i>B. talpae</i>	Toupeira	Sem descrição
<i>B. tamiae</i>	Primeira descrição em humanos	Doença febril
<i>B. taylorii</i>	Roedores	Sem descrição
<i>B. tribocorum</i>	Primeira descrição em roedores silvestres	Sem descrição
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>arupensis</i>	Cão, roedor / carrapatos	Bacteremia, febre, endocardite
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i>	Cão/ carrapatos	Endocardite
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>vinsonii</i>	Roedores / ácaro	Endocardite, bacteremia
<i>B. washoensis</i>	Roedores/ pulgas	Miocardite, meningite
<i>B. mayotimonensis</i>	Primeira descrição em humanos	Endocardite
<i>B. melophagi</i>	Ovelhas	Bacteremia
<i>B. ancashi</i>	Primeira descrição em humanos	Verruga peruana
<i>B. merieuxii</i>	Primeira descrição em canídeos	Sem descrição
<i>B. antechini</i>	Primeira descrição em pulgas e carrapatos	Sem descrição
<i>B. thailandensis</i>	Primeira descrição em roedores	Sem descrição

\*Agente bacteriano restrito à região andina, sem distribuição mundial. /Fonte: Adaptação de Angelakis & Raoult, 2014 (89)

#### **1.4.1 Características – *Bartonella* spp.**

Os membros do gênero *Bartonella* são bastonetes, pleomórficos curtos Gram-negativos. São organismos exigentes, aeróbios, e oxidase-negativos, que pertencem ao subgrupo  $\alpha$ -2 da classe Proteobacteria. Eles são principalmente hemotrópicos, bactérias intraeritrocitárias. O isolamento dos organismos é normalmente obtido através da cultura bacteriológica de sangue após a lise parcial dos eritrócitos. Em cultura, as bartonelas requerem meios axênicos específicos enriquecido com sangue de cavalo ou coelho (90).

#### **1.4.2 Transmissão**

As bartonelas podem ser encontradas infectando vários hospedeiros vertebrados, como coelhos, raposas, bovinos e, em especial, roedores, gatos e cães (80).

Essas bactérias possuem um ciclo natural de infecção crônica em um hospedeiro-reservatório e um padrão de transmissão bacteriana sustentado por um vetor definido e evolutivamente bem adaptado (72). Devido à capacidade das bartonelas de infectar eritrócitos de um número diverso de hospedeiros mamíferos, existe uma grande possibilidade de aquisição destas bactérias transmitidas pelo sangue por uma variedade de vetores artrópodes. Na literatura, flebotomíneos, piolhos do corpo humano e pulgas têm sido implicados na transmissão de bartonelas. Apesar de não haver evidências definitivas da sua competência vetorial, pesquisas moleculares de populações de carrapatos sugerem que estes artrópodes também podem ser considerados como potenciais vetores de bartonela (91).

Tem sido sugerida a existência de uma associação específica entre uma espécie de *Bartonella* e um único hospedeiro mamífero. Essa ideia é apoiada pelo fato que, para ser um reservatório competente, os animais devem ser susceptíveis à bactéria de forma que permita o desenvolvimento de uma infecção crônica (92).

A transmissão de bartonelas ao homem ocorre por vetores artrópodes ou por inoculação após contato traumático ou não, com animais infectados (93).

#### **1.4.3 Situação Epidemiológica das Bartoneloses**

No Brasil, somente no ano de 2014 a bartonelose passou a ser doença de notificação obrigatória. Embora existam poucos relatos, estudos

soroepidemiológicos e moleculares em humanos e animais têm demonstrado a circulação das bartonelas em nosso território. Assim, em 2005, em um estudo com 437 adultos saudáveis residentes no estado de Minas Gerais, os autores mostraram uma soroprevalência de 13,7% e 12,8% para *B. henselae* e *B. quintana*, respectivamente (64). Em Campinas, São Paulo, foi investigado a prevalência de *Bartonella* spp. em 500 doadores de sangue e como resultado, o DNA de *Bartonella* foi encontrado em amostras de 3,2% da população de estudo, com 15 doadores infectados com *B. henselae* e um doador infectado com *B. clarridgeiae*. Além disso, anticorpos anti- *B. quintana* foram encontrados em 32% do total de amostras (94).

No Rio de Janeiro, na região de Jacarepaguá, Lamas e colaboradores encontraram uma soroprevalência para *Bartonella* spp. de 38,4% em indivíduos HIV positivos e de 34% no grupo controle formado por amostras do banco de doadores de sangue. Ainda neste estudo, foi demonstrado que a infecção humana estava associada com a criação de gatos; 35,7% dos gatos pertencentes aos indivíduos HIV positivos apresentaram anticorpos anti-*Bartonella* (95).

Com relação aos animais, no estado do Rio de Janeiro, Crissiuma e colaboradores identificaram, além de uma prevalência sorológica de 47,5% — anticorpos anti-*Bartonella* da classe IgG — a presença do genoma em 42,5% dos felinos domésticos incluídos no estudo (96). Ainda no Rio de Janeiro, Rozental detectou por ferramentas moleculares a presença do DNA de *Bartonella* spp. em dois exemplares de roedores silvestres coletados no município de Piraí (48). Em outro estudo, realizado no estado do Rio Grande do Sul, os autores encontraram 17,2% dos gatos PCR-positivos para *Bartonella* (97). Em São Paulo, o DNA de *B. henselae* e *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* foi encontrado co-infectando um cachorro em São Paulo (98). Mais recentemente, em um estudo de soroprevalência realizado em zoológicos nos estados de São Paulo e de Mato Grosso do Sul demonstrou que 11% dos canídeos silvestres tinham anticorpos anti- *Bartonella* spp. (99). Ainda no Mato Grosso do Sul, uma pesquisa com 42 roedores silvestres detectou DNA de *Bartonella* spp. em 42,9% deles (100).

#### **1.4.4 Aspectos Clínicos**

*Bartonella henselae*, *B. quintana* e *B. bacilliformis* são responsáveis pela maioria das infecções humanas. A infecção por *Bartonella* spp. pode se apresentar de forma aguda ou crônica, com proliferação vascular ou supurativa. A gravidade

das manifestações clínicas está relacionada com o estado imunológico do paciente (89). *Bartonella quintana* é o agente da febre das trincheiras, que é caracterizada por um início súbito de febre associada com cefaleia e tonturas que dura 1-3 dias, após um período de incubação de 2-3 semanas. A doença pode persistir durante 4-6 semanas e recaídas podem ocorrer anos mais tarde e, em alguns casos, pode existir bacteremia sem sinais clínicos (89, 101).

A doença da arranhadura do gato (DAG) tem sido associada à espécie *B. henselae* e, mais recentemente, *B. clarridgeiae* (102). A doença começa com uma pápula eritematosa no local da inoculação que aparece 3 a 10 dias após a inoculação, seguido por uma linfadenopatia regional 1 a 3 semanas depois, podendo durar até vários meses. Complicações como erupções cutâneas, hepatoesplenomegalia, lesões ósseas e linfadenite profunda pode ocorrer em 5% dos pacientes, mais frequentemente em crianças. Neuroretinite tem sido considerada a manifestação intraocular mais característica da DAG, geralmente caracterizada por edema unilateral do disco óptico associado a uma estrela macular parcial ou completa, que pode levar os pacientes a apresentarem leve a grave perda visual unilateral ou bilateral. Em hospedeiros imunocompetentes, normalmente não há bacteremia (83, 101, 103).

A bacteremia causada por *Bartonella* spp. pode causar endocardite, principalmente em pessoas com anormalidades pré-existentes nas válvulas cardíacas. Os agentes mais comuns identificados causando endocardite são *B. quintana* e *B. henselae*. No entanto, casos esporádicos também têm sido associados com *B. koehlerae*, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*, *B. vinsonii* subsp. *arupensis*, *B. elizabethae* e *B. alsatica* (89). *Candidatus* *Bartonella mayotimonensis* foi recentemente identificada na válvula aórtica de um paciente com endocardite infecciosa nos EUA (104).

Em pacientes imunodeprimidos, *B. quintana* e *B. henselae* estão relacionados com a angiomatose bacilar, que é uma lesão proliferativa vascular rara que pode afetar a pele, ossos e cérebro. Na pele, a lesão é caracterizada por múltiplos, nódulos císticos, se assemelhando ao sarcoma de Kaposi (103).

#### **1.4.5 Diagnóstico**

Os testes sorológicos continuam sendo uma importante ferramenta para o diagnóstico das bartoneloses. O teste de IFI é o padrão-ouro para o diagnóstico de

infecção presente ou passada. Entretanto, a sorologia para *Bartonella* é limitada pelas reações cruzadas com diferentes espécies, e também diferentes gêneros, como *Coxiella* e *Chlamydia* (19). Assim, a interpretação do resultado sorológico precisa ser cuidadosa e com base, preferencialmente, em soroconversão, utilizando amostras de sangue pareadas.

A utilização da PCR melhorou substancialmente a taxa de sucesso na detecção de *Bartonella* spp. A identificação molecular a partir de sequências gênicas específicas para as bartonelas é utilizada para detectar a infecção em tecidos ou no sangue (87).

Além das técnicas sorológicas e moleculares, o diagnóstico das infecções por *Bartonella* também pode ser confirmado por meio de exames histopatológicos dos linfonodos ou biópsia do tecido da pele, fígado, ou órgãos afetados e de isolamento da bactéria (7, 19).

## 1.5 Ehrlichioses e Anaplasmoses

As infecções animais causadas por *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. são conhecidas desde o início do século 20. Apesar dos casos compatíveis com anaplasmose em animais parasitados por carrapatos ocorrerem desde 1780 na Europa, a sua etiologia só foi conhecida 150 anos mais tarde, quando uma pequena bactéria, atualmente conhecida como *Anaplasma phagocytophilum*, exibindo tropismo para granulócitos, foi detectada em ovelhas infectadas (105, 106).

Quanto à espécie *Ehrlichia*, ela foi descrita pela primeira vez em cães por Donatien e Letosquard em 1935 na Argélia. Entretanto, os esforços de investigação voltados para a bactéria começaram em 1968, quando *Ehrlichia canis* foi identificada como a causa de uma doença fatal em centenas de cães utilizados para trabalhos militares no Vietnã (107, 108).

No entanto, o real interesse no estudo dos membros desta família surgiu após a descoberta de espécies patogênicas para a população humana (109-111). Atualmente sabe-se que os gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma* abrangem várias espécies que reconhecidamente causam doença humana e animal. Dentre elas estão: *Anaplasma marginale*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia muris*, *E. canis* e *Ehrlichia ruminantium* (Quadro 1.2) (112, 113).

**Quadro 1.2 - Espécies de *Ehrlichia* e *Anaplasma* causadores de doenças humanas e veterinárias.**

Gênero	Doença humana e animal	Células alvo	Vetor	Reservatório
<b>1- <i>Ehrlichia</i></b>				
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	Ehrlichiose monocítica humana (HME)	Monócitos / macrófagos	<i>Amblyomma</i>	Cervídeos
<i>Ehrlichia canis</i>	Ehrlichiosecanina, HME	Monócitos / macrófagos	Rhipicephalus	Canídeos
<i>Ehrlichia ewingii</i>	Ehrlichiosegranulocítica humana (HGE)	Neutrófilos	<i>Amblyomma Dermacentor</i>	Canídeos e Cervídeos
<i>Ehrlichia muris</i>	Ehrlichiosemonocítica Murino, possivelmente HME	Monócitos / macrófagos	Carrapatos ( <i>Ixodes persulcatus</i> , <i>Haemaphysalis flava</i> )	Roedores
<i>Ehrlichia ruminantium</i>	Pericardite em gado	monócitos / macrófagos	<i>Amblyomma</i>	Bovinos, ovinos e caprinos
<b>2- <i>Anaplasma</i></b>				
<i>Anaplasma marginale</i>	Anaplasrose bovina	eritrócitos	<i>Boophilus microplus</i> , <i>Dermacentor andersoni</i> e <i>Dermacentor variabilis</i>	Bovinos e Ruminantes selvagens
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Anaplasrose granulocítica humana (HGA)	Neutrófilos	Ixodídeos	Roedores, equinos, canídeos, felídeos, ovinos, bovinos e Cervídeos

Fonte: Adaptação de Ismail et al., 2010 (112)

### 1.5.1 Características Gerais – *Ehrlichia* spp. / *Anaplasma* spp.

Ambos os gêneros são constituídos por organismos pequenos, pleomórficos, Gram-negativos, obrigatoriamente intracelulares, pertencentes à família Anaplasmataceae, ordem Rickettsiales. *Anaplasma* e *Ehrlichia* infectam tipos específicos de células hospedeiras, tais como neutrófilos, monócitos e macrófagos, plaquetas, eritrócitos ou células endoteliais das veias, dependendo da espécie. As bactérias da família Anaplasmataceae se desenvolvem dentro de vacúolos intracitoplasmáticos das células hospedeiras. No interior destas células, um único microrganismo, denominado corpo elementar, se replica, dando origem a um grupamento de organismos no interior do citoplasma, semelhante a uma amora, pelo qual é reconhecido como mórula (7, 113, 114).

### 1.5.2 Transmissão

Um elemento essencial no ciclo de vida destas bactérias é desempenhado por vetores, que contribuem para a circulação bacteriana no ambiente. Os principais

vetores para *Anaplasma* e *Ehrlichia* são carrapatos, especialmente os gêneros *Ixodes*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* e *Amblyomma* (105).

As bactérias são mantidas em carrapato por via transestadial, mas não há transmissão transovariana, e assim, os carrapatos na fase larval emergentes não são infecciosos. *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. são capazes de causar uma infecção persistente no hospedeiro vertebrado, o que permite que eles sejam reservatórios da infecção. A gama de potenciais hospedeiros vertebrados de espécies pertencentes a estes dois gêneros não está completamente definida devido à falta de sinais clínicos em muitos hospedeiros reservatórios. Mamíferos como cães, ruminantes domésticos e selvagens, especialmente os cervídeos, são considerados os principais hospedeiros amplificadores para estas bactérias, mas pequenos mamíferos, como roedores também podem atuar como amplificadores para algumas espécies (111, 114).

### 1.5.3 Situação Epidemiológica das Ehrlichioses

No Brasil, estudos sorológicos e moleculares têm avaliado a ocorrência de espécies de *Ehrlichia* em cães, gatos, animais selvagens e seres humanos (108).

A ehrlichiose monocítica canina causada pela *E. canis* é a doença mais amplamente relatada no Brasil. Cães, infestados por carrapatos, oriundos de uma região semi-árida do estado da Paraíba, nordeste do Brasil apresentaram 34% e 25% de positividade para *E. canis* pelo teste de IFI e PCR, respectivamente (115). Além disso, o DNA de *E. canis* foi detectado em amostras de sangue de cães de seus carrapatos da espécie *R. sanguineus* no Rio Grande do Norte (116), e também em cães no Rio de Janeiro (117).

*Anaplasma phagocytophilum* foi detectada em cães e carrapatos utilizando a técnica de PCR em tempo real em 6,03% das amostras de cães de Seropédica, no Rio de Janeiro. Neste mesmo estudo, o DNA da mesma bactéria também foi detectado em carrapatos do gênero *Amblyomma* e *Rhipicephalus*(118). *Anaplasma phagocytophilum* também foi observado em aves selvagens, e estudos de soroprevalência encontraram evidências do contato deste agente com pequenos ruminantes no estado de Pernambuco (119, 120).

Em 2009, foi reportada pela primeira vez, através de métodos de biologia molecular, a infecção por *E. ewingii* em cães de Viçosa, Minas Gerais (121).

Em relação à infecção na população humana, apesar do agente etiológico ainda não ter sido identificado causando doença humana no Brasil, estudos mostraram evidência sorológica de ehrlichiose humana no estado de Minas Gerais. Ainda no Brasil, em um estudo realizado em 2001, foram identificados dois casos suspeitos de HME, e em outro realizado no período de 2001 a 2005, os autores detectaram a presença de anticorpos anti-*E. chaffeensis* em mais de cinquenta pacientes em Minas Gerais (64, 122, 123).

#### **1.5.4 Aspectos Clínicos**

Cinco membros da família Anaplasmataceae são conhecidos por causar doença humana, principalmente as espécies *E. chaffeensis*, *A. phagocytophilum* e *E. ewingii*. Leucócitos circulantes são os seus alvos, e as doenças correspondentes são frequentemente denominadas de acordo com o leucócito infectado juntamente com o gênero da bactéria. Assim, por exemplo, *E. chaffeensis*, que infecta os monócitos, causa a ehrlichiose monocítica humana (HME), e *A. phagocytophilum*, que infecta granulócitos, causa a anaplasmoze granulocítica humana (HGA). *E. ewingii*, como *A. phagocytophilum*, causa também a ehrlichiose granulocítica humana (HGE) (124, 125).

Ehrlichioses e anaplasmoses têm manifestações clínicas semelhantes, especialmente nas fases iniciais, incluindo febre, cefaleia, mialgias e mal-estar, trombocitopenia e leucopenia, além de níveis séricos elevados de enzimas hepáticas. No entanto, existem algumas diferenças entre as manifestações clínicas e a gravidade das doenças (7, 125). Os pacientes com HME ou HGE podem desenvolver uma síndrome semelhante ao choque tóxico ou séptico fulminante, além de envolvimento do sistema nervoso central (meningite ou meningoencefalite), particularmente indivíduos com imunossupressão. Menos complicações surgem em pacientes imunocomprometidos infectados com *E. ewingii* quando comparados com os infectados com *E. chaffeensis*. Em contraste, neuropatias periféricas, são mais comuns em pacientes com HGA e podem persistir por semanas ou meses (125, 126).

#### **1.5.5 Diagnóstico**

O diagnóstico das ehrlichioses e anaplasmoses pode ser confirmado através de vários métodos de laboratório. Estes testes incluem a detecção sorológica de



anticorpos específicos, a visualização de mórulas no sangue periférico ou leucócitos através de exames microscópicos, a detecção de DNA por PCR durante a infecção aguda, detecção direta das bactérias em amostras de tecidos pelo método de imunohistoquímica, e o isolamento de bactérias (112, 114).

O IFI é o teste padrão-ouro utilizado na detecção destas bactérias, porém, apesar da eficácia do diagnóstico, reações cruzadas com outros agravos podem causar resultados falso-positivos, incluindo febre maculosa, tifo, febre Q, brucelose, doença de Lyme, vírus de Epstein-Barr e doenças auto-imunes (126).

## **1.6 Rickettsia lato sensu e Quirópteros**

### **1.6.1 Rickettsia spp.**

O papel dos morcegos como portadores de *Rickettsia* spp. é desconhecido, considerando que existem poucas informações sobre a associação destas bactérias com os quirópteros não somente no Brasil mas também em outras partes do mundo.

Na literatura estrangeira, em um estudo realizado na Geórgia, os autores investigaram a presença de infecção natural por rickettsias em amostras de soro de 56 quirópteros da espécie *Eptesicus fuscus* (Vespertilionidae) e somente um (1,8%) morcego foi reativo com título de 1:256 para *R. conorii* e *R. rickettsii* (127). Um segundo estudo, realizado na Argentina, em 2011, amostras de baço, fígado, e pulmão de 30 morcegos da espécie *Tadarida brasiliensis* (Molossidae) capturados de áreas urbanas de Buenos Aires foram submetidos à análise molecular, visando à detecção do DNA de *Rickettsia* spp., mas todas as amostras foram negativas (128).

Quanto ao Brasil, é pertinente registrar que, Octávio Magalhães em sua monografia sobre febre maculosa, datada de 1952, já fazia referência aos quirópteros, mais especificamente, às três espécies de morcegos que foram por ele consideradas depositárias de rickettsias: (i) *Histiotus velatus*, (ii) *Carollia perspicillata*- reportado como *Hemiderma perspicillatum* – e (iii) *Desmodus rotundus* (24). Estudos experimentais visando testar a susceptibilidade dos morcegos das espécies *Histiotus velatus*, *Hemiderma perspicillatum* e *Desmodus rotundus* às rickettsias, inoculando-os com suspensões do sistema nervoso central (SNC) de cobaias infectadas, foram previamente realizados por Magalhães e Rocha em 1943 e os autores observaram que uma cepa de *R. rickettsii* foi patogênica para os

morcegos *H. velatus* e *H. perspicillatum*, causando lesões e levando-os a morte, com exceção de *D. rotundus* que, embora tivesse apresentado lesões, não morreu. Em uma segunda etapa do estudo, novas cobaias foram inoculadas com suspensões do SNC das três espécies de morcegos infectados e das glândulas salivares do morcego da espécie *D. rotundus*. Como resultado, as cobaias inoculadas apresentaram lesões e foram subsequentemente submetidas à eutanásia. As cobaias inoculadas com a suspensão das glândulas salivares desenvolveram esplenomegalia, mas as tentativas de passagem da infecção falhou (129).

Após um silêncio de mais de 70 anos, mais recentemente, um inquérito sorológico foi realizado em quirópteros capturados entre 2006 e 2008 na cidade de São Paulo visando pesquisar a infecção por *Rickettsia* spp. As 451 amostras foram testadas por IFI utilizando antígenos derivados de espécies do grupo da febre maculosa e do grupo ancestral. De 20 espécies de morcegos divididas em três famílias diferentes (Molossidae, Vespertilionidae, e Phyllostomidae), 46 animais mostraram-se reativos a, pelo menos, um antígeno de rickettsias do grupo da febre maculosa, com títulos que variavam de 64 a 256. Nenhuma amostra foi reativa para rickettsia do grupo ancestral. Este resultado sugere que estes animais tiveram contato com RGFM e que podem estar infectados por estas bactérias (15).

Não somente são poucos os estudos sobre rickettsias em quirópteros como também é pouco discutido o possível papel de carrapatos moles (argasídeos) como vetores de *Rickettsia* spp. para morcegos, e os riscos que eles representam para a saúde pública. Assim, é importante registrar que em Iowa, EUA, dos 31 carrapatos argasídeos da espécie *Carios kelleyi* que foram coletados em área residencial e testados para presença de DNA de *Rickettsia* spp., 28 (90,3%) foram PCR-positivos e destes, 27 demonstraram pertencer ao grupo da febre maculosa. O DNA de rickettsia foi detectado em ninfas, adultos fêmeas e machos, além de três carrapatos que mudaram de fase evolutiva no laboratório. Este último dado associado com a observação de que o DNA foi também detectado em cinco lotes de ovos postos por carrapatos no laboratório sugerem que o agente seja mantido tanto pela via transtadial quanto pela via transovariana em carrapatos *C. kelleyi* (10).

Seguido a este estudo, em 2006, uma análise experimental, utilizando as larvas provenientes de ovos postos pelos carrapatos do estudo de Loftis e colaboradores (2005), visou analisar se estas bactérias poderiam ser transmitidas pelo carrapato através da alimentação em cobaias. Os resultados obtidos mostraram

que as cobaias desenvolveram um título pico de 1:32 contra *R. rickettsii* e nenhum DNA de *Rickettsia* foi detectado nos tecidos estudados (127).

Em 2010, carrapatos da espécie *Argas vespertilionis*, um carrapato associado com morcegos na Europa, África e Ásia e que tem sido relatado parasitando seres humanos, foram coletados no interior de uma residência infestada de morcegos na França. Cinco carrapatos foram testados utilizando ferramentas moleculares para detecção de RGFM e como resultado, *Rickettsia* foi detectada em três destes carrapatos. A análise das sequências gênicas geradas demonstrou que *Rickettsia* sp. identificada era muito próxima a *R. africae*, podendo se tratar de uma nova subespécie (14).

### **1.6.2 *Coxiella burnetii***

São raros os estudos sobre a presença de *C. burnetii* em quirópteros (13, 14, 130-132). Em Caiena, na Guiana Francesa, Gardon e colaboradores, visando determinar os fatores de risco associados à infecção por *C. burnetii* e identificar os seus possíveis reservatórios, analisaram amostras de animais domésticos (ovinos, caprinos, suínos, gatos e cães), e silvestres (roedores, marsupiais, aves, anfíbios e morcegos) em localidades próximas a regiões onde casos humanos de febre Q ocorreram. Todas as amostras de sangue e vísceras dos animais silvestres foram submetidas, respectivamente, a testes sorológicos e testes moleculares. De 875 amostras, 86 pertenciam a morcegos. Somente 1,7% dos bovinos e 12,3% dos cães apresentaram anticorpos para *C. burnetii*, nenhum quiróptero apresentou sororeatividade. Além disso, o DNA de *C. burnetii* não foi detectado em nenhuma das vísceras dos morcegos (130).

Seguido a este estudo, em 2013, após um surto de febre Q em uma área residencial em Caiena, amostras de *swab* vaginal foram coletadas de animais que viviam na região, incluindo cabras, ovelhas, morcegos e gambás, além de *swab* contendo material da cloaca de pássaros, iguanas e lagartixas. Todas as amostras foram negativas para *C. burnetii* por metodologia de detecção molecular. Além disso, ruminantes mantidos perto da área do surto também foram negativos quando submetidos à sorologia para o agente. Em continuidade ao inquérito, em 2014, na região do surto, uma preguiça (*Bradypus tridactylus*) morta acidentalmente foi encontrada na estrada próxima da residência de um dos pacientes com febre Q. Amostras de fezes, vísceras e carrapatos foram coletadas e o DNA foi extraído e

submetido à PCR. As amostras de fezes, baço e 14 dos 16 (88%) carrapatos foram PCR-positivos para *C. burnetii*. Todas as sequências obtidas, após análise, foram idênticas ao genótipo de *C. burnetii* que circulava em Caiena. O relato de contato de pacientes com as preguiças e presença destes carrapatos na pele dos animais, sugere que as picadas de carrapatos ou aerossóis de fezes de carrapatos e das preguiças possam ser a fonte de transmissão da bactéria neste evento (131). Além disso, um estudo realizado no ano de 2014 na França comparou as manifestações clínicas e resposta imune entre os pacientes com Febre Q de Caiena, na Guiana Francesa, e pacientes da França metropolitana. Neste estudo foi possível concluir que a Febre Q em Caiena apresentava uma forma grave de pneumonia aguda e uma resposta sorológica mais forte do que a observada em pacientes da França metropolitana, sugerindo exposição a um número elevado de inóculos bacterianos e/ou a circulação de uma estirpe específica de *C. burnetii* na região (133). A partir destes estudos é possível concluir que a epidemiologia da febre Q pode se apresentar com muitas vertentes além de ser muito mais complexa do que o esperado e que nem sempre existe uma ligação clara dos casos de febre Q com as fontes clássicas de contaminação por *C. burnetii*, os ruminantes domésticos.

Em Queensland, Austrália, em 2014, buscando investigar o potencial de exposição dos seres humanos a *C. burnetii*, amostras provenientes de uma grande diversidade de animais domésticos e silvestres nativos, dentre eles, morcegos do gênero *Pteropus* foram submetidas a testes moleculares. O DNA foi obtido a partir de 90 *pools* de urina coletadas em colônias de morcegos e como resultado, os autores identificaram 7/90 (7,8%) *pools* positivos para *C. burnetii*. Curiosamente, também foi encontrada uma alta incidência (11,6%) de DNA de *C. burnetii* em amostras de sangue de cavalos coletadas nas regiões correspondentes às áreas onde os *pools* dos morcegos foram positivos (13). A presença de *C. burnetii* nestas amostras de urina é um indicativo do papel potencial destes animais enquanto fonte de infecção para os seres humanos e outras espécies animais, principalmente se considerarmos que uma das principais características de *C. burnetii* é a formação de esporos e conseqüente contaminação por exposição a aerossóis.

O papel dos carrapatos relacionados aos morcegos como vetores/reservatórios para *C. burnetii* também é desconhecido. Em 1966, Zhmaevae colaboradores detectaram *C. burnetii* em carrapatos *Argas vespertilionis* coletados no sul do Cazaquistão (14, 132). Em contraponto, na França, Socolovschi e

colaboradores também avaliaram o papel destes argasídeos buscando o DNA de *C. burnetii* e nenhum dos cinco carrapatos testados foi positivo (14).

### 1.6.3 *Bartonella* spp.

O aumento no reconhecimento de morcegos como reservatórios naturais de muitos patógenos emergentes tem atraído atenções para o estudo destes mamíferos. Várias pesquisas recentes têm relatado morcegos com infecção por *Bartonella* em diferentes partes do mundo (11, 12, 134-142).

Concannon e colaboradores, utilizando como ferramenta a identificação molecular do gene *gltA*, encontraram 8% (5/60) das amostras de sangue coletadas positivas para *Bartonella* spp. demonstrando que os morcegos podem estar infectados com *Bartonella* na Inglaterra. Os cinco morcegos positivos pertenciam a quatro espécies diferentes e a análise das sequências gênicas das bartonelas encontradas comprovou a semelhança delas, resultando num agrupamento em um ramo distinto quando comparado com outras sequências do gene *gltA* de *Bartonella* depositadas no GenBank (134).

Prevalências mais altas de *Bartonella* spp. em morcegos foram relatadas em outros países. No Quênia, entre espécies de morcegos frugívoros e insetívoros, 30,2% foram *Bartonella* positivos por amplificação e sequenciamento do gene *gltA* (12), enquanto na Guatemala, 33% dos morcegos pesquisados no ano de 2009 foram PCR-positivos para *Bartonella* spp. (136). Em Taiwan entre os anos de 2009-2010, de um total de 54 morcegos coletados, seis (11%) da espécie *Miniopterus schreibersii* foram PCR positivos para *Bartonella* spp. (142). Bai e colaboradores testaram 112 morcegos de 19 espécies para infecção por *Bartonella* na Amazônia Peruana. Neste estudo, o DNA de *Bartonella* foi encontrado em 24,1% dos morcegos. A análise filogenética do gene *gltA* demonstrou algumas variantes idênticas às anteriormente descritas na Guatemala por Bai e colaboradores em 2011 (11).

No estudo desenvolvido na Nigéria, onde morcegos são utilizados como alimento e para fins de rituais culturais, a prevalência de animais infectados foi maior, considerando que o DNA de *Bartonella* spp. foi detectado em 76 de 148 amostras (51,4%) de sangue dos morcegos (141).

Embora não haja evidência sugerindo que as espécies de *Bartonella* associadas com morcegos possam causar doenças nos seres humanos, em 2012,

na Finlândia, um estudo isolou e identificou, por PCR, cepas de *Bartonella* no morcego insetívoro *Myotis daubentonii*, cepas estas semelhantes à cepa de *Candidatus Bartonella mayotimonensis* detectada em tecido de válvula aórtica de um paciente com endocardite nos Estados Unidos (EUA) (104, 135). Após este evento, um inquérito feito na região com a mesma espécie de morcego revelou uma prevalência de 37%, apontando esta espécie como um possível reservatório de *Bartonella* spp. na Finlândia (137). Prevalências semelhantes foram encontradas na Costa Rica, onde o DNA de *Bartonella* foi detectado em 33,3% das amostras testadas (139).

No Vietnã, em 2013, 35% das amostras de morcegos foram positivas para presença do DNA de *Bartonella* spp. Neste último estudo foi observado que a prevalência da infecção por *Bartonella* foi maior em morcegos insetívoros ou carnívoros, em comparação com os morcegos frugívoros (138).

Em Porto Rico, das 51 amostras de morcegos testadas, 18% foram PCR positivas para *Bartonella* spp. (140).

Uma característica comum a todos os estudos citados anteriormente é que quando feita análise filogenética das bartonelas encontradas nos morcegos, estes isolados formaram um ramo independente, longe de outras cepas atualmente conhecidas de *Bartonella* (11, 12, 135-137, 139-142).

As espécies descritas na literatura de *Bartonella* spp. dependem de um hospedeiro mamífero e artrópodes vetores para manutenção do ciclo. Tem-se especulado que os morcegos e seus ectoparasitas poderiam desempenhar estas funções. Carrapatos da família Argasidae e outros ectoparasitas comumente encontrados em morcegos ou em seu habitat foram encontrados infectados com *Bartonella* spp. Neste contexto, em Iowa, EUA, *Carios kelleyi*, foi PCR positiva para *Bartonella*, e a sequência amplificada foi 100% homóloga à espécie *B. henselae* (10).

Em relação a outros insetos hematófagos que parasitam morcegos, *Bartonella* spp. foi identificada nas famílias de dípteros Nycteribiidae e Streblidae, em estudos na Nigéria (29,2%), em Gana (66,4%) e em Costa Rica (52,7%). Nos EUA, *Bartonella* spp. foi identificada em uma única amostra de *Trichobius major* (Diptera: Streblidae) e *Cimex adjunctus* (Hemiptera: Cimicidae). Ainda nos EUA, o DNA da bactéria foi detectado em uma pulga da espécie *Sternopsylla texanus* coletada de um morcego da família Molossidae (139, 141, 143-145).

Em 2012, uma análise filogenética analisou a relação evolutiva entre as bartonelas encontradas em dípteros parasitas de morcegos e as bartonelas encontradas em morcegos depositadas no GenBank. As análises gênicas apontaram para uma associação entre estas bartonelas com os ectoparasitas e seus hospedeiros, apoiando a ideia que estas moscas potencialmente possam atuar como vetores para as bartonelas. Além disso, no mesmo estudo foram encontrados dípteros fêmeas e suas pupas infectados com *Bartonella* spp., sugerindo transmissão vertical da bactéria, uma vez que nesses dípteros o desenvolvimento larval ocorre na câmara genital da fêmea que, por sua vez, deixa o hospedeiro para depositar a pré-pupa nas paredes do abrigo (9).

Visto que membros da família Cimicidae e Nycteribiidae são conhecidos por serem vetores de protozoários entre os morcegos e que família Streblidae, mesmo sem estar associada com transmissão de agentes, apresenta o hábito de se alimentar repetidamente em vários morcegos, voando de um para o outro, em um mesmo abrigo, não é possível descartar a possibilidade destes vertebrados atuarem como vetores mecânicos de patógenos, mantendo-os dentro de uma mesma colônia de morcegos (143). No entanto, é imprescindível registrar que, nos estudos citados, não se pode afirmar se a presença de *Bartonella* spp. nos artrópodes possa ser consequente ao DNA residual de uma refeição prévia ou se está associada com infecção ativa. A competência vetorial destes artrópodes não é conhecida, reforçando que a relação das bartonelas com os morcegos e seus ectoparasitas precisa ser melhor estudada.

No Brasil, até agora, não foram relatados estudos específicos sobre morcegos associados às bartonelas.

#### **1.6.4 *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp.**

Membros da família Anaplasmataceae foram pesquisados em morcegos na cidade de Buenos Aires, Argentina. Trinta quirópteros da espécie *Tadarida brasiliensis* foram submetidos à PCR. Apesar de três morcegos terem sido positivos para o gene 16S rRNA da família Anaplasmataceae, todas as sequências apresentaram 100% de identidade com uma espécie do gênero *Neorickettsia*. Nenhuma amostra foi positiva para *Ehrlichia* spp. ou *Anaplasma* spp. (128).

No Brasil, vinte e três amostras de sangue do morcego nectarívoro *Glossophaga soricina* (Phyllostomidae) foram coletadas na localidade de Pirizal,

Pantanal- Mato Grosso do Sul e testadas para a presença de membros do gênero *Ehrlichia*, *Anaplasma* e *Neorickettsia*. Nenhuma amostra foi positiva após os testes moleculares (8).

Na França, cinco carrapatos coletados no sótão de uma residência onde havia relato de infestação por morcegos, foram testados por PCR para os genes 16S rRNA e *gltA* específicas para *Ehrlichia* e *Anaplasma*. Os resultados foram positivos para três carrapatos. A análise filogenética das sequências geradas mostrou que estes agentes encontrados pertencem ao gênero *Ehrlichia* no grupo *E. canis*, embora distintos das outras espécies de *Ehrlichia* descritas. Neste estudo, um dos carrapatos positivos para *Ehrlichia* estava co-infectado com *Rickettsia* spp.(14).



## 2 JUSTIFICATIVA

Os morcegos têm chamado a atenção da comunidade científica nos últimos tempos por serem hospedeiros importantes para doenças humanas emergentes. São reconhecidos por albergarem e transmitirem diversos agentes infecciosos de importância para saúde pública como o vírus rábico, coronavírus, histoplasma, entre outros. Nas últimas décadas estudos têm apontado os quirópteros também como potenciais hospedeiros de proteobactérias pertencentes aos gêneros *Rickettsia*, *Bartonella* e a espécie *C. burnetii* com a participação de diferentes espécies de artrópode vetor e de vertebrados amplificadores em ciclos zoonóticos complexos nos quais o homem pode ser incluído acidentalmente (10, 13, 14, 136, 143, 146).

Fonte potencial de muitas infecções zoonóticas, os morcegos diferem de outros reservatórios silvestres pela sua organização social frequentemente gregária, sua capacidade de voar, sua expectativa de vida longa e por atuarem como hospedeiros de ligação, transmitindo o agente infeccioso, na maioria das vezes, indiretamente aos seres humanos, características que, associadas com o seu crescente contato com o homem, aumentam os riscos de transmissão de agentes infecciosos (3-5).

Em vista do exposto e considerando que a ordem Chiroptera é um táxon de mamífero com hábitos diversificados e com características que comprovadamente garantem um papel importante na transmissão de doenças humanas, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos que elucidem a possível participação dos quirópteros na epidemiologia das doenças causadas por rickettsias no Brasil.

Assim, este estudo molecular pioneiro, com base nas evidências já existentes na literatura científica (11, 12, 15, 128, 135-137, 139-142) é justificado, não somente pela proposta de se realizar um diagnóstico de situação em três estados com notificação de casos de febre maculosa, febre Q e bartoneloses, mas também pela possibilidade de se contribuir para a ampliação no conhecimento sobre um grupo de animais pouco estudado, de tal forma que sirva de referência para estudos futuros em outras áreas do Brasil, onde o aumento do número de morcegos tem sido registrado.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo Geral

Investigar a presença de infecção por *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii*, *Bartonella* spp., *Anaplasma* e *Ehrlichia* spp. em morcegos capturados em diferentes regiões do Brasil.

### 3.2 Objetivos Específicos

- Investigar a presença do DNA de *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii*, *Bartonella* spp., *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* spp. em amostras de vísceras de morcegos, utilizando ferramentas moleculares;
- Caracterizar molecularmente as proteobactérias identificadas nestes animais;
- Analisar as sequências obtidas nas amostras de animais, comparando-as com as sequências homólogas disponíveis no GenBank;
- Identificar taxonomicamente os ectoparasitas coletados dos quirópteros.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo epidemiológico descritivo seccional que visa verificar a presença de bactérias dos gêneros *Rickettsia*, *Coxiella*, *Bartonella*, *Ehrlichia* e *Anaplasma* em morcegos capturados por amostragem de conveniência durante expedições independentes em diferentes regiões do Brasil com relato de rickettsioses.

### 4.2 Considerações Éticas

O presente estudo está inserido em dois projetos abaixo discriminados:

- 1) Projeto intitulado “Morcegos (Mammalia, Chiroptera) como indicadores de integridade biótica em uma área de tensão antrópica no Maciço da Pedra Branca” coordenado pelo Dr. Ricardo Moratelli Mendonça da Rocha, de acordo com a licença (Nº 19037-1) concedida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA)/ Coordenação Geral de Fauna (CGFAU) e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)/FIOCRUZ, conforme protocolo N° P.62/11-3 (LW-68/12). (Anexo 1)
- 2) Projeto intitulado “Rede Bio M.A. inventário: padrões de diversidade biogeografia e endemismos de espécies de mamíferos, aves, anfíbios drosófilos e parasitas na Mata Atlântica”, coordenado pelo Dr. Rui Cerqueira Silva da Universidade Federal do Rio de Janeiro, de acordo com a licença (Nº 043/2014) concedida pela Fundação do Meio Ambiente – FATMA, órgão gestor das Unidades de Conservação Estaduais do Estado de Santa Catarina e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)/FIOCRUZ, conforme protocolo N° P.42/12-1 (LW-81/12). (Anexo 2)

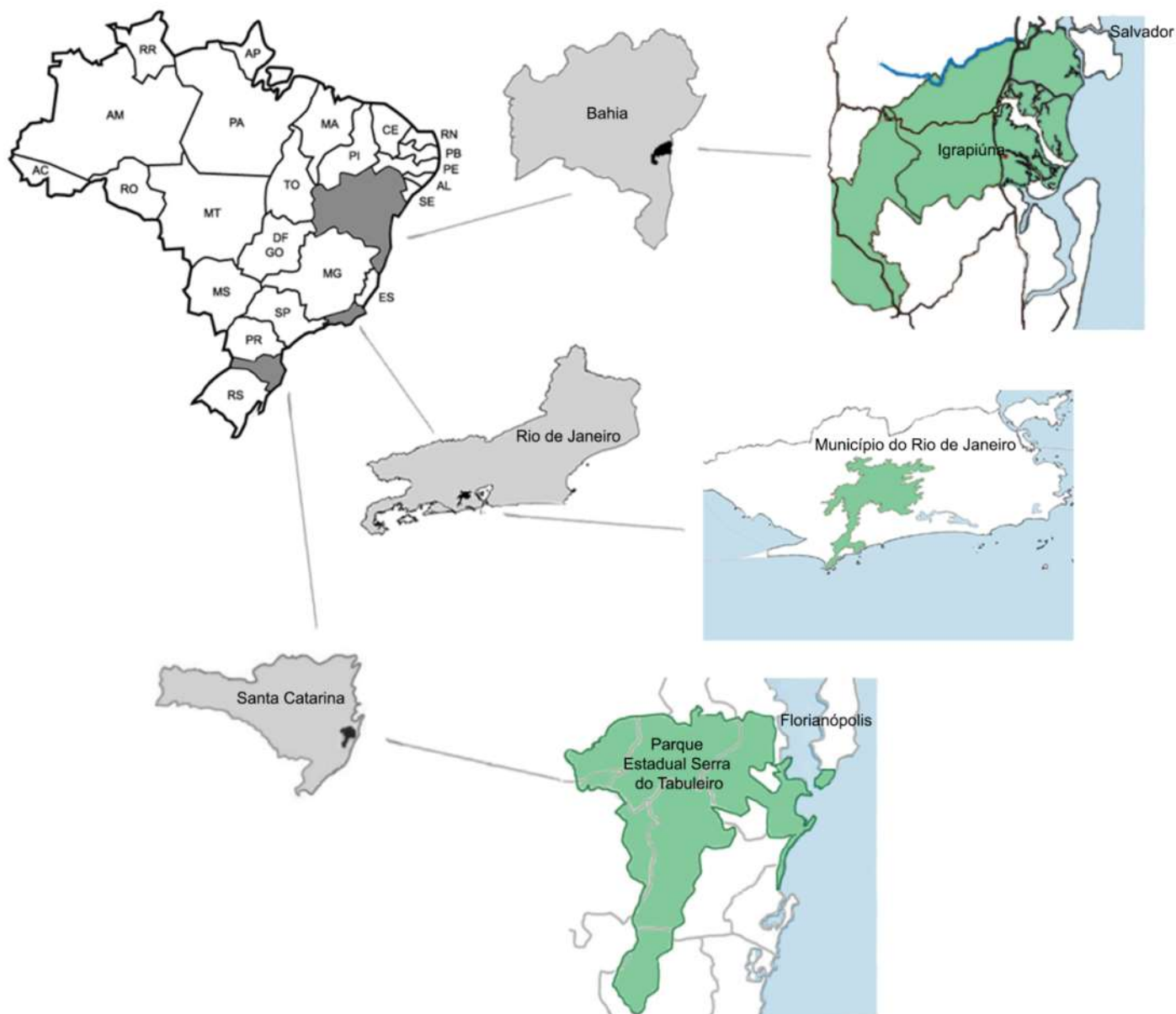
### 4.3 Local do Estudo

Os animais foram capturados em três regiões do Brasil (Figura 4.1):

- 1- Região Metropolitana do Rio de Janeiro, no bairro de Jacarepaguá, junto ao Maciço da Pedra Branca (22°56'22.9"S 43°24'12.2"W);
- 2- Município de Igrapiúna, Região Baixo Sul da Bahia, em uma região que se encontra inserida em uma Área de Proteção Ambiental (APA) denominada APA do Pratigi (13°50'43.3"S 39°16'17.0"W)
- 3- Parque Estadual da Serra do Tabuleiro (PEST), situado na região centro-leste do estado de Santa Catarina (27°44'30.8"S 48°48'26.7"W).

Todas as regiões de captura englobam áreas florestais formadas pelo bioma Mata Atlântica. Apesar da região do município fluminense incluída no estudo ser a mais antropizada, por estar circundada por um grande centro urbano, as demais áreas estão associadas ao turismo ecológico.

As capturas, que ocorreram de forma intermitente entre dezembro de 2013 e maio de 2015, foram realizadas em expedições independentes, integradas aos programas de estudo da biodiversidade, em colaboração com equipes do Campus Fiocruz Mata Atlântica/RJ e da Rede PPBio Mata Atlântica.



**Figura 4.1** - Mapa representativo das três regiões de captura de quirópteros. Maciço da Pedra Branca, Jacarepaguá/RJ, Município de Igrapiúna – APA do Pratigi/BA e Parque Estadual da Serra do Tabuleiro (PEST)/ SC.

(Mapa elaborado em colaboração com Alexandro Guterres – doutorando LHR)

#### 4.4 Captura dos Animais e Metodologia de Campo

Para captura dos quirópteros, foram utilizadas redes de neblina abertas por seis horas a cada noite, em bordas de mata ou em trilhas pré-existentes (Figura 4.2). Uma vez capturados, os animais foram revistados em busca de ectoparasitas.



**Figura 4.2** - Captura de quirópteros utilizando redes de neblina na localidade da APA do Pratigi - BA

Os animais capturados foram processados em um laboratório de campo e as amostras coletadas segundo normas estritas de biossegurança, com toda a equipe paramentada com equipamentos de nível de biossegurança 3 (filtros motorizados, máscaras com pressão positiva e demais acessórios) que garantem a segurança dos membros da equipe contra agentes transmitidos por aerossóis.

Na base laboratorial de campo, os animais foram anestesiados, seguindo os procedimentos preconizados (147), para coleta dos dados bionômicos (peso corpóreo e medidas de corpo e cauda) e aos relacionados ao sexo e à atividade reprodutiva. Todos os espécimes capturados foram submetidos à coleta de sangue, por punção cardíaca, com o uso de seringas de 1-3 ml de acordo com o tamanho do animal. Após a eutanásia, por exanguinação (sangria total), amostras de órgãos e vísceras dos espécimes (rim, fígado, baço, pulmão e coração) foram acondicionadas em nitrogênio líquido para pesquisa de infecção bacteriana, através de diagnóstico molecular e sequenciamento do DNA bacteriano.

A identificação taxonômica foi feita baseada na morfologia e morfometria dos animais capturados e realizada em colaboração com a equipe do campus Fiocruz Mata Atlântica para os animais capturados na localidade do Rio de Janeiro e pela equipe da Rede PPBio na localidade de Santa Catarina e Bahia.

Todos os animais coletados foram taxidermizados e seus esqueletos preparados para serem depositados como material testemunho em coleções científicas de universidades em cada região de estudo.

*Ectoparasitas* - carrapatos, pulgas, ácaros e piolhos retirados dos animais foram acondicionados em álcool 70% para posterior caracterização taxonômica, a partir da utilização da chave para a fauna ixodológica brasileira, com a colaboração do Dr. Jairo Dias Barreira do Departamento de Parasitologia/UNIRIO.

#### **4.5 Metodologia Laboratorial**

As amostras coletadas foram armazenadas no Laboratório de Hantavírus e Rickettsiose (LHR)/FIOCRUZ- RJ em freezer -80°C. Os procedimentos taxonômicos dos quirópteros foram realizados em colaboração com os grupos Fiocruz Mata Atlântica e PPBio Mata Atlântica, sob coordenação de Dr. Ricardo Moratelli, Dr. Luiz Flamarion e Dr. Rui Cerqueira.

A manipulação e processamento do material biológico dos animais coletados foram realizados em instalações de nível de biossegurança 3 (NB3), na Plataforma NB3/DATT/IOC, localizado no Pavilhão Hélio e Peggy Pereira/FIOCRUZ- RJ, durante a etapa inicial de extração dos ácidos nucleicos.

Após inativação das amostras, as demais etapas do processamento foram realizadas no LHR, que tem disponíveis instalações de nível de biossegurança 2 (NB2).

##### **4.5.1 Procedimento de Extração de DNA**

Amostras de baço dos quirópteros foram submetidas à extração de DNA utilizando o kit comercial (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen®) a partir de 10 mg de tecido, previamente criopreservado, que foram excisados, após atingirem a temperatura ambiente. A esse fragmento foram adicionados 180 µl de tampão ATL (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen®) e 20µl de proteinase K. Após serem homogeneizados no vortex por 15 segundos, esses componentes foram incubados a 56°C no banho-maria *overnight* utilizando Thermomix®, equipamento programado para homogeneizar as amostras por vortex num período de 2 minutos com intervalos de 20 minutos. No dia seguinte foi adicionado um volume de 200µl de tampão AL (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen®). A amostra foi submetida à incubação a 70°C durante 10 minutos. Após sofrerem centrifugação rápida, 200µl de etanol (96-100%) foram adicionados e homogeneizados durante 15 segundos, seguida por uma nova

centrifugação da amostra. A mistura subsequentemente foi aplicada na coluna de filtragem QIAamp Spin, centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto e o fluido do coletor foi desprezado. Um volume de 500µl do tampão de lavagem AW1 foi adicionado e, após centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto, o filtrado foi novamente desprezado. Foram adicionados 500µl do tampão de lavagem AW2 e, neste momento, a amostra sofreu centrifugação a 14.000 rpm durante 3 minutos. O filtrado foi desprezado e a coluna subsequentemente foi transferida para um microtubo de 1,5 ml e 50 µl de tampão de eluição AE foram adicionados. A amostra foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto. Repetiu-se este último passo (adição de AE, incubação e centrifugação). A coluna QIAamp Spin foi descartada e o produto da extração foi armazenado no congelador -20°C.

Outras amostras dos quirópteros, como fígado, pulmão, coração e rim, foram complementarmente submetidas à extração do DNA diante da necessidade de repetição do procedimento, especialmente, por conta de um resultado inconclusivo e da indisponibilidade de mais tecido esplênico.

#### 4.5.2 Procedimento de PCR Convencional

As amostras de baço e eventualmente de outra víscera foram testadas para a presença de DNA bacteriano, utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) descritos no Quadro 4.1. Para detecção de DNA para *Rickettsia* e *Bartonella* foi utilizado *primers* para o gene *gltA* específico para cada gênero. Para a detecção de *C. burnetii*, o gene alvo foi *htpAB* derivados de uma região transposon-like repetitiva do genoma desta bactéria. Para *Ehrlichia* e *Anaplasma*, o gene alvo foi o 16S rRNA da família Anaplasmataceae.

Com o objetivo de aumentar a sensibilidade e especificidade da PCR para pesquisa de *C. burnetii* e *Rickettsia* spp., uma reação foi realizada utilizando um segundo par de *primers*(*nested*) especificamente desenhado no LHR (Quadro 4.1).

A amplificação *in vitro* do DNA foi realizada em um volume final de 25 µl. A reação continha 2,5 µl de Tampão PCR 10X, 0,6 µl de cada primer 10 mM, 0,75-4µlMgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0,25 µl de desoxinucleotídeos (20mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato), 0.1 µl de Platinum Taq DNA polimerase (5U/µl Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e água livre de nucleases (Promega, Madison, WI, EUA). A quantidade de DNA da amostra variou de acordo com o primer utilizado.



Em seguida, a reação de amplificação foi realizada em termociclador 9700 (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA). As etapas de desnaturação, anelamento e extensão foram adaptadas para cada primer.

**Quadro 4.1** - Set de *primers* utilizados para detecção de DNA de *Rickettsia lato sensu*

Agente	Primers	Seqüências (5' – 3')	Tamanho do fragmento	Temperatura de anelamento	Referência
<i>Coxiella burnetii</i>	QBT-1	TATGTATCCACCGTAGCCAGC	687 pb	60°C	(148)
	QBT-2	CCCAACAACACCTCCTTATTC			
	<sup>2</sup> QBT N3+ <sup>1</sup>	AAGCGTGTGGAGGAGCGAACC	440 pb	66°C	—
	<sup>2</sup> QBT N4-1	CTCGTAATCACCAATCGCTTCGTC			
<i>Ehrlichia spp / Anaplasma spp.</i>	EHR16SD	GGTACCYACAGAAGAAGTCC	345 pb	55°C	(149)
	EHR16SR	TGCACTCATCGTTTACAG			
<i>Bartonella spp.</i>	gltA F1	GCTATGTCTGCVTTCTATCAYGA	731 pb	58°C	—
	gltA R1	AGAACAGTAAACATTTTCN GTHGG			
<i>Rickettsia spp.</i>	<sup>2</sup> CS F1	CATCCTATGGCTATTATGCTTGC	885 pb	55°C	—
	<sup>2</sup> CS R1	TATACTCTCTATG(T/A)AC(A/G)T(A/G)ACC			
	<sup>2</sup> CS F2 <sup>1</sup>	CTTACCGCTATTAGAATGATTGC	572 pb	63°C	—
	<sup>2</sup> CS R2 <sup>1</sup>	GAGCGA(T/G)AGCTTCAAG(T/C)TCTAT			

<sup>1</sup>Nested PCR / <sup>2</sup>Seqüências nucleotídicas desenvolvidas no Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses, ainda em fase de publicação.

#### 4.5.3 Eletroforese em Gel de Agarose

Para confirmar a amplificação, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com solução de GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, USA). Foi usado como marcador de peso molecular *100bp DNA ladder* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e os produtos amplificados foram visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta e registrados em sistema digital para documentação de gel (Carestream GelLogic System).

#### 4.5.4 Sequenciamento e Análise Filogenética

Os produtos amplificados no tamanho de fragmento esperado foram purificados utilizando o kit *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification*® (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante. Para a reação de sequenciamento foi utilizado o *kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction*® v3.1 e *kit BigDye*® X-Terminator Purification (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

As sequências de nucleotídeos e seus cromatogramas foram analisados utilizando programa MEGA 6.0. Uma sequência consenso foi estabelecida e as divergências de nucleotídeos entre as sequências foram esclarecidas pela análise dos cromatogramas do sequenciamento. Para inferência filogenética, as sequências obtidas no sequenciamento e as sequências recuperadas no banco de dados GenBank foram alinhadas pela ferramenta MUSCLE (150) implementado no Programa MEGA 6.0. A árvore filogenética foi estimada pelo método de Máxima Verossimilhança e o melhor modelo de evolução de sequências foi determinado como Tamura 3-parametros + gamma (T92+G) a partir do programa MEGA 6.0. Foram calculados valores de *bootstrap* com 1.000 repetições.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 População de Estudo

De um total de 119 morcegos capturados, 44 foram de Jacarepaguá/RJ (Tabela 5.1), 47 na APA do Pratigi/BA (Tabela 5.2) e 28 no PEST/SC (Tabela 5.3).

Os quirópteros pertenciam às famílias Vespertilionidae e Phyllostomidae, divididos em 15 gêneros e 21 espécies. Por ordem de abundância, as espécies envolvidas neste estudo foram: *Carollia perspicillata* (28,5%), *Desmodus rotundus* (12,6%), *Artibeus lituratus* (11,8%), *Sturnira lilium* (10%), *Artibeus fimbriatus* (6%), *Rhinophylla pumilio* (5,9%), *Artibeus planirostris* (4,2%), *Dermanura cinerea* (3,4%), *Phyllostomus discolor* (3,4%), *Artibeus obscurus* (1,7%), *Glossophaga soricina* (1,7%), *Myotis nigricans* (1,7%), *Sturnira tildae* (1,7%), *Vampyressa pusilla* (1,7%), *Anoura caudifer* (0,8%), *Chiroderma doriae* (0,8%), *Lonchophylla peracchii* (0,8%), *Micronycteris minuta* (0,8%), *Micronycteris* sp. (0,8%), *Phyllostomus hastatus* (0,8%), *Trinycteris nicefori* (0,8%).

**Tabela 5.1** - Identificação dos quirópteros capturados na região de Jacarepaguá/RJ nos meses de dezembro/ 2013, março, maio e setembro/ 2014

<b>N° Campo</b>	<b>Gênero</b>	<b>Espécie</b>	<b>Sexo</b>
RM476	<i>Myotis</i>	<i>nigricans</i>	Fêmea
RM477	<i>Artibeus</i>	<i>lituratus</i>	Macho
RM504	<i>Artibeus</i>	<i>lituratus</i>	Fêmea
RM505	<i>Desmodus</i>	<i>rotundus</i>	Fêmea
RM506	<i>Sturnira</i>	<i>lilium</i>	Macho
RM507	<i>Sturnira</i>	<i>tildae</i>	Macho
RM508	<i>Desmodus</i>	<i>rotundus</i>	Macho
RM509	<i>Sturnira</i>	<i>tildae</i>	Macho
RM510	<i>Desmodus</i>	<i>rotundus</i>	Fêmea
RM511	<i>Glossophaga</i>	<i>soricina</i>	Fêmea
RM512	<i>Desmodus</i>	<i>rotundus</i>	Macho
RM513	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Fêmea
RM514	<i>Artibeus</i>	<i>lituratus</i>	Fêmea
RM515	<i>Artibeus</i>	<i>fimbriatus</i>	Fêmea
RM516	<i>Sturnira</i>	<i>lilium</i>	Macho
RM517	<i>Desmodus</i>	<i>rotundus</i>	Fêmea
RM518	<i>Glossophaga</i>	<i>soricina</i>	Fêmea
RM519	<i>Micronycteris</i>	<i>minuta</i>	Fêmea
RM520	<i>Desmodus</i>	<i>rotundus</i>	Macho
RM521	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Macho
RM522	<i>Desmodus</i>	<i>rotundus</i>	Macho
RM523	<i>Desmodus</i>	<i>rotundus</i>	Macho
RM524	<i>Artibeus</i>	<i>fimbriatus</i>	Macho
RM525	<i>Sturnira</i>	<i>lilium</i>	Fêmea
RM526	<i>Lonchophylla</i>	<i>peracchii</i>	Fêmea
RM527	<i>Vampyressa</i>	<i>pusilla</i>	Fêmea
RM528	<i>Desmodus</i>	<i>rotundus</i>	Macho
RM529	<i>Artibeus</i>	<i>obscurus</i>	Macho
RM530	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Macho
RM532	<i>Sturnira</i>	<i>lilium</i>	Macho
RM533	<i>Vampyressa</i>	<i>pusilla</i>	Fêmea
RM534	<i>Desmodus</i>	<i>rotundus</i>	Macho
RM535	<i>Micronycteris</i>	<i>sp.</i>	Fêmea
RM553	<i>Desmodus</i>	<i>rotundus</i>	Macho
RM554	<i>Desmodus</i>	<i>rotundus</i>	Macho
RM555	<i>Desmodus</i>	<i>rotundus</i>	Fêmea
RM556	<i>Artibeus</i>	<i>fimbriatus</i>	Fêmea
RM557	<i>Artibeus</i>	<i>lituratus</i>	Macho
RM558	<i>Sturnira</i>	<i>lilium</i>	Fêmea
RM559	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Fêmea
RM561	<i>Sturnira</i>	<i>lilium</i>	Macho
RM562	<i>Myotis</i>	<i>nigricans</i>	Macho
RM563	<i>Desmodus</i>	<i>rotundus</i>	Fêmea
RM564	<i>Desmodus</i>	<i>rotundus</i>	Fêmea

**Tabela 5.2** - Identificação dos quirópteros capturados na região da APA do Pratigi/BA no mês de agosto / 2014

<b>Nº Campo</b>	<b>Gênero</b>	<b>Espécie</b>	<b>Sexo</b>
EM 176	<i>Artibeus</i>	<i>planirostris</i>	Macho
EM 177	<i>Phyllostomus</i>	<i>discolor</i>	Macho
EM 178	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Fêmea
EM 179	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Macho
EM 181	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Fêmea
EM 182	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Fêmea
EM 183	<i>Artibeus</i>	<i>lituratus</i>	Macho
EM 184	<i>Dermanura</i>	<i>cinérea</i>	Macho
EM 185	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Macho
EM 186	<i>Artibeus</i>	<i>lituratus</i>	Macho
EM 187	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Fêmea
EM 188	<i>Trinycteris</i>	<i>nicefori</i>	Macho
EM 189	<i>Rhinophylla</i>	<i>pumilio</i>	Macho
EM 191	<i>Artibeus</i>	<i>planirostris</i>	Fêmea
EM 192	<i>Artibeus</i>	<i>planirostris</i>	Macho
EM 193	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Fêmea
EM 194	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Macho
EM 195	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Fêmea
EM 196	<i>Rhinophylla</i>	<i>pumilio</i>	Fêmea
EM 197	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Fêmea
EM 198	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Fêmea
EM 199	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Macho
EM 200	<i>Rhinophylla</i>	<i>pumilio</i>	Fêmea
EM 201	<i>Artibeus</i>	<i>planirostris</i>	Macho
EM 202	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Fêmea
EM 203	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Fêmea
EM 204	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Fêmea
EM 205	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Fêmea
EM 206	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Fêmea
EM 207	<i>Rhinophylla</i>	<i>pumilio</i>	Macho
EM 208	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Fêmea
EM 209	<i>Phyllostomus</i>	<i>discolor</i>	Macho
EM 210	<i>Phyllostomus</i>	<i>discolor</i>	Fêmea
EM 212	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Macho
EM 213	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Macho
EM 214	<i>Phyllostomus</i>	<i>discolor</i>	Fêmea
EM 215	<i>Artibeus</i>	<i>planirostris</i>	Macho
EM 216	<i>Rhinophylla</i>	<i>pumilio</i>	Fêmea
EM 217	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Macho
EM 218	<i>Dermanura</i>	<i>cinérea</i>	Fêmea
EM 219	<i>Rhinophylla</i>	<i>pumilio</i>	Macho
EM 220	<i>Dermanura</i>	<i>cinérea</i>	Fêmea
EM 221	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Fêmea
EM 222	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Macho
EM 223	<i>Dermanura</i>	<i>cinérea</i>	Fêmea
EM 224	<i>Rhinophylla</i>	<i>pumilio</i>	Macho
EM 289	<i>Phyllostomus</i>	<i>hastatus</i>	Fêmea

**Tabela 5.3** - Identificação dos quirópteros capturado na região do Parque Estadual da Serra do Tabuleiro (PEST)/ SC no mês de maio/ 2015

Nº Campo	Gênero	Espécie	Sexo
EM 794	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Macho
EM 795	<i>Sturnira</i>	<i>lilium</i>	Macho
EM 797	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Fêmea
EM 798	<i>Artibeus</i>	<i>lituratus</i>	Macho
EM 799	<i>Anoura</i>	<i>caudifer</i>	Macho
EM 800	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Macho
EM 801	<i>Artibeus</i>	<i>lituratus</i>	Fêmea
EM 802	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Macho
EM 803	<i>Sturnira</i>	<i>lilium</i>	Macho
EM 804	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Fêmea
EM 805	<i>Sturnira</i>	<i>lilium</i>	Macho
EM 806	<i>Artibeus</i>	<i>lituratus</i>	Macho
EM 807	<i>Artibeus</i>	<i>obscurus</i>	Fêmea
EM 808	<i>Artibeus</i>	<i>lituratus</i>	Fêmea
EM 809	<i>Sturnira</i>	<i>lilium</i>	Fêmea
EM 810	<i>Artibeus</i>	<i>fimbriatus</i>	Macho
EM 811	<i>Artibeus</i>	<i>fimbriatus</i>	Macho
EM 815	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Macho
EM 816	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Fêmea
EM 817	<i>Artibeus</i>	<i>lituratus</i>	Fêmea
EM 818	<i>Chiroderma</i>	<i>doriae</i>	Macho
EM 819	<i>Sturnira</i>	<i>lilium</i>	Fêmea
EM 820	<i>Artibeus</i>	<i>lituratus</i>	Macho
EM 821	<i>Artibeus</i>	<i>fimbriatus</i>	Macho
EM 822	<i>Sturnira</i>	<i>lilium</i>	Fêmea
EM 823	<i>Artibeus</i>	<i>fimbriatus</i>	Fêmea
EM 824	<i>Artibeus</i>	<i>lituratus</i>	Fêmea
EM 825	<i>Artibeus</i>	<i>lituratus</i>	Macho

## 5.2 Pesquisa de *Rickettsia*, *Ehrlichia* e *Anaplasma*

### 5.2.1 Análise molecular das amostras para os gêneros *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp.

O DNA de *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. não foi amplificado em nenhuma das amostras de morcego testadas.

## 5.3 Pesquisa de *Coxiella burnetii*

### 5.3.1 Análise molecular das amostras para *Coxiella burnetii*

DNA de *C. burnetii* foi amplificado em 4 (3,4%) das 119 amostras de morcegos capturados.

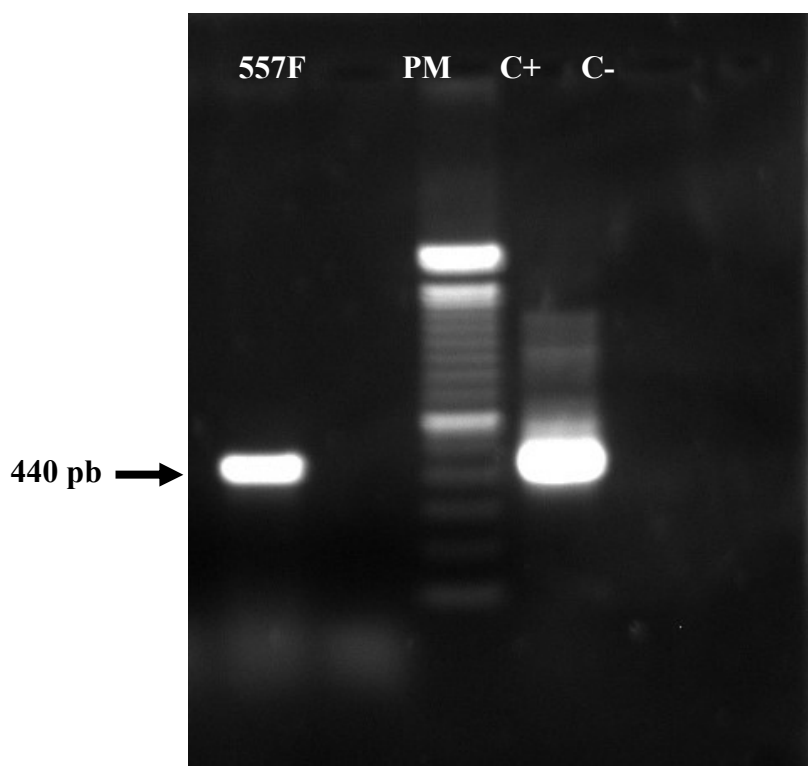
Duas amostras foram positivas quando o tecido alvo da pesquisa foi o baço.

Amostras de outras vísceras de 8 animais foram utilizadas complementarmente para a pesquisa de *C. burnetii* devido a resultados iniciais inconclusivos. Dentre estas vísceras, o DNA de *C. burnetii* foi amplificado em uma única amostra de fígado (Figura 5.1) e uma de coração.

O detalhamento dos resultados obtidos está apresentado na tabela 5.4

**Tabela 5.4** - Amostras positivas para *C. burnetii* após análise molecular

N° Campo	Viscera	Gênero	Espécie	Sexo	Localidade
RM 514	Baço	<i>Artibeus</i>	<i>lituratus</i>	Fêmea	Jacarepaguá/RJ
RM 524	Coração	<i>Artibeus</i>	<i>fimbriatus</i>	Macho	Jacarepaguá/RJ
RM557	Fígado	<i>Artibeus</i>	<i>lituratus</i>	Macho	Jacarepaguá/RJ
EM 817	Baço	<i>Artibeus</i>	<i>lituratus</i>	Fêmea	PEST /SC



**Figura 5.1** - Eletroforese em gel de agarose de *Coxiella burnetii*, produto da PCR nested amplificado a partir de DNA total do fígado de quiróptero capturado na região de Jacarepaguá, Rio de Janeiro. Amostra RM 557, morcego da espécie *Artibeus lituratus*. A seta indica a amplificação do segmento de 440 pb do gene *htpAB*.

### 5.3.2 Análise do sequenciamento das amostras positivas para *Coxiella burnetii*

O sequenciamento dos fragmentos amplificados procedentes das amostras de baço, fígado e coração mostraram 100% de identidade com depósitos do genoma completo de *C. burnetii*, encontrados na base de dados GenBank.

## 5.4 Pesquisa de *Bartonella* spp.

### 5.4.1 Análise molecular das amostras para *Bartonella* spp.

Quanto à detecção gênica de *Bartonella* spp., um total de 22 amostras de baço (18,5%), dos 119 morcegos capturados, foi PCR-positivo. As espécies envolvidas foram: *Sturnira lilium* (6/ 27,3%), *Desmodus rotundus* (6/ 27,3%), *Carollia perspicillata* (5/ 22,7%), *Artibeus lituratus* (1/ 4,5%), *Artibeus fimbriatus* (1/4,5%), *Artibeus obscurus* (1/ 4,5%), *Rhinophylla pumilio* (1/ 4,5%) e *Phyllostomus discolor* (1/ 4,5%). Amostras positivas foram encontradas nas três regiões do estudo, com prevalência de 23% (10/44) na localidade de Jacarepaguá - RJ, 15% (7/47) na região da APA do Pratigi – BA e 18% (5/28) na região do PEST- SC. O detalhamento resultados encontra-se nas tabelas 5.5, 5.6 e 5.7 apresentadas a seguir.

**Tabela 5.5** - Amostras positivas para *Bartonella* spp. provenientes da localidade de Jacarepaguá–RJ

Nº Campo	Gênero	Espécie	Sexo	Localidade
RM510	<i>Desmodus</i>	<i>rotundus</i>	Fêmea	Jacarepaguá – RJ
RM512	<i>Desmodus</i>	<i>rotundus</i>	Macho	Jacarepaguá – RJ
RM517	<i>Desmodus</i>	<i>rotundus</i>	Fêmea	Jacarepaguá – RJ
RM523	<i>Desmodus</i>	<i>rotundus</i>	Macho	Jacarepaguá – RJ
RM524	<i>Artibeus</i>	<i>fimbriatus</i>	Macho	Jacarepaguá - RJ
RM525	<i>Sturnira</i>	<i>lilium</i>	Fêmea	Jacarepaguá - RJ
RM529	<i>Artibeus</i>	<i>obscurus</i>	Macho	Jacarepaguá - RJ
RM532	<i>Sturnira</i>	<i>lilium</i>	Macho	Jacarepaguá - RJ
RM534	<i>Desmodus</i>	<i>rotundus</i>	Macho	Jacarepaguá - RJ
RM564	<i>Desmodus</i>	<i>rotundus</i>	Fêmea	Jacarepaguá - RJ



**Tabela 5.6** - Amostras positivas para *Bartonellas* pp. provenientes da localidade da APA do Pratigi – BA

Nº Campo	Gênero	Espécie	Sexo	Localidade
EM 179	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Macho	APA do Pratigi - BA
EM 185	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Macho	APA do Pratigi - BA
EM 186	<i>Artibeus</i>	<i>lituratus</i>	Macho	APA do Pratigi - BA
EM 189	<i>Rhinophylla</i>	<i>pumilio</i>	Macho	APA do Pratigi - BA
EM 199	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Macho	APA do Pratigi - BA
EM 209	<i>Phyllostomus</i>	<i>discolor</i>	Macho	APA do Pratigi - BA
EM 217	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Macho	APA do Pratigi - BA

**Tabela 5.7-** Amostras positivas para *Bartonella* spp. provenientes da localidade do Parque Estadual da Serra do Tabuleiro (PEST – SC)

Nº Campo	Gênero	Espécie	Sexo	Localidade
EM 795	<i>Sturnira</i>	<i>lilium</i>	Macho	PEST - SC
EM 800	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	Macho	PEST - SC
EM 803	<i>Sturnira</i>	<i>lilium</i>	Macho	PEST - SC
EM 805	<i>Sturnira</i>	<i>lilium</i>	Macho	PEST - SC
EM 819	<i>Sturnira</i>	<i>lilium</i>	Fêmea	PEST - SC

Uma amostra de morcego da espécie *A. fimbriatus* foi encontrada co-infectada com *C. burnetii* e *Bartonella* spp., na localidade de Jacarepaguá, RJ.

#### 5.4.2 Análise filogenética das amostras positivas para o gênero *Bartonella*

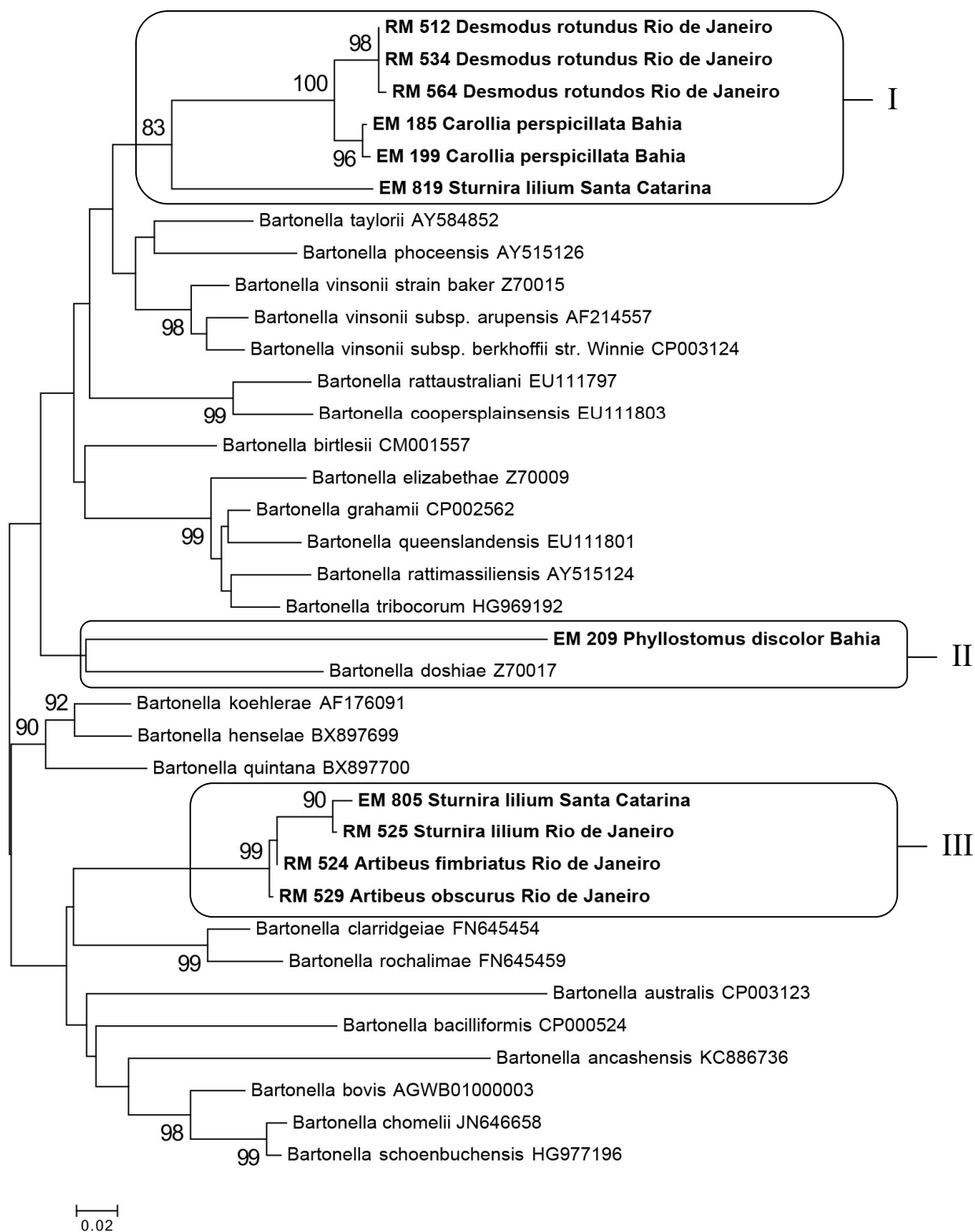
Das 22 sequências obtidas a partir do gene *gltA* de *Bartonella*, 11 apresentaram tamanho de fragmentos que permitiria resultados satisfatórios quando submetidas à análise filogenética. Estas onze sequências foram comparadas com outras 25 espécies de *Bartonella* conhecidas, utilizando fragmentos de 564 nucleotídeos.

A análise filogenética agrupou as 11 sequências analisadas em 3 clados (I, II e III), sugerindo que os fragmentos amplificados nas amostras destes quirópteros pertencem a três espécies de *Bartonella* distintas (Figura 5.2).

O clado I foi formado com as amostras positivas dos morcegos pertencentes às espécies *Desmodus rotundus* (n=3) capturados no Rio de Janeiro, *Carollia perspicillata* (n=2) capturados na Bahia e *Sturnira lilium* (n=1) capturado em Santa Catarina. A espécie *Sturnira lilium* formou um grupo irmão com as demais espécies do mesmo clado, sugerindo tratar-se uma espécie diferente das demais ou tratar-se de uma subespécie.

O morcego da espécie *Phyllostomus discolor*, capturado na Bahia, formou um clado monofilético (II) com a espécie já conhecida *Bartonella doshiae*.

O clado III foi formado a partir das amostras de morcegos da espécie *Sturnira liliium* capturados em Santa Catarina (n=1) e Rio de Janeiro (n=1), além da espécie *Artibeus fimbriatus* (n=1) e *Artibeus obscurus* (n=1) capturados no Rio de Janeiro.



**Figura 5.2-** Relações filogenéticas dos genótipos de *Bartonella* com base nas seqüências parciais do gene *gltA* detectados nos morcegos capturados em diferentes regiões do Brasil em comparação com genótipos similares de bartonelas descritas na literatura. Os numerais romanos marcam os três clados formados pelas seqüências obtidas das amostras de morcegos.

## 5.5 Identificação dos ectoparasitas coletados

A coleta dos ectoparasitas foi restritamente realizada na localidade de Jacarepaguá-RJ e um total de 24 espécimes foi encontrado entre 7 quirópteros capturados e incluídos neste estudo e 13 quirópteros anilhados e soltos. Quanto à identificação dos ectoparasitas coletados, foram 19 dípteros da família Streblidae, 4 ácaros da família Spinturnicidae, além de um espécime cuja classificação taxonômica foi limitada à classe Arachnida (Tabela 5.8).

**Tabela 5.8** - Identificação taxonômica dos ectoparasitas coletados em quirópteros capturados na região de Jacarepaguá – RJ

Quirópteros		Ectoparasitas			
Nº Campo	Identificação	Classe	Família	Gênero	Número de exemplares
RM 504	<i>Artibeus lituratus</i>	Arachnida	Spinturnicidae	<i>Periglischrus</i>	1
RM 508	<i>Desmodus rotundus</i>	Insecta	Streblidae	<i>Trichobius</i>	1
RM 518	<i>Glossophaga soricina</i>	Insecta	Streblidae	<i>Trichobius</i>	1
RM 521	<i>Carollia perspicillata</i>	Insecta	Streblidae	<i>Trichobius</i>	1
RM 522	<i>Desmodus rotundus</i>	Insecta	Streblidae	<i>Strebla</i>	1
RM 523	<i>Desmodus rotundus</i>	Insecta	Streblidae	<i>Strebla</i>	4
RM 527	<i>Vampyressa pusilla</i>	Arachnida	-	-	1
RMA102	<i>Carollia perspicillata</i>	Insecta	Streblidae	<i>Trichobius</i>	1
RMA197	<i>Carollia perspicillata</i>	Insecta	Streblidae	<i>Trichobius</i>	1
RMA 202	<i>Sturnira lilium</i>	Insecta	Streblidae	<i>Strebla</i>	2
RMA 203	<i>Carollia perspicillata</i>	Insecta	Streblidae	<i>Trichobius</i>	1
RMA 205	<i>Carollia perspicillata</i>	Insecta	Streblidae	<i>Trichobius</i>	1
RMA 206	<i>Carollia perspicillata</i>	Insecta	Streblidae	<i>Trichobius</i>	1
RMA 222	<i>Carollia perspicillata</i>	Insecta	Streblidae	<i>Trichobius</i>	1
RMA 223	<i>Carollia perspicillata</i>	Insecta	Streblidae	<i>Trichobius</i>	1
RMA 349	<i>Carollia perspicillata</i>	Insecta	Streblidae	<i>Trichobius</i>	1
RMA 360	<i>Carollia perspicillata</i>	Insecta	Streblidae	<i>Trichobius</i>	1
RMA 607	<i>Artibeus lituratus</i>	Arachnida	Spinturnicidae	<i>Periglischrus</i>	1
RMA 611	<i>Artibeus fimbriatus</i>	Arachnida	Spinturnicidae	<i>Periglischrus</i>	1
RMA 649	<i>Sturnira lilium</i>	Arachnida	Spinturnicidae	<i>Periglischrus</i>	1

**RM:** animais capturados e incluídos neste estudo / **RMA:** animais anilhados e soltos após identificação e coleta de dados morfológicos

## 6 DISCUSSÃO

Considerando a importância crescente dos quirópteros e sua relação com diversos agentes zoonóticos causadores de doença humana, neste estudo pioneiro desenvolvido com amostras de morcegos capturados em três estados brasileiros foi possível obter informações de potencial importância para a saúde pública e que servirão de parâmetro para estudos futuros em especial em áreas de ocorrência de bartoneloses, febre maculosa brasileira e febre Q.

No presente estudo foi capturado um total de 21 espécies de morcegos nas três localidades de coleta. Esta diversidade de espécies é um achado comum em estudos realizados no território brasileiro. No estado de São Paulo, em estudo soropidemiológico de infecção por *Toxoplasma gondii* em morcegos, um total de 22 espécies foi capturado entre os anos de 2006 e 2011(151). Resultado semelhante foi encontrado no estado do Pará, onde um total de 28 espécies de morcegos foi incluído em uma investigação soropidemiológica do vírus rábico em 2013 (152). De acordo com Reis e colaboradores, a ordem Chiroptera é a segunda maior em riqueza de espécies, sendo superada somente pela ordem Rodentia. No Brasil, são conhecidas 9 famílias, 65 gêneros e 175 espécies pertencentes a ordem Chiroptera (153).

### 6.1 Quirópteros e *Coxiella burnetii*

Quanto à febre Q, embora a infecção por *C. burnetii* em seres humanos seja principalmente um risco ocupacional entre pessoas que estejam em contato com animais como gado, ovelhas e cabras, o contato com os animais de estimação, especialmente gatos e cães, tem demonstrado ser fonte potencial de surtos urbanos (51, 59).

Menos frequentemente, a infecção por *C. burnetii* tem sido associada, seja por inquéritos sorológicos ou confirmada por biologia molecular, também com uma série de outros animais silvestres, incluindo ursos, cervídeos, porcos selvagens, aves silvestres, roedores e marsupiais (130, 154-157). Alguns estudos ainda sugerem relação entre a infecção humana e a exposição a animais silvestres (131, 158)

Neste estudo, encontramos uma prevalência de 3,4% de quirópteros positivos para a presença de DNA de *C. burnetii*. Dos quatro animais positivos, um foi capturado na região do Parque Estadual da Serra do Tabuleiro, em Santa Catarina e três foram capturados na região de Jacarepaguá, no Rio de Janeiro. Este resultado no estado fluminense não causa surpresa considerando que em 2008, no Rio de Janeiro, foi realizado um estudo entre pacientes HIV-positivos atendidos em serviço de saúde na região administrativa de Jacarepaguá, e os autores identificaram uma soroprevalência para *C. burnetii* de 3,2%. Todos os indivíduos apresentaram anticorpos anti-*C. burnetii* de fase I, fase associada com a infecção crônica (67).

Ainda no estado do Rio de Janeiro, reforçando a importância do resultado obtido, no município de Itaboraí, região metropolitana do Rio de Janeiro, onde ocorreu o primeiro caso de febre Q humano confirmado por metodologia molecular, a infecção por *C. burnetii* foi identificada em cães, ovelhas e cabras (68). A continuidade do inquérito epidemiológico nesta região identificou, após quatro anos do primeiro achado, novos focos de infecção por *C. burnetii* em animais domésticos e ectoparasitas nos arredores do primeiro local de estudo, revelando a presença, propagação e transmissão deste agente em território fluminense (159). Além disso, em 2013, roedores silvestres capturados no município de Piraí-RJ, foram PCR positivos para a presença de *C. burnetii* (48). Essas informações somadas aos achados deste estudo em quirópteros sugerem a existência de um complexo ciclo de transmissão de *C. burnetii*, que pode estar envolvendo um extenso número de animais silvestres e enfatizam a necessidade de estudos futuros nas áreas do território nacional onde casos de febre Q tenham sido confirmados.

A febre Q é considerada uma zoonose de distribuição mundial. No entanto, são poucos os relatos que auxiliam no entendimento da epidemiologia de *C. burnetii* no Brasil. A presença de DNA de *C. burnetii* no quiróptero capturado na região de Santa Catarina é a primeira evidência da circulação deste agente no estado. Apesar de nenhum quiróptero capturado na APA do Pratigi, na Bahia ter sido positivo para *C. burnetii* no presente estudo, existe relato na literatura de um caso grave de endocardite por *C. burnetii* autóctone do estado da Bahia, apontando não apenas para a importância do presente estudo, mas também para a necessidade de se investigar a presença deste agente zoonótico nesta região (66).

Todos os quirópteros positivos para o DNA de *C. burnetii* neste estudo pertencem ao gênero *Artibeus*. Estes morcegos fazem parte da família

Phyllostomidae, subfamília Stenodermatinae. São animais predominantemente frugívoros, mas que eventualmente podem apresentar uma dieta mais generalista, alimentando-se de insetos, pólen e néctar (153).

Características desta espécie, como a formação de colônias que chegam a mais de 20 indivíduos em época reprodutiva (160), podem contribuir para uma rápida e difundida transmissão de *C. burnetii* entre estes animais, considerando que esta proteobactéria, devido ao processo de esporulação, é muito resistente, podendo sobreviver durante várias semanas no ambiente onde os animais, principalmente durante o parto, tenham estado presentes (51).

Além disso, *A. lituratus* e *A. fimbriatus* podem percorrer longas distâncias em uma noite. Costa e colaboradores, em 2006, relataram o deslocamento de um exemplar de *A. fimbriatus* no estado do Rio de Janeiro, que foi recapturado 20 dias após a primeira captura, numa distância de 21,7 km (161). Em 2012, no estudo de Reis e colaboradores, dois exemplares de *A. lituratus* foram registrados a cerca de 20 km do local de marcação, após 24 meses da primeira captura (162). No Rio de Janeiro, quirópteros capturados no município de Jacarepaguá, região metropolitana, foram recapturados no Parque Nacional da Serra dos Órgãos em Teresópolis, município localizado no interior do estado do Rio de Janeiro, deslocando-se a uma distância de mais de 100 km (comunicação pessoal). A capacidade de deslocamento destes quirópteros aumenta, assim, consideravelmente a área de dispersão de *C. burnetii*.

A literatura atual disponível não apresenta praticamente nenhum estudo sobre o papel dos morcegos no ciclo natural de *C. burnetii*. Assim apesar destes animais já terem sido incluídos em pesquisas epidemiológicas em área endêmica na Guiana Francesa, por exemplo, o DNA da bactéria não foi encontrado (130, 131). No entanto, na Austrália, no único trabalho disponível no qual foi possível amplificar o DNA de *C. burnetii* os autores demonstraram que estes mamíferos estavam excretando a bactéria, uma vez que o material genético foi detectado na urina dos animais (13). Este fato é de extrema importância, por caracterizar os morcegos como potenciais fontes de infecção e disseminação da *C. burnetii* na natureza.

## 6.2 Quirópteros e *Rickettsia* spp.

Na pesquisa do genoma de *Rickettsia* spp., nenhum morcego apresentou positividade, reforçando o conceito de que o papel dos morcegos como portadores de *Rickettsia* continua desconhecido. Apesar dos relatos de que os morcegos são depositários de rickettsias e que estas podem ser patogênicas a eles na década de 1940 (24, 129, 146), na literatura atual, com exceção do inquérito realizado na Argentina em 2011, onde todos os morcegos da espécie *Tandarida brasiliensis* foram PCR negativos para a presença das rickettsias (128), os estudos são limitados a inquéritos sorológicos. Os resultados obtidos nestes inquéritos demonstraram a possibilidade, diante do contato com as rickettsias, dos morcegos atuarem como sentinelas da presença destas bactérias na região estudada (15, 127).

Os resultados encontrados no presente estudo possivelmente corroboram com a afirmação de Rozental (2013), de que a falta de amplificação de rickettsias em amostras de animais silvestres é de certa forma um resultado esperado, uma vez que os vertebrados atuam como amplificadores e fonte alimentar para os carrapatos, que são de fato os verdadeiros reservatórios destas proteobactérias na natureza (48). No entanto, é imprescindível registrar que o papel dos carrapatos que parasitam quirópteros vem sendo estudado e que a identificação de carrapatos da espécie *Carios kelleyi* positivos para presença de DNA de *Rickettsia* spp, inclusive com observações laboratoriais que sugerem que o agente pode ser mantido tanto pela via transtadial quanto pela via transovariana nestas espécies de carrapatos, apontam para a necessidade de mais pesquisas sobre o tema (10).

## 6.3 Quirópteros e *Ehrlichia* spp. / *Anaplasma* spp.

Quanto às proteobactérias da família Anaplasmataceae, morcegos já foram encontrados infectados por espécie membro desta família (128), no entanto, ainda não existe registro de amplificação do DNA de *Ehrlichia* spp. ou *Anaplasma* spp. nestes mamíferos. Assim, apesar de neste estudo não ter sido possível amplificar o DNA destas bactérias nos quirópteros capturados, a identificação de canídeos, cervídeos, roedores e outros mamíferos como reservatórios destas bactérias na natureza (112), e da comprovação de animais domésticos e silvestres infectados no território brasileiro (108, 119, 120), reforçam a necessidade de mais estudos,



principalmente em áreas sabidamente com circulação dos animais reservatórios de *Ehrlichia* spp. ou *Anaplasma* spp.

#### 6.4 Quirópteros e *Bartonella* spp.

Em relação ao estudo com *Bartonella*, após recentes relatos de infecção em morcegos em diferentes regiões do mundo, o presente estudo forneceu evidências adicionais de que as bartonelas também são prevalentes em populações de morcegos no Brasil. A prevalência de 18,5% encontrada neste estudo foi semelhante à encontrada em Porto Rico (18%) (140), porém, mais baixa do que às encontradas em outros países das Américas, como Peru (24,1%), Costa Rica (33,3%) e Guatemala (33%) (11, 136, 139).

Dentre as 22 amostras positivas para *Bartonella* spp., as espécies *Sturnira lilium* (27,3%), *Desmodus rotundus* (27,3%) e *Carollia perspicillata* (22,7%) foram as que apresentaram as maiores prevalências. Na América do Sul, a infecção por *Bartonella* spp. nestas três espécies também foram relatadas no estudo realizado no Peru com prevalência de 15% para *C. perspicillata*, (4/27), 37% para *D. rotundus*, (10/27) e 4% para *S. lilium* (1/27) (11).

Em geral, as diversas espécies de *Bartonella* são consideradas agentes transmitidos por uma variedade de ectoparasitas vetores (86). Os quirópteros transportam uma grande diversidade de ectoparasitas, incluindo dípteros, pulgas, carrapatos moles e ácaros, alguns dos quais altamente específicos para os morcegos (163). Somado a isto, a tendência à formação de colônias e até compartilhamento de abrigos como acontece com as espécies *Carollia perspicillata* e *Phyllostomus discolor* (153) podem contribuir para a transmissão frequente de *Bartonella* spp. intraespécies e interespécies. Em um estudo realizado por Duncan e colaboradores (2007) foi possível detectar o DNA de *Bartonella* spp. na saliva de cães, sugerindo a possibilidade de transmissão destas bactérias através de mordedura (164). Diante deste estudo, a inclusão da espécie *D. rotundus* como potencial hospedeira de bartonelas merece atenção, uma vez que estes animais mantêm uma dieta exclusivamente hematófaga (165). Atualmente *D. rotundus* é considerado o mais importante reservatório e vetor do vírus da raiva (166, 167).

A análise filogenética das amostras positivas revelou a formação de clados independentes quando comparadas com espécies de bartonelas relatadas na

literatura. Este é um achado comum aos estudos deste agente nos quirópteros em outras regiões do mundo (136, 139, 141). Este fato sugere a possibilidade dos morcegos serem infectados com novas espécies de *Bartonella*.

Em estudos realizados no Quênia e Vietnam os autores relataram evidência de especificidade de hospedeiros entre as bartonelas encontradas nos quirópteros (12, 138), enquanto que na Guatemala, esta relação não foi observada (136), resultado este concordante com o obtido no presente estudo. Nos resultados observados no presente estudo não foi identificada relação de espécie-especificidade entre as espécies de bartonelas e as espécies de morcegos capturados. Neste contexto, somente com uma análise comparativa entre as sequências de bartonelas obtidas nas amostras de quirópteros com amostras positivas para *Bartonella* em outros hospedeiros mamíferos, em especial roedores silvestres, será possível verificar, de forma inquestionável, esta suposta especificidade patógeno-hospedeiro.

As amostras positivas pertencentes aos morcegos da espécie *Sturnira lilium* foram agrupadas em dois clados distintos, sugerindo que a espécie *S. lilium* foi encontrada infectada com duas espécies diferentes de *Bartonella*. Do mesmo modo, os morcegos capturados no Rio de Janeiro, que foram submetidos à análise filogenética, se dividiram em dois clados, sugerindo a circulação de mais de uma espécie de *Bartonella* associada aos quirópteros nesta região.

Quanto a *Bartonella* encontrada na espécie de morcego *Phyllostomus discolor* capturado na Bahia, foi observado um terceiro clado, apresentando semelhança com *B. doshiae*, espécie que tem roedores silvestres como reservatório (101).

Muitas lacunas ainda não foram preenchidas no que diz respeito ao papel dos morcegos como hospedeiros de *Bartonella* na natureza. Diante do número crescente de espécies de *Bartonella* que vem sendo descrito, em especial às associadas à doença humana, a inclusão dos quirópteros no contexto de hospedeiro destas bactérias é importante para a compreensão do ciclo de perpetuação destes agentes na natureza.

Não obstante os dados inéditos discutidos acima, neste estudo foi identificada pela primeira vez um quiróptero, da espécie *A. fimbriatus*, co-infectado com *C. burnetii* e *Bartonella* spp., reforçando, assim, o potencial dos quirópteros para hospedar patógenos bacterianos.

Deve ser ressaltado que a importância deste estudo é reforçada pela publicação recente de Luis e colaboradores em 2013, na qual os autores

compararam os morcegos com os roedores como reservatórios de vírus zoonóticos. Neste estudo foi demonstrado que os morcegos abrigam um número muito maior de vírus zoonóticos quando comparados com os roedores e o nível de contato interespecífico frequentemente observado em abrigos formados por um conjunto diversificado de espécies de morcegos é uma das justificativas. Assim, é bem possível que este modelo possa ser aplicado também para as zoonoses bacterianas, considerando mais uma vez que a sobreposição de diferentes espécies de animais de uma mesma ordem taxonômica em uma mesma distribuição espacial torna possível o compartilhamento de um maior número de agentes bacterianos tal como observado com os vírus (168).

## 6.5 Ectoparasitas

Em relação ao estudo com os ectoparasitas, foram coletados ácaros do gênero *Periglischrus* e dípteros hematófagos dos gêneros *Trichobius* e *Strebli* pertencentes à família Streblidae, ambos ectoparasitas exclusivos dos quirópteros (169, 170). Dentre os ectoparasitas capturados, quatro espécimes membros da família Streblidae, pertencentes ao gênero *Strebli*, foram coletados de um quiróptero PCR-positivo para *Bartonella* spp..

Membros da família Streblidae já foram encontrados infectados por *Bartonella* spp., na Costa Rica e nos EUA, como citado anteriormente (139, 143). Em um estudo realizado na Costa Rica, Judson e colaboradores observaram uma associação entre as variantes gênicas de *Bartonella* spp. detectadas nos dípteros coletados com as variantes identificadas nos morcegos por eles parasitados, sugerindo um sistema de hospedeiro-vetor entre os dípteros e os morcegos (139). Entretanto, vale ressaltar que a presença do agente nos dípteros estudados não comprova sua competência vetorial.

Considerando a complexidade do estudo - desde trabalho de campo, processamento inicial do material em um laboratório NB3 a análises moleculares - , assim como o curto prazo para seu desenvolvimento, não foi possível processar os ectoparasitas coletados. Assim, esta etapa do projeto será realizada posteriormente para a pesquisada presença de *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii*, *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. e *Bartonella* spp..

Por fim, é importante registrar que este é o primeiro estudo que relata a infecção por *C. burnetii* e *Bartonella* spp. em quirópteros no Brasil e que muitas pesquisas precisam ser desenvolvidas para que se possa determinar o real papel dos morcegos e seus ectoparasitas na ecologia destes patógenos, bem como a influência que essa relação patógeno-hospedeiro pode ter sobre a saúde humana e animal.

## 7 CONCLUSÕES

- A identificação, com base na análise molecular, pela primeira vez no Brasil, de proteobactérias do gênero *Bartonella* e da espécie *Coxiella burnetii* em amostras de morcegos capturados no Rio de Janeiro, Bahia e Santa Catarina, corrobora a hipótese dos quirópteros como importantes hospedeiros destas bactérias.
- A presença do DNA de *Coxiella burnetii* no quiróptero capturado na localidade de Santa Catarina, primeiro indício da circulação desta bactéria na região, aponta para a necessidade de mais estudos sobre o agente em território brasileiro.
- Apesar dos quirópteros PCR-positivos para *Coxiella burnetii* serem do gênero *Artibeus*, são necessários mais estudos para avaliar uma correlação de gênero com a proteobactéria causadora da febre Q.
- A ausência do DNA de *Rickettsia* spp., aponta para a necessidade de mais estudos, uma vez que estes animais já foram apontados como depositários de rickettsias e sororreativos em algumas regiões do Brasil.
- O DNA de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. não foi amplificado em nenhuma das amostras de quirópteros testadas, resultado concordante com a literatura já que até o momento não existe relato de infecção por estes agentes nos quirópteros.
- A análise filogenética das amostras dos morcegos PCR-positivos para *Bartonella* mostrou que novas espécies estão associadas a estes animais, apontando para a necessidade de mais estudos sobre estas novas espécies identificadas e sua correlação com doença humana.
- Neste estudo foram coletados ácaros da família Spinturnicidae e dípteros da família Streblidae.
- Os resultados obtidos neste estudo apontam para a necessidade de se verificar o papel dos quirópteros no ciclo natural de *C. burnetii* e das diversas espécies de *Bartonella* nas áreas de ocorrência da febre Q e das bartoneloses.

## 8 PERSPECTIVAS

- Realizar análise molecular dos ectoparasitas coletados e identificados neste estudo para avaliar a presença de *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii*, *Bartonella* spp., *Anaplasma* e *Ehrlichia* spp.
- Analisar filogeneticamente as sequências obtidas a partir dos possíveis fragmentos amplificados nos ectoparasitas estudados
- Realizar análise filogenética das amostras de quirópteros positivas para *Bartonella* spp. comparando-as com amostras de roedores capturados nas mesmas regiões de estudo
- Dar prosseguimento ao inquérito epidemiológico realizado entre os morcegos nas regiões estudadas e outras áreas não incluídas neste estudo.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmes KV, Schountz T. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Jul;19(3):531-45.
2. Fenton MB, Davison M, Kunz TH, McCracken GF, Racey PA, Tuttle MD. Linking bats to emerging diseases. *Science.* 2006 Feb 24;311(5764):1098-9; author reply -9.
3. Hayman DT, Bowen RA, Cryan PM, McCracken GF, O'Shea TJ, Peel AJ, et al. Ecology of zoonotic infectious diseases in bats: current knowledge and future directions. *Zoonoses Public Health.* 2013 Feb;60(1):2-21.
4. Bennett M. Bats and human emerging diseases. *Epidemiol Infect.* 2006 Oct;134(5):905-7.
5. Shi Z. Emerging infectious diseases associated with bat viruses. *Sci China Life Sci.* 2013 Aug;56(8):678-82.
6. Taylor LH, Latham SM, Woolhouse ME. Risk factors for human disease emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001 Jul 29;356(1411):983-9.
7. Lemos E. Rickettsioses. In: Coura JR, editor. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 1599-609.
8. Santos LGF, Ometto T, Araújo J, Thomazelli LM, Borges LP. Absence of Anaplasmataceae DNA in Wild Birds and Bats from a Flooded Area in the Brazilian Northern Pantanal. *Air Water Borne Diseases.* 2013;2(2):1-4.
9. Morse SF, Olival KJ, Kosoy M, Billeter S, Patterson BD, Dick CW, et al. Global distribution and genetic diversity of Bartonella in bat flies (Hippoboscoidea, Streblidae, Nycteribiidae). *Infect Genet Evol.* 2012 Dec;12(8):1717-23.
10. Loftis AD, Gill JS, Schriefer ME, Levin ML, Eremeeva ME, Gilchrist MJ, et al. Detection of Rickettsia, Borrelia, and Bartonella in *Carios kelleyi* (Acari: Argasidae). *J Med Entomol.* 2005 May;42(3):473-80.
11. Bai Y, Recuenco S, Gilbert AT, Osikowicz LM, Gomez J, Rupprecht C, et al. Prevalence and diversity of Bartonella spp. in bats in Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 2012 Sep;87(3):518-23.

12. Kosoy M, Bai Y, Lynch T, Kuzmin IV, Niezgoda M, Franka R, et al. Bartonella spp. in bats, Kenya. *Emerg Infect Dis*. 2010 Dec;16(12):1875-81.
13. Tozer SJ, Lambert SB, Strong CL, Field HE, Sloots TP, Nissen MD. Potential animal and environmental sources of Q fever infection for humans in Queensland. *Zoonoses Public Health*. 2014 Mar;61(2):105-12.
14. Socolovschi C, Kernif T, Raoult D, Parola P. Borrelia, Rickettsia, and Ehrlichia species in bat ticks, France, 2010. *Emerg Infect Dis*. 2012 Dec;18(12):1966-75.
15. D'Auria SR, Camargo MC, Pacheco RC, Savani ES, Dias MA, da Rosa AR, et al. Serologic survey for rickettsiosis in bats from Sao Paulo city, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2010 Jun;10(5):459-63.
16. Lemos E. Rickettsioses. In: Coura JR, editor. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Riode Janeiro: Ganabara Koogan; 2013.
17. Fournier PE, Raoult D. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. In: Raoult D, Parola P, editors. *Rickettsial Disease* New York: Informa Healthcare; 2007. p. 1-13.
18. Silva LJ, Angerami NR, Nascimento EMM. Febre Maculosa Brasileira e Outras Riquetsioses no Brasil. In: Focaccia R, editor. *Tratado de Infectologia*. São Paulo: Editora Atheneu; 2009. p. 789-805.
19. Lamas C, Curi A, Boia M, Lemos E. Human bartonellosis: seroepidemiological and clinical features with an emphasis on data from Brazil - a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008 May;103(3):221-35.
20. Gillespie JJ, Beier MS, Rahman MS, Ammerman NC, Shallom JM, Purkayastha A, et al. Plasmids and rickettsial evolution: insight from Rickettsia felis. *PLoS One*. 2007;2(3):e266.
21. Fuxelius HH, Darby A, Min CK, Cho NH, Andersson SG. The genomic and metabolic diversity of Rickettsia. *Res Microbiol*. 2007 Dec;158(10):745-53.
22. Valbuena G, Walker DH. Infection of the endothelium by members of the order Rickettsiales. *Thromb Haemost*. 2009 Dec;102(6):1071-9.
23. Sentausa E, El Karkouri K, Robert C, Raoult D, Fournier PE. Genome sequence of Rickettsia conorii subsp. israelensis, the agent of Israeli spotted fever. *J Bacteriol*. 2012 Sep;194(18):5130-1.



24. Magalhães O. Contribuição ao conhecimento das doenças do Tifo exantemático. Rio de Janeiro: Departamento de Imprensa Nacional; 1952.
25. Lemos ER, Alvarenga FB, Cintra ML, Ramos MC, Paddock CD, Ferebee TL, et al. Spotted fever in Brazil: a seroepidemiological study and description of clinical cases in an endemic area in the state of Sao Paulo. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 Oct;65(4):329-34.
26. Parola P, Paddock CD, Raoult D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin Microbiol Rev.* 2005 Oct;18(4):719-56.
27. Labruna MB. Ecology of rickettsia in South America. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 May;1166:156-66.
28. Socolovschi C, Mediannikov O, Raoult D, Parola P. The relationship between spotted fever group Rickettsiae and ixodid ticks. *Vet Res.* 2009 Mar-Apr;40(2):34.
29. Azad AF, Beard CB. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. *Emerg Infect Dis.* 1998 Apr-Jun;4(2):179-86.
30. Del Fiol FS, Rhun D, Lecuelle B, Le Naour E, Vayssier-Taussat M. Role of the spleen in Bartonella spp. infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012;64:143-5.
31. McDade JE, Newhouse VF. Natural history of Rickettsia rickettsii. *Annu Rev Microbiol.* 1986;40:287-309.
32. Niebylski ML, Peacock MG, Schwan TG. Lethal effect of Rickettsia rickettsii on its tick vector (Dermacentor andersoni). *Appl Environ Microbiol.* 1999 Feb;65(2):773-8.
33. Vélez JCQ, Marylin H, Rodas González JD. Rickettsiosis, una enfermedad letal emergente y re-emergente en Colombia. *Universitas Scientiarum.* 2012;17:82-99.
34. Elfving K, Olsen B, Bergstrom S, Waldenstrom J, Lundkvist A, Sjostedt A, et al. Dissemination of spotted fever rickettsia agents in Europe by migrating birds. *PLoS One.* 2010;5(1):e8572.
35. Stenos J, Graves S, Popov VL, Walker DH. Aponomma hydrosauri, the reptile-associated tick reservoir of Rickettsia honei on Flinders Island, Australia. *Am J Trop Med Hyg.* 2003 Sep;69(3):314-7.

36. Pacheco RC, Horta MC, Moraes-Filho J, Ataliba AC, Pinter A, Labruna MB. Rickettsial infection in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from São Paulo, Brazil: serological evidence for infection by *Rickettsia bellii* and *Rickettsia parkeri*. *Biomédica*. 2007;27:364-71.
37. Brasil. DATASUS- Departamento de Informática do SUS. 2008 [updated 2008; cited 2015 14/10/15]; Available from: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php>.
38. Nava S, Beati L, Labruna MB, Caceres AG, Mangold AJ, Guglielmone AA. 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*, and *Amblyomma sculptum* (Ixodida: Ixodidae). *Ticks Tick Borne Dis*. 2014 Apr;5(3):252-76.
39. Cunha NC, Fonseca AH, Rezende J, Rozental T, Favacho ARM, Barreira JD, 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*. 2009;29:105-8.
40. Rozental T, Favacho AR, Barreira JD, Oliveira RC, Gomes R, Almeida DN, et al. *Rickettsia* spp. infection in *Rhipicephalus sanguineus* ticks in a Brazilian spotted fever endemic rural area in Rio de Janeiro state, Brazil. *Clin Microbiol Infect*. 2009 Dec;15 Suppl 2:245-6.
41. Brasil. Guia de Vigilância Epidemiológica. In: Saúde Md, editor. Brasília: Ministério da Saúde; 2009. p. 816.
42. Gonçalves AJR, Lopes PF, Melo JC, Pereira AA, Pinto AM, Lazera MS, et al. Rickettsioses - a Propósito de Quatro Casos diagnosticados no Rio de Janeiro de febre maculosa brasileira. *Folha Médica (BR)* 1981;82 (2):127-34.
43. de Lemos ER, Rozental T, Villela CL. Brazilian spotted fever: description of a fatal clinical case in the State of Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002 Sep-Oct;35(5):523-5.
44. Walker DH, Raoult D. *Rickettsia rickettsii* and other spotted fever group *Rickettsiae* (Rock Mountain spotted fever and others spotted fevers). . In: Mandell

- BD, editor. Principles and practice of infectious diseases-Chapter 184: Elsevier Importados; 2005.
45. Tiriba AC. Doenças causadas por Rickettsias. In: Veronesi R, Focaccia R, editors. Tratado de Infectologia. São Paulo: Editora Atheneu; 1999.
  46. Silva N, Eremeeva ME, Rozental T, Ribeiro GS, Paddock CD, Ramos EAG, et al. Eschar-associated spotted fever rickettsiosis, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(2):275-8.
  47. Spolidorio MG, Labruna MB, Mantovani E, Brandao PE, Richtzenhain LJ, Yoshinari NH. Novel spotted fever group rickettsiosis, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2010 Mar;16(3):521-3.
  48. Rozental T. Rickettsias lato sensu em amostras humanas e de animais no Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2013.
  49. Derrick EH. "Q" fever, a new fever entity: clinical features, diagnosis and laboratory investigation. *Rev Infect Dis.* 1983 Jul-Aug;5(4):790-800.
  50. Burnet FM, Freeman M. Experimental studies on the virus of "Q" fever. *Rev Infect Dis.* 1983 Jul-Aug;5(4):800-8.
  51. Maurin M, Raoult D. Q fever. *Clin Microbiol Rev.* 1999 Oct;12(4):518-53.
  52. Drancourt M, Raoult D. Taxonomic position of the rickettsiae: current knowledge. *FEMS Microbiol Rev.* 1994 Jan;13(1):13-24.
  53. Parker NR, Barralet JH, Bell AM. Q fever. *Lancet.* 2006 Feb 25;367(9511):679-88.
  54. Howe D, Mallavia LP. *Coxiella burnetii* exhibits morphological change and delays phagolysosomal fusion after internalization by J774A.1 cells. *Infect Immun.* 2000 Jul;68(7):3815-21.
  55. McCaul TF, Williams JC. Developmental cycle of *Coxiella burnetii*: structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations. *J Bacteriol.* 1981 Sep;147(3):1063-76.
  56. Heinzen RA, Hackstadt T, Samuel JE. Developmental biology of *Coxiella burnetii*. *Trends Microbiol.* 1999 Apr;7(4):149-54.

57. Fournier PE, Marrie TJ, Raoult D. Diagnosis of Q fever. *J Clin Microbiol*. 1998 Jul;36(7):1823-34.
58. Honarmand H. Q Fever: an old but still a poorly understood disease. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2012;2012:131932.
59. Angelakis E, Raoult D. Q Fever. *Vet Microbiol*. 2010 Jan 27;140(3-4):297-309.
60. Harman JB. Q fever in Great Britain; clinical account of eight cases. *Lancet*. 1949 Dec 3;2(6588):1028-30.
61. Raoult D, Stein A. Q fever during pregnancy--a risk for women, fetuses, and obstetricians. *N Engl J Med*. 1994 Feb 3;330(5):371.
62. Osorio S, Sarria C, Gonzalez-Ruano P, Casal EC, Garcia A. Nosocomial transmission of Q fever. *J Hosp Infect*. 2003 Jun;54(2):162-3.
63. Brandão H, Vale LAR, Christovão DA. Investigações sobre a Febre "Q" em São Paulo. *Arq Fac Hig S Pub Univ São Paulo*. 1953;7(1):127-34.
64. Costa PS, Brigatte ME, Greco DB. Antibodies to *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, and *Ehrlichia chaffeensis* among healthy population in Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005 Dec;100(8):853-9.
65. Siciliano RF, Strabelli TM, Zeigler R, Rodrigues C, Castelli JB, Grinberg M, et al. Infective endocarditis due to *Bartonella* spp. and *Coxiella burnetii*: experience at a cardiology hospital in Sao Paulo, Brazil. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Oct;1078:215-22.
66. Siciliano RF, Ribeiro HB, Furtado RH, Castelli JB, Sampaio RO, Santos FC, et al. [Endocarditis due to *Coxiella burnetii* (Q fever): a rare or underdiagnosed disease? Case report]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008 Jul-Aug;41(4):409-12.
67. Lamas CC, Rozental T, Boia MN, Favacho AR, Kirsten AH, da Silva AP, et al. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in human immunodeficiency virus-positive patients in Jacarepagua, Rio de Janeiro, Brazil. *Clin Microbiol Infect*. 2009 Dec;15 Suppl 2:140-1.
68. Mares-Guia MA, Rozental T, Guterres A, Gomes R, Almeida DN, Moreira NS, et al. Molecular identification of the agent of Q fever - *Coxiella burnetii* - in domestic animals in State of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014 Mar-Apr;47(2):231-4.

69. Lemos ER, Rozental T, Mares-Guia MA, Almeida DN, Moreira N, Silva RG, et al. Q fever as a cause of fever of unknown origin and thrombocytosis: first molecular evidence of *Coxiella burnetii* in Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010 Jan;11(1):85-7.
70. Mares-Guia MA. Febre Q no Município de Itaboraí, Rio de Janeiro: um estudo sorológico e molecular em amostras humanas, de animais vertebrados e de artrópodes em área de ocorrência de caso. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2011.
71. Raoult D, Marrie T, Mege J. Natural history and pathophysiology of Q fever. *Lancet Infect Dis.* 2005 Apr;5(4):219-26.
72. Angelakis E, Billeter SA, Breitschwerdt EB, Chomel BB, Raoult D. Potential for tick-borne bartonellosis. *Emerg Infect Dis.* 2010 Mar;16(3):385-91.
73. Hartzell JD, Wood-Morris RN, Martinez LJ, Trotta RF. Q fever: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin Proc.* 2008 May;83(5):574-9.
74. Lang GH. Serosurvey of *Coxiella burnetii* infection in dairy goat herds in Ontario. A comparison of two methods of enzyme-linked immunosorbent assay. *Can J Vet Res.* 1988 Jan;52(1):37-41.
75. Woldehiwet Z. Q fever (coxiellosis): epidemiology and pathogenesis. *Res Vet Sci.* 2004 Oct;77(2):93-100.
76. Anderson A, Bijlmer H, Fournier PE, Graves S, Hartzell J, Kersh GJ, et al. Diagnosis and management of Q fever--United States, 2013: recommendations from CDC and the Q Fever Working Group. *MMWR Recomm Rep.* 2013 Mar 29;62(RR-03):1-30.
77. Fenollar F, Raoult D. Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms. *APMIS.* 2004 Nov-Dec;112(11-12):785-807.
78. Drancourt M, Tran-Hung L, Courtin J, Lumley H, Raoult D. *Bartonella quintana* in a 4000-year-old human tooth. *J Infect Dis.* 2005 Feb 15;191(4):607-11.
79. Raoult D, Dutour O, Houhamdi L, Jankauskas R, Fournier PE, Ardagna Y, et al. Evidence for louse-transmitted diseases in soldiers of Napoleon's Grand Army in Vilnius. *J Infect Dis.* 2006 Jan 1;193(1):112-20.

80. Kaiser PO, Riess T, O'Rourke F, Linke D, Kempf VA. *Bartonella* spp.: throwing light on uncommon human infections. *Int J Med Microbiol*. 2011 Jan;301(1):7-15.
81. Maguina C, Gotuzzo E. Bartonellosis. New and old. *Infect Dis Clin North Am*. 2000 Mar;14(1):1-22, vii.
82. Opavsky MA. Cat scratch disease: The story continues. *Can J Infect Dis*. 1997 Jan;8(1):43-9.
83. Mazur-Melewska K, Mania A, Kemnitz P, Figlerowicz M, Sluzewski W. Cat-scratch disease: a wide spectrum of clinical pictures. *Postep Dermatol Alergol*. 2015 Jun;32(3):216-20.
84. Brenner DJ, O'Connor SP, Winkler HH, Steigerwalt AG. Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the family Bartonellaceae from the order Rickettsiales. *Int J Syst Bacteriol*. 1993 Oct;43(4):777-86.
85. Birtles RJ, Harrison TG, Saunders NA, Molyneux DH. Proposals to unify the genera *Grahamella* and *Bartonella*, with descriptions of *Bartonella talpae* comb. nov., *Bartonella peromysci* comb. nov., and three new species, *Bartonella grahamii* sp. nov., *Bartonella taylorii* sp. nov., and *Bartonella doshiae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1995 Jan;45(1):1-8.
86. Breitschwerdt EB, Kordick DL. *Bartonella* infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. *Clin Microbiol Rev*. 2000 Jul;13(3):428-38.
87. Chomel BB, Kasten RW. Bartonellosis, an increasingly recognized zoonosis. *J Appl Microbiol*. 2010 Sep;109(3):743-50.
88. Kosoy M, Hayman DT, Chan KS. *Bartonella* bacteria in nature: where does population variability end and a species start? *Infect Genet Evol*. 2012 Jul;12(5):894-904.
89. Angelakis E, Raoult D. Pathogenicity and treatment of *Bartonella* infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2014 Jul;44(1):16-25.
90. Chomel BB, Boulouis HJ, Breitschwerdt EB. Cat scratch disease and other zoonotic *Bartonella* infections. *J Am Vet Med Assoc*. 2004 Apr 15;224(8):1270-9.

91. Billeter SA, Levy MG, Chomel BB, Breitschwerdt EB. Vector transmission of *Bartonella* species with emphasis on the potential for tick transmission. *Med Vet Entomol.* 2008 Mar;22(1):1-15.
92. Houpiikian P, Raoult D. Molecular phylogeny of the genus *Bartonella*: what is the current knowledge? *FEMS Microbiol Lett.* 2001 Jun 12;200(1):1-7.
93. Chomel BB, Boulouis HJ, Breitschwerdt EB, Kasten RW, Vayssier-Taussat M, Birtles RJ, et al. Ecological fitness and strategies of adaptation of *Bartonella* species to their hosts and vectors. *Vet Res.* 2009 Mar-Apr;40(2):1-22.
94. Pitassi LH, de Paiva Diniz PP, Scorpio DG, Drummond MR, Lania BG, Barjas-Castro ML, et al. *Bartonella* spp. bacteremia in blood donors from Campinas, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015 Jan;9(1):1-12.
95. Lamas CC, Mares-Guia MA, Rozental T, Moreira N, Favacho AR, Barreira J, et al. *Bartonella* spp. infection in HIV positive individuals, their pets and ectoparasites in Rio de Janeiro, Brazil: serological and molecular study. *Acta Trop.* 2010 Jul-Aug;115(1-2):137-41.
96. Crissiuma A, Favacho A, Gershony L, Mendes-de-Almeida F, Gomes R, Mares-Guia A, et al. Prevalence of *Bartonella* species DNA and antibodies in cats (*Felis catus*) submitted to a spay/neuter program in Rio de Janeiro, Brazil. *J Feline Med Surg.* 2011 Feb;13(2):149-51.
97. Staggemeier R, Venker CA, Klein DH, Petry M, Spilki FR, Cantarelli VV. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in cats in the south of Brazil: a molecular study. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010 Nov;105(7):873-8.
98. Diniz PP, Maggi RG, Schwartz DS, Cadenas MB, Bradley JM, Hegarty B, et al. Canine bartonellosis: serological and molecular prevalence in Brazil and evidence of co-infection with *Bartonella henselae* and *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*. *Vet Res.* 2007 Sep-Oct;38(5):697-710.
99. Fleischman DA, Chomel BB, Kasten RW, Andre MR, Goncalves LR, Machado RZ. *Bartonella clarridgeiae* and *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* exposure in captive wild canids in Brazil. *Epidemiol Infect.* 2015 Feb;143(3):573-7.

100. Favacho AR, Andrade MN, de Oliveira RC, Bonvicino CR, D'Andrea PS, de Lemos ER. Zoonotic Bartonella species in wild rodents in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Microbes Infect.* 2015 Nov-Dec;17(11-12):889-92.
101. Jacomo V, Kelly PJ, Raoult D. Natural history of Bartonella infections (an exception to Koch's postulate). *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002 Jan;9(1):8-18.
102. Kordick DL, Hilyard EJ, Hadfield TL, Wilson KH, Steigerwalt AG, Brenner DJ, et al. Bartonella clarridgeiae, a newly recognized zoonotic pathogen causing inoculation papules, fever, and lymphadenopathy (cat scratch disease). *J Clin Microbiol.* 1997 Jul;35(7):1813-8.
103. Biancardi AL, Curi AL. Cat-scratch disease. *Ocul Immunol Inflamm.* 2014 Apr;22(2):148-54.
104. Lin EY, Tsigrelis C, Baddour LM, Lepidi H, Rolain JM, Patel R, et al. Candidatus Bartonella mayotimonensis and endocarditis. *Emerg Infect Dis.* 2010 Mar;16(3):500-3.
105. Rymaszewska A, Grenda S. Bacteria of the genus Anaplasma – characteristics of Anaplasma and their vectors: a review. *Veterinarni Medicina.* 2008;53(11):573-84.
106. Woldehiwet Z. The natural history of Anaplasma phagocytophilum. *Vet Parasitol.* 2010 Feb 10;167(2-4):108-22.
107. Ristic M, Holland CJ, Khondowe M. An overview of research on ehrlichiosis. *Eur J Epidemiol.* 1991 May;7(3):246-52.
108. Vieira RF, Biondo AW, Guimaraes AM, Dos Santos AP, Dos Santos RP, Dutra LH, et al. Ehrlichiosis in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2011 Jan-Mar;20(1):1-12.
109. Anderson BE, Dawson JE, Jones DC, Wilson KH. Ehrlichia chaffeensis, a new species associated with human ehrlichiosis. *J Clin Microbiol.* 1991 Dec;29(12):2838-42.
110. Chen SM, Dumler JS, Bakken JS, Walker DH. Identification of a granulocytotropic Ehrlichia species as the etiologic agent of human disease. *J Clin Microbiol.* 1994 Mar;32(3):589-95.



111. Rar V, Golovljova I. Anaplasma, Ehrlichia, and "Candidatus Neoehrlichia" bacteria: pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. *Infect Genet Evol.* 2011 Dec;11(8):1842-61.
112. Ismail N, Bloch KC, McBride JW. Human ehrlichiosis and anaplasmosis. *Clin Lab Med.* 2010 Mar;30(1):261-92.
113. Pruneau L, Moumene A, Meyer DF, Marcelino I, Lefrancois T, Vachiere N. Understanding Anaplasmataceae pathogenesis using "Omics" approaches. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4:1-7.
114. Brouqui P, Matsumoto K. Bacteriology and Phylogeny of Anaplasmataceae In: Raoult D, Parola P, editors. *Rickettsial Disease*. New York: Informa healthcare; 2007. p. 179-98.
115. Rotondano TE, Almeida HK, Krawczak Fda S, Santana VL, Vidal IF, Labruna MB, et al. Survey of Ehrlichia canis, Babesia spp. and Hepatozoon spp. in dogs from a semiarid region of Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2015 Jan-Mar;24(1):52-8.
116. Goncalves LR, Filgueira KD, Ahid SM, Pereira JS, Vale AM, Machado RZ, et al. Study on coinfecting vector-borne pathogens in dogs and ticks in Rio Grande do Norte, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2014 Jul-Sep;23(3):407-12.
117. Ferreira RF, Cerqueira Ade M, Castro TX, O. FE, Neves FP, Barbosa AV, et al. Genetic diversity of Ehrlichia canis strains from naturally infected dogs in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2014 Jul-Sep;23(3):301-8.
118. Santos HA, Thome SM, Baldani CD, Silva CB, Peixoto MP, Pires MS, et al. Molecular epidemiology of the emerging zoonosis agent Anaplasma phagocytophilum (Foggie, 1949) in dogs and ixodid ticks in Brazil. *Parasit Vectors.* 2013;6:348.
119. Ramos RAN, Ramos CAN, Araújo FR, Melo ESP, Tembue AASM, Faustino MAG, et al. Detecção de anticorpos para Anaplasma sp. em pequenos ruminantes no semi-árido do estado de Pernambuco, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.* 2008;17:115-7.
120. Machado RZ, Andre MR, Werther K, de Sousa E, Gavioli FA, Alves Junior JR. Migratory and carnivorous birds in Brazil: reservoirs for Anaplasma and Ehrlichia species? *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2012 Aug;12(8):705-8.

121. Oliveira LS, Oliveira KA, Mourao LC, Pescatore AM, Almeida MR, Conceicao LG, et al. First report of *Ehrlichia ewingii* detected by molecular investigation in dogs from Brazil. *Clin Microbiol Infect*. 2009 Dec;15 Suppl 2:55-6.
122. Calic SB, Galvao MA, Bacellar F, Rocha CM, Mafra CL, Leite RC, et al. Human ehrlichioses in Brazil: first suspect cases. *Braz J Infect Dis*. 2004 Jun;8(3):259-62.
123. Costa PS, Valle LM, Brigatte ME, Greco DB. More about human monocytotropic ehrlichiosis in Brazil: serological evidence of nine new cases. *Braz J Infect Dis*. 2006 Feb;10(1):7-10.
124. Buller RS, Arens M, Hmiel SP, Paddock CD, Sumner JW, Rikhisa Y, et al. *Ehrlichia ewingii*, a newly recognized agent of human ehrlichiosis. *N Engl J Med*. 1999 Jul 15;341(3):148-55.
125. Dumler JS, Madigan JE, Pusterla N, Bakken JS. Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Clin Infect Dis*. 2007 Jul 15;45 Suppl 1:S45-51.
126. Thomas RJ, Dumler JS, Carlyon JA. Current management of human granulocytic anaplasmosis, human monocytic ehrlichiosis and *Ehrlichia ewingii* ehrlichiosis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2009 Aug;7(6):709-22.
127. Reeves WK, Streicker DG, Loftis AD, Dasch GA. Serologic survey of *Eptesicus fuscus* from Georgia, U.S.A. for *Rickettsia* and *Borrelia* and laboratory transmission of a *Rickettsia* by bat ticks. *J Vector Ecol*. 2006 Dec;31(2):386-9.
128. Cicuttin GL, Boeri EJ, Beltran FJ, Gury Dohmen FE. Molecular detection of *Neorickettsia risticii* in Brazilian free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*) from Buenos Aires , Argentina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2013;33:648-50.
129. Magalhães O, Rocha A. Sensibilidade dos morcegos aos vírus do Tifo Exantemático Neotrópico, no Brasil. *Brasil-Médico*. 1943;57:207-10.
130. Gardon J, Heraud JM, Laventure S, Ladam A, Capot P, Fouquet E, et al. Suburban transmission of Q fever in French Guiana: evidence of a wild reservoir. *J Infect Dis*. 2001 Aug 1;184(3):278-84.

131. Davoust B, Marie JL, Pommier de Santi V, Berenger JM, Edouard S, Raoult D. Three-toed sloth as putative reservoir of *Coxiella burnetii*, Cayenne, French Guiana. *Emerg Infect Dis.* 2014 Oct;20(10):1760-1.
132. Zhmaeva ZM, Pchelkina AA, Belashova VS. [Spontaneous infection of *Argas vespertilionis* with *Rickettsia burnetii* in the south of Kazakhstan]. *Med Parazitol (Mosk).* 1966 Sep-Oct;35(5):595-6.
133. Edouard S, Mahamat A, Demar M, Abboud P, Djossou F, Raoult D. Comparison between emerging Q fever in French Guiana and endemic Q fever in Marseille, France. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 2014 May;90(5):915-9.
134. Concannon R, Wynn-Owen K, Simpson VR, Birtles RJ. Molecular characterization of haemoparasites infecting bats (Microchiroptera) in Cornwall, UK. *Parasitology.* 2005 Oct;131(Pt 4):489-96.
135. Veikkolainen V, Vesterinen EJ, Lilley TM, Pulliainen AT. Bats as reservoir hosts of human bacterial pathogen, *Bartonella mayotimonensis*. *Emerg Infect Dis.* 2014 Jun;20(6):960-7.
136. Bai Y, Kosoy M, Recuenco S, Alvarez D, Moran D, Turmelle A, et al. *Bartonella* spp. in Bats, Guatemala. *Emerg Infect Dis.* 2011 Jul;17(7):1269-72.
137. Lilley TM, Veikkolainen V, Pulliainen AT. Molecular Detection of *Candidatus Bartonella hemsundetiensis* in Bats. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2015 Nov;15(11):706-8.
138. Anh PH, Van Cuong N, Son NT, Tue NT, Kosoy M, Woolhouse ME, et al. Diversity of *Bartonella* spp. in Bats, Southern Vietnam. *Emerg Infect Dis.* 2015 Jul;21(7):1266-7.
139. Judson SD, Frank HK, Hadly EA. *Bartonellae* are Prevalent and Diverse in Costa Rican Bats and Bat Flies. *Zoonoses Public Health.* 2015 Mar 23;62:609-17.
140. Olival KJ, Dittmar K, Bai Y, Rostal MK, Lei BR, Daszak P, et al. *Bartonella* spp. in a Puerto Rican bat community. *J Wildl Dis.* 2015 Jan;51(1):274-8.
141. Kamani J, Baneth G, Mitchell M, Mumcuoglu KY, Gutierrez R, Harrus S. *Bartonella* species in bats (Chiroptera) and bat flies (Nycteribiidae) from Nigeria, West Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2014 Sep;14(9):625-32.

142. Lin JW, Hsu YM, Chomel BB, Lin LK, Pei JC, Wu SH, et al. Identification of novel Bartonella spp. in bats and evidence of Asian gray shrew as a new potential reservoir of Bartonella. *Vet Microbiol.* 2012 Apr 23;156(1-2):119-26.
143. Reeves WK, Loftis AD, Gore JA, Dasch GA. Molecular evidence for novel bartonella species in Trichobius major (Diptera: Streblidae) and Cimex adjunctus (Hemiptera: Cimicidae) from two southeastern bat caves, U.S.A. *J Vector Ecol.* 2005 Dec;30(2):339-41.
144. Reeves WK, Rogers TE, Durden LA, Dasch GA. Association of Bartonella with the fleas (Siphonaptera) of rodents and bats using molecular techniques. *J Vector Ecol.* 2007 Jun;32(1):118-22.
145. Billeter SA, Hayman DT, Peel AJ, Baker K, Wood JL, Cunningham A, et al. Bartonella species in bat flies (Diptera: Nycteribiidae) from western Africa. *Parasitology.* 2012 Mar;139(3):324-9.
146. Magalhães O. Rickettsiasis no Brasil. *Bol Oficina Sanit Panam.* 1944;23:17-9.
147. Mares-Guia A, Moreira NS, Monteiro RV, Barreira J, Roque ALR. Técnicas de contenção química de pequenos mamíferos silvestres: princípios éticos e do bem-estar animal no campo. . In: Lemos ERS, D' Andrea PS, editors. Trabalho de Campo com animais: procedimentos, riscos e biossegurança. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2014. p. 95-103.
148. Hoover TA, Vodkin MH, Williams JC. A Coxiella burnetti repeated DNA element resembling a bacterial insertion sequence. *J Bacteriol.* 1992 Sep;174(17):5540-8.
149. Inokuma H, Raoult D, Brouqui P. Detection of Ehrlichia platys DNA in Brown Dog Ticks (Rhipicephalus sanguineus) in Okinawa Island, Japan. *J Clin Microbiol.* 2000 Nov;38(11):4219-21.
150. Edgar RC. Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(5):1792-7.
151. Cabral AD, D'Auria SR, Camargo MC, Rosa AR, Sodre MM, Galvao-Dias MA, et al. Seroepidemiology of Toxoplasma gondii infection in bats from Sao Paulo city, Brazil. *Vet Parasitol.* 2014 Dec 15;206(3-4):293-6.

152. Costa LJ, Andrade FA, Uieda W, Martorelli LF, Kataoka AP, Fernandes ME. Serological investigation of rabies virus neutralizing antibodies in bats captured in the eastern Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2013 Nov;107(11):684-9.
153. Reis NR, Fregonezi MN, Peracchi AD, Shibatta OA. *Morcegos do Brasil: guia de campo.* Rio de Janeiro: Technical Books; 2013.
154. Ejercito CLA, Cai L, Htwe KK, Taki M, Inoshima Y, Kondo T, et al. Serological Evidence of *Coxiella burnetii* Infection in Wild Animals in Japan. *J Wildl Dis.* 1993;29(3):481-4.
155. To H, Sakai R, Shirota K, Kano C, Abe S, Sugimoto T, et al. Coxiellosis in Domestic and Wild Birds From Japan. *J Wildl Dis.* 1998;34(2):310-6.
156. Ruiz-Fons F, Rodriguez O, Torina A, Naranjo V, Gortázar C, Fuente JDL. Prevalence of infection in wild and farmed ungulates. *Veterinary Microbiology.* 2007;16(1-3):282.
157. Cooper A, Stephens J, Ketheesan N, Govan B. Detection of *Coxiella burnetii* DNA in wildlife and ticks in northern Queensland, Australia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2013 Jan;13(1):12-6.
158. Marrie TJ, Schlech WF, 3rd, Williams JC, Yates L. Q fever pneumonia associated with exposure to wild rabbits. *Lancet.* 1986 Feb 22;1(8478):427-9.
159. Mares-Guia MA. *Febre Q no município de Itaboraí, Rio de Janeiro: pacientes suspeitos de dengue, animais domésticos, animais ilvestres e artrópodes.* Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2015.
160. Esberard CEL, Chagas AS, Luz EM, Carneiro RA, Martins LSF, Peracchi AL. On the biology of *Artibeus fimbriatus* Gray, 1838, from Rio de Janeiro state, Brasil (Chiroptera, Phyllostomidae). *Bol Soc Biol Concepción.* 1998;69:109-14.
161. Costa LM, Prata AFD, Moraes D, Conde CFV, Jordão-Nogueira T, Esberard CEL. Deslocamento de *Artibeus fimbriatus* sobre o mar. *Chiroptera Neotropical.* 2006;12(2):289-90.
162. Reis NR, Fregonezi MN, Peracchi AL, Rossaneis BK. Metapopulation in bats of Southern Brazil. *Braz J Biol.* 2012 Aug;72(3):605-9.
163. Bertola PB, Aires CC, Favorito SE, Graciolli G, Amaku M, Pinto-da-Rocha R. Bat flies (Diptera: Streblidae, Nycteribiidae) parasitic on bats (Mammalia: Chiroptera)

- at Parque Estadual da Cantareira, Sao Paulo, Brazil: parasitism rates and host-parasite associations. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005 Feb;100(1):25-32.
164. Duncan AW, Maggi RG, Breitschwerdt EB. Bartonella DNA in dog saliva. *Emerg Infect Dis*. 2007 Dec;13(12):1948-50.
165. Greenhall AM, Joermann G, Schimidt U. Mammalian Species: *Desmodus rotundus*. The American Society of Mammalogists. 1983;22:1-6.
166. Schneider MC, Romijn PC, Uieda W, Tamayo H, da Silva DF, Belotto A, et al. Rabies transmitted by vampire bats to humans: an emerging zoonotic disease in Latin America? *Rev Panam Salud Publica*. 2009 Mar;25(3):260-9.
167. Corrêa MMO, Lazar A, Dias D, Bonvicino CR. Quirópteros hospedeiros de zoonoses no Brasil. *Bol Soc Bras Mastozool*. 2013;67:23-38.
168. Luis AD, Hayman DT, O'Shea TJ, Cryan PM, Gilbert AT, Pulliam JR, et al. A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? *Proc Biol Sci*. 2013 Apr 7;280(1756):1-9.
169. Gettinger D, Gribel R. Spinturnicid mites (Gamasida: Spinturnicidae) associated with bats in central Brazil. *J Med Entomol*. 1989 Sep;26(5):491-3.
170. Dick C, Patterson B. Bat flies: Obligate ectoparasites of bats. In: Morand S, Krasnov B, Poulin R, editors. *Micromammals and Macroparasites*: Springer Japan; 2006. p. 179-94.

## 10 ANEXOS

**Anexo 1 - Licença para captura de Quirópteros referente ao projeto “Morcegos (Mammalia, Chiroptera) como indicadores de integridade biótica em uma área de tensão antrópica no Maciço da Pedra Branca”**  
**Licença para captura de Quirópteros referente ao projeto “Morcegos (Mammalia, Chiroptera) como indicadores de integridade biótica em uma área de tensão antrópica no Maciço da Pedra Branca”**

### Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 19037-1		Data da Emissão: 23/03/2009 21:41
Dados do titular		
Registro no Ibama: 507909	Nome: RICARDO MORATELUI MENDONÇA DA ROCHA	CPF: 069.189.147-82
Nome da Instituição: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ		CNPJ: 33.791.055/0001-35

#### Observações, ressalvas e condicionantes

1	As atividades de campo exercidas por pesquisadores ou práticos estrangeiros, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar fósseis, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passado, cedidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural, Área de Relevante Interesse Ecológico e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização.
4	Esta licença permanente não exime o seu titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
6	Este documento NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso).
8	O órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal poderá, a despeito da licença permanente e das autorizações concedidas pelo Ibama, estabelecer outras condições para a realização de pesquisas nessas unidades de conservação.
9	O titular da licença autorizada e os membros de sua equipe deverão optar por métodos de coleta e por unidades de coleta e armazenamento, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse e, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos, e entregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em conservação in situ.
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo Ibama e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
12	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
13	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico.
14	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexpostas ou ameaçadas de sobreexposição.

#### Taxons autorizados

Nº	Nível taxonômico	Taxon(s)
1	ORDEN	Chiroptera
2		

#### Destino do material biológico coletado

Nº	Nome local destino	Tipo Destino
1	UFRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO	coleta

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº 154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet ([www.ibama.gov.br/sisbio](http://www.ibama.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 18257917



Página 1/2



### Licença permanente para coleta de material zoológico

<b>Número: 19037-1</b>		<b>Data da Emissão: 23/03/2009 21:41</b>	
<b>Dados do titular</b>			
Registro no Ibama: 507909	Nome: RICARDO MORATELLI MENDONÇA DA ROCHA	CPF: 069.189.147-82	
Nome da Instituição: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ		CNPJ: 33.781.055/0001-35	

### Anexo para registrar Coletas Imprevistas de Material Biológico

De acordo com a Instrução Normativa Ibama nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Nível	Táxon*	Qrde.	Amostra	Qrde.	Data

\* Identificar a escelência do nível taxonômico mais apropriado possível

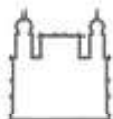
Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet ([www.ibama.gov.br/sisbio](http://www.ibama.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 18257917**



Página 2/2





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e  
Laboratórios de ReferênciaComissão de Ética  
no Uso de Animais

## LICENÇA

LW-68/12

Certificamos que o protocolo (P-62/11-3), intitulado "Morcegos (Mammalia, Chiroptera) como indicadores de integridade biótica em uma área de tensão antrópica no Maciço da Pedra Branca", sob a responsabilidade de RICARDO MORATELLI MENDONÇA DA ROCHA, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 27/08/2016 e inclui o uso total de :

*Chiroptera*

- 500 Machos.
- 500 Fêmeas.

Rio de Janeiro, 27 de agosto de 2012

Octavio Augusto França Presgrave  
Coordenador da CEUA

Octavio A. F. Presgrave  
Coordenador  
CEUA/FIOCRUZ  
SIAPE 04826550

Comissão de Ética no Uso de Animais  
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz  
Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Manguinhos - Rio de Janeiro / RJ  
Telefone: (21) 3862-9721 e-mail: ceua@fiocruz.br

**Anexo 2 - Licença para captura de Quirópteros referente ao projeto “Rede Bio M.A. inventário: padrões de diversidade biogeografia e endemismos de espécies de mamíferos, aves, anfíbios drosófilos e parasitas na Mata Atlântica”**



ESTADO DE SANTA CATARINA  
 FUNDAÇÃO DO MEIO AMBIENTE - FATMA  
 DIRETORIA DE PROTEÇÃO DOS ECOSISTEMAS - DPEC  
 GERÊNCIA DE UNIDADES DE CONSERVAÇÃO - GERUC  
 Rua Felipe Schmidt, 485 - Centro  
 CEP: 88041-870 - Florianópolis - SC  
 Fone: (0xx48) 3216-1358 Fax: (0xx48) 3216-1796  
 Mail: [www.fatma.sc.gov.br](mailto:www.fatma.sc.gov.br)

**AUTORIZAÇÃO AMBIENTAL – AUA**

**Nº043/2014/GERUC/DPEC**

A Fundação do Meio Ambiente – FATMA, no uso das suas atribuições, que a qualifica como órgão gestor das Unidades de Conservação Estaduais do estado de Santa Catarina, **autoriza a atividade abaixo descrita:**

**Identificação**

<b>Nome:</b>	<b>CPF/CNPJ:</b>
Rui Cerqueira Silva – Universidade Federal do Rio de Janeiro	211.775.487-34
<b>Endereço:</b>	<b>Localidade:</b>
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Biologia – Dpto de Ecologia, Laboratório de Vertebrados – Ilha do Fundão, Caixa-Postal 98020	=
<b>Bairro:</b>	<b>Município:</b>
	Rio de Janeiro/RJ
	<b>CEP:</b>
	21941-930

**Informações da Atividade**

**Atividade:**  
**Projeto de Pesquisa: “Rede Bio M.A. Inventários: Padrões de diversidade, biogeografia e endemismo de espécies de mamíferos, aves, anfíbios, drosófilos e parasitos na Mata Atlântica”.**  
**Localização:**  
 Parque Estadual da Serra do Tabuleiro.

- O projeto realizará inventários em quatro Sítios de Amostragem Integrados, localizados nas principais unidades biogeográficas da Mata Atlântica: Reserva Biológica Guaribas – PB, Área de Proteção Ambiental Pratiği – BA, Parque Nacional da Serra dos Órgãos – RJ e Parque Estadual da Serra do Tabuleiro – SC.
- Tem como principal objetivo realizar o inventário de espécies de quatro grupos taxonômicos: Mamíferos, Aves, Anfíbios e Drosophilídeos. Além disso, o presente projeto visa avaliar variações espaciais e temporais nas comunidades dos grupos taxonômicos estudados; Promover o incremento dos acervos de algumas das principais Coleções de Vertebrados do Brasil; Promover o estudo de zoonoses, em um componente voltado para a saúde humana e promover e atuar na formação de recursos humanos especializados.
- Está autorizado a coleta de 15 exemplares de pequenos mamíferos da ordem Rodentia, Didelphimorphia e Chiroptera no Parque Estadual da Serra do Tabuleiro, a ser realizado no município de Santo Amaro da Imperatriz/SC.
- Para a amostragem de pequenos mamíferos não voadores, serão utilizadas armadilhas do tipo Tomahawk e Sherman, assim como armadilhas de queda (pitfalls). Serão utilizadas armadilhas de diferentes tamanhos e características, distribuídas por meio de transectos lineares. Serão utilizados 8 transectos totais com 15 estações de captura separadas por 20m. Cada estação de captura será composta por uma armadilha Sherman e outra Tomahawk. Cada transecto terá 300m, estando separados por uma distância mínima de 500m, totalizando 1800m.
- No total serão utilizadas 210 armadilhas (110 tomahawks e 100 Shermans) por localidade amostrada. As armadilhas serão abertas por 10 noites consecutivas totalizando um esforço de 2.100 armadilhas-noites por campanha. Em cada localidade haverá duas campanhas, uma na estação chuvosa (2014) e outra na seca (2015). O esforço total das duas campanhas será de 4200 armadilhas-noite
- Também serão utilizadas armadilhas de queda ou fojos. Será realizado um esforço de 800 baldes-noite por campanha e 1600 baldes-noite somando as duas campanhas. Sendo estas abertas por 10 noites consecutivas. Os baldes serão dispostos em 4 transectos de 20 baldes separados por 10m.
- A captura de morcegos será feita com o uso de 10 redes de neblina (mistnets), armadilhas tipo harpa (trap traps) e busca ativa em abrigos com pupa e pinças. As redes serão examinadas em intervalos de aproximadamente 15 min, iniciando às 18h e encerrando após às 03h.
- Para captura de Drosophilídeos serão usadas armadilhas de retenção, contendo cerca de 100g de banana amassada como isca.
- Os pequenos mamíferos e morcegos coletados serão sacrificados com o uso de anestésico Ketamina e Acepromazina.
- Todos os pequenos mamíferos capturados terão sangue coletado para o diagnóstico sorológico de infecção

AUTORIZAÇÃO AMBIENTAL – AUA Nº 043/2014/GERUC/DPEC



**ESTADO DE SANTA CATARINA**  
**FUNDAÇÃO DO MEIO AMBIENTE - FATMA**  
 DIRETORIA DE PROTEÇÃO DOS ECOSISTEMAS – DP/EC  
 GERÊNCIA DE UNIDADES DE CONSERVAÇÃO – GERUC  
 Rua Felipe Schmidt, 483 – Centro  
 CEP 89014-900 – Florianópolis - SC  
 Fone: (flocx) 3216-1769 Fax: (flocx) 3216-1796  
 http://www.fatma.sc.gov.br

por tripanossomatídeos. Também serão verificados as presenças de Helmintos e Hantavírus

- 11 A responsabilidade técnica sobre o projeto apresentado é atribuída ao pesquisador requerente, Pro. Dr. Rui Cerqueira Silva - UFRJ, Prof. Dr. Pedro Cordeiro Estrela de Andrade Pinto – UFPA e Prof. Dr. Sérgio Luiz Athoff – FURG.
- 12 Os espécimes coletados de pequenos mamíferos e morcegos serão depositados na Fundação Universidade de Blumenau – FURB ou na Coleção de mamíferos da Universidade Federal de Paraíba – UFPB. Os Drosophilídeos serão depositados na Coleção Entomológica do Museu Paraense Emílio Goeldi.

#### Condições Específicas

- 1 Ficam autorizadas as atividades propostas no Projeto de Pesquisa;
- 2 A responsabilidade técnica sobre o projeto apresentado e sua execução são dos requerentes, que deverão comprovar sua habilitação quando abordado em campo pela fiscalização ambiental;
- 3 Os requerentes assumirão todos os riscos inerentes da atividade de pesquisa proposta, inclusive aquelas relacionados à logística de transporte, hospedagem, etc e demais contingências;
- 4 Esta Autorização Ambiental não permite captura, coleta, transporte e/ou soltura de fauna ou qualquer intervenção em área particular sem o consentimento do proprietário;
- 5 Tanto cópia do projeto de pesquisa, quanto esta autorização, deverão permanecer no local da atividade autorizada;
- 6 Não deverão ser autopsiados indivíduos de espécies com risco de extinção, conforme a Lista Estadual de Espécies de Fauna Ameaçadas de Extinção (Resolução Consema 92/2011);
- 7 Ao final do prazo de validade desta autorização o requerente deverá apresentar a esta Fundação relatório de atividades e/ou publicações originadas na atividade de pesquisa, incluindo as coordenadas geográficas dos pontos de captura. Ficando a renovação desta ou concessão de novas autorizações condicionadas a apresentação destes resultados, mesmo que preliminares. Esta condição se estende aos demais envolvidos na equipe de pesquisa, tais como orientadores ou co-autores.
- 8 Animais exóticos (cuja distribuição geográfica não inclui o território brasileiro) capturados não deverão ser reintroduzidos. Deve ser apresentada destinação adequada para esses animais. No caso de espécies invasoras deverá ser consultada a FATMA sobre a destinação aplicável.

#### Condições Gerais

- 1 A presente Autorização Ambiental viabiliza a atividade, quanto aos aspectos ambientais e não dispensa e nem substitui Alvarás ou Certidões de qualquer natureza, exigidas pelas Legislações Federal, Estadual ou Municipal.
- 2 Esta Autorização Ambiental não permite o corte ou supressão de áreas, florestas ou qualquer forma de vegetação da Mata Atlântica.

**Esta Autorização Ambiental é válida pelo período de 2(dois) anos a contar da presente data.**

**Local e data: Florianópolis, 08 de outubro de 2014.**

  
**Adriano Nunes**  
 Biólogo - CRBio 017337  
 Matr. 356.958-1

  
**Carlos Eduardo Soares**  
 Gerente de Unidade de Conservação - GERUC  
 Matrícula nº. 333358-1

**IMPORTANTE: Este documento deverá permanecer no local da atividade autorizada.**

AUTORIZAÇÃO AMBIENTAL – AnA Nº 043/2014GERUC/DP/EC