MAURÍCIO CLAUDIO HORTA

“ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DE *Rickettsia felis* EM ÁREAS
ENDÊMICAS E NÃO-ENDÊMICAS PARA FEBRE MACULOSA NO
ESTADO DE SÃO PAULO”

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Epidemiologia Experimental e Aplicada às
Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Medicina
Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às
Zoonoses

Orientador:

Profa. Dra. Teresinha Tizu Sato Schumaker

São Paulo

2006

DEDALUS - Acervo - FMVZ

11300028730

Patima Sato
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP

05/04/2006

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1673
FMVZ

Horta, Maurício Claudio

Estudo epidemiológico de *Rickettsia felis* em áreas endêmicas e não-endêmicas para febre maculosa no Estado de São Paulo / Maurício Claudio Horta. – São Paulo : M. C. Horta, 2006.

106 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2006.

Programa de Pós-graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Teresinha Tizu Sato Schumaker.

1. *Rickettsia felis*. 2. Pulga. 3. Febre maculosa. 4. Gambá.
5. Carrapatos. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo epidemiológico de *Rickettsia felis*, espécie patogênica do grupo da febre maculosa, em áreas endêmicas e não-endêmicas do Estado de São Paulo" Protocolo nº 301/2003, utilizando 60 gambás, 60 cães, 60 gatos e 60 cavalos, sob a responsabilidade da Profª Drª Teresinha Tizu Sato Schumaker, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Epidemiologic survey of *Rickettsia felis*, a pathogenic spotted fever group *Rickettsia*, in endemic and non-endemic areas of São Paulo State" protocol number 301/2003, utilizing 60 opossums, 60 dogs, 60 cats and 60 horses, under the responsibility of Profª Drª Teresinha Tizu Sato Schumaker, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Biotic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum").

São Paulo, 29 de abril de 2003

Profª Drª Julia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 38130900 - telefax : (55) (11) 3818-7438
e-mail: icbsedir@icb.usp.br

São Paulo, 22 de agosto de 2003

PARECER 495/CEP

Prezado Senhor,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua trigésima oitava reunião, realizada no dia 19 de agosto p.p., analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "Estudo Epidemiológico de *Rickettsia felis*, espécie patogênica do Grupo da Febre Maculosa, em áreas endêmicas e não endêmicas do Estado de São Paulo".

Informo que, após análise e discussão, o referido projeto, foi aprovado por esta Comissão.

Esclareço a V.Sa. que dentro de 12 meses, relatório do referido projeto deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. GERHARD MALNIC
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

Ilmo. Sr.

MAURÍCIO CLÁUDIO HORTA

Depto. de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia -USP

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS
DIRETORIA DE FAUNA E RECURSOS PESQUEIROS (DIFAP)
COORDENAÇÃO GERAL DE FAUNA (CGFAU)
LICENÇA PARA CAPTURA/COLETA /TRANSPORTE

NÚMERO DA LICENÇA

0145/2004 – CGFAU/LIC

Nº DE REGISTRO NO IBAMA

PERÍODO DE VALIDADE

11/08/2004 a 11/08/2005

PROCESSO IBAMA

02027.023912/2002

OBJETO:

- X CAPTURA E/OU COLETA DE ANIMAIS SILVESTRES/MATERIAL ZOOLOGICO
- X TRANSPORTE DE MATERIAL ZOOLOGICO
- COLETA E TRANSPORTE DE MATERIAL BOTÂNICO (PESQUISA CIENTÍFICA)
- TRANSPORTE DE PRODUTOS E SUBPRODUTOS DA FAUNA
- EXPOSIÇÃO E/OU CONCURSO DE ANIMAIS SILVESTRES
- MANUTENÇÃO DE ANIMAIS EM CATIVEIRO
- OUTROS:

FAVORECIDO:

- ZOOLOGICO
- X INSTITUIÇÃO CIENTÍFICA
- X PESQUISADOR
- EXPOSITOR/CONCURSO
- CRIADOURO COMERCIAL
- CRIADOURO CIENTÍFICO
- OUTROS:

FAVORECIDOS**NOME(S):** Maurício Cláudio Horta e Teresinha Tizu Sato Schumaker.**INSTITUIÇÃO:** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal.**ENDEREÇO:** Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, São Paulo, SP, 05508-000**RESPONSÁVEL PELA EXPEDIÇÃO:** Teresinha Tizu Sato Schumaker.**TRANSPORTADOR:** Os pesquisadores favorecidos.**MEIO DE TRANSPORTE:** Terrestre / Aéreo.**PROCEDÊNCIA/LOCAL DA CAPTURA/LOCAL DA PESQUISA:** Estado de São Paulo.**DESTINO DO MATERIAL:** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal.**LISTA DAS ESPÉCIES
QUANTIDADE / TIPO**

Captura, seguida de soltura, para marcação e
coleta de sangue e ectoparasitas
60 (sessenta) espécimes

NOME CIENTÍFICO*Didelphis sp.***NOME COMUM**

Gambá

OBSERVAÇÕES E CONDICIONANTES:

1. O responsável pela expedição deverá apresentar relatório de atividades ao término da validade desta licença.
2. O responsável pela expedição deverá encaminhar ao Ibama cópia dos frontispícios das publicações resultantes dos trabalhos decorrentes do uso dos espécimes objeto desta licença.
3. Esta licença não exime o pesquisador de cumprir o disposto na Medida Provisória Nº 2186-16/01 que dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético. No caso de acesso ao componente do patrimônio genético, este somente se dará mediante a autorização do Ibama, nos termos da Medida Provisória nº 2.186-16/2001 e Decretos nº 3.945/2001 e nº 4.946/2003.

LOCAL E DATA DE EMISSÃO

Brasília (DF), 11 de agosto de 2004.

AUTORIDADE EXPEDIDORA (ASSINATURA E CARIMBO)

Francisco Luiz Camara Iavares
Coordenador Geral de Fauna
Coordenador Substituto
Port. nº. 1.073 de 01/10/03

• ESTA LICENÇA NÃO AUTORIZA:

1. CAPTURA DE ESPÉCIES QUE CONSTEM NAS LISTAS OFICIAIS (FEDERAIS, ESTADUAIS E MUNICIPAIS) DA FAUNA E FLORA BRASILEIRA AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO, ESPÉCIES ENDÊMICAS OU RARAS, OU QUE CONSTEM NOS ANEXOS I DA CONVENÇÃO SOBRE O COMÉRCIO INTERNACIONAL DE ESPÉCIES DA FAUNA E DA FLORA AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO (CITES), SALVO QUANDO ESPECIFICADO;
 2. CAPTURA, COLETA E OU TRANSPORTE DE ESPÉCIMES DA FAUNA NAS ÁREAS DE INFLUÊNCIA DE EMPREENDIMENTOS SUJEITOS AO LICENCIAMENTO AMBIENTAL, CONFORME RESOLUÇÃO DO CONAMA DE Nº 237 DE 19/12/97, SALVO QUANDO ESPECIFICADO.
 3. CAPTURA DOS ESPÉCIMES DA FAUNA EM ÁREAS DE DOMÍNIO PRIVADO, SEM O CONSENTIMENTO DO PROPRIETÁRIO, ARRENDATÁRIO, POSSEIROU OU MORADOR DA ÁREA;
 4. CAPTURA, COLETA E OU TRANSPORTE DE ESPÉCIMES FAUNA EM UNIDADES DE CONSERVAÇÃO FEDERAIS, ESTADUAIS, DISTRITAIS OU MUNICIPAIS, SALVO QUANDO ACOMPANHADAS DO CONSENTIMENTO DO ÓRGÃO ADMINISTRADOR COMPETENTE;
 5. EXPORTAÇÃO DE MATERIAL ZOOLOGICO OU REMESSA (PARA O EXTERIOR) DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO.
- SÃO ISENTAS DE COBRANÇA DE TAXA (RECOLHIMENTO DE DR) INSTITUIÇÕES CIENTÍFICAS, PESQUISADORES E ZOOLOGICOS PÚBLICOS.
 - VÁLIDA SOMENTE SEM EMENDAS OU RASURAS.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: HORTA, Maurício Claudio

Título: Estudo epidemiológico de *Rickettsia felis* em áreas endêmicas e não-endêmicas para febre maculosa no Estado de São Paulo

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

Aos meus pais,

Ivone Claudio Horta;

Rubens Horta (*in memoriam*).

Aos meus irmãos,

Silvia Cristina Horta de Almeida,

Sandra Regina Horta Cardoso,

Sérgio Luis Horta,

Ana Paula Claudio Horta.

Sem eles, nada seria possível...

AGRADECIMENTOS I

- ✓ A Teresinha Tizu Sato Schumaker, pela orientação, paciência, compreensão e amizade depositadas em mim durante todos esses anos de convivência.
- ✓ Ao Marcelo Bahia Labruna, pela co-orientação, amizade, ensinamentos e incentivo durante todos os momentos da pesquisa.
- ✓ À Solange Maria Gennari, pelo reconhecimento, auxílio e confiança.
- ✓ Ao Fernando Ferreira, pela contribuição na discussão do trabalho e análise estatística dos resultados.
- ✓ Ao Fábio Gregori e Paulo Eduardo Brandão pela contribuição no trabalho, principalmente pelas sugestões na ocasião da qualificação.
- ✓ Ao prof. Pedro Marcos Linardi, pelo auxílio, principalmente em relação à identificação das pulgas.
- ✓ Ao prof. Edison Luiz Durigon e seus alunos, Dyana e Fábio, pelo fornecimento das células C6/36, fundamentais para o sucesso deste trabalho.
- ✓ Aos profs. Gilberto José de Moraes e Luciano Verdade, pelo apoio durante o trabalho de campo em Piracicaba.
- ✓ Ao prof. Leonardo Richtzenhain, responsável pelo laboratório de biologia molecular, onde parte da pesquisa foi desenvolvida.
- ✓ Ao prof. Rodrigo Martins Soares, pelo apoio técnico e científico.
- ✓ Ao prof. Luiz Jacintho da Silva (UNICAMP), pelo apoio científico.

AGRADECIMENTOS II

- ✓ Ao Celso Eduardo Souza e Elias José Rodrigues Neto (SUCEN), pelo fornecimento de soro positivo de gambá, utilizado nas RIFIs.
- ✓ Aos bons samaritanos que me ajudaram nas colheitas de materiais a campo: Adriano Pinter, Alexandre Ataliba, Maria Cristina Bataglioli, Daniel Aguiar, Marcelo Nardi, Patrícia Bertola, Paula Martin.
- ✓ Às enfermeiras e técnicas de enfermagem que auxiliaram na colheita de sangue das pessoas: Eneide Maria Bonaldo (Pedreira); Marisa Vicente da Silva Lopes (Piracicaba), Isabel Luiza de Faria Cid (Mogi das Cruzes), Fabiana Monteiro Macatrozzo (Pirassununga) e Daniele Cardoso Carrasco (São Paulo).
- ✓ À Hilda Pena, pela ajuda, apoio e documentação fotográfica.
- ✓ À equipe do Laboratório de Sequenciamento de DNA (ICB2), Fabiana Cristina Pereira dos Santos, Camila, Juncansen, Daniele Barbosa de Souza, Fernanda Christtanini Koyama.
- ✓ Aos amigos Adriano Pinter, Daniel Moura de Aguiar, Richard de Campos Pacheco, Ricardo Cabrera, Alexandre Ataliba, Iara Silveira; do Laboratório de Doenças Parasitárias II (Carrapatos), cuja convivência harmoniosa foi fundamental não só para a conclusão dos trabalhos práticos, como também para a manutenção da minha saúde física e mental.
- ✓ Ao grupo “*Neospora*”, do Laboratório de Doenças Parasitárias I: Alessandra Ragozzo, Aline Rodrigues, Renata Moreira, Silvio Pereira e Tatiana Ueno.
- ✓ Às minhas amigas: Patrícia Marques Ferreira, pela assessoria em assuntos aleatórios; Daniela Pontes Chiebao, pelo interesse e ajuda nos trabalhos práticos; Renata Paixão, pela paciência e ajuda na fase final do trabalho.

AGRADECIMENTOS III

- ✓ À equipe de apoio na cidade de Pedreira/SP: Maria Rita do Nascimento Rodrigues, Maria Cristina Bataglioli, Lília Gouveia Teixeira Pires, Nadir Perin.
- ✓ Aos proprietários e moradores das propriedades onde foram realizadas as pesquisas de campo: Eduardo Pupo, Elza Pessoti Sartori, Jorge Andre Ferreira (Pedreira), Domingos Rocco (Mogi das Cruzes).
- ✓ À Prefeitura do Campus da ESALQ/USP, na pessoa do prefeito Marcos Folegatti, que apoiou parte do projeto desenvolvido em Piracicaba.
- ✓ À equipe de apoio na cidade de Piracicaba: Lázaro, Paula S. Martin.
- ✓ À Prefeitura Campus de Pirassununga.
- ✓ À equipe de apoio na cidade de São Paulo: Eudina Barata (SUCEN), Andrea Podolski (Bicho no Parque), Silvio Luis França, Keiko Ichi Silveira (SESC-Interlagos).
- ✓ A Maria Eugênia Summa, Francis Rossi, Vilma Geraldi e Adriana Joppert (DEPAVE/SP), pelo auxílio na manipulação e colheita de sangue dos gambás.
- ✓ A Elza Faquim pela atenção e revisão do volume final na biblioteca.
- ✓ Às pessoas que, voluntariamente, doaram seu sangue e contribuíram para os avanços da pesquisa da febre maculosa brasileira.
- ✓ Aos animais que participaram desse projeto, que, mesmo contra vontade, cederam materiais biológicos para a pesquisa.
- ✓ À FAPESP - Processos 02/10759-0 e 03/04728-7, pelo auxílio financeiro.

RESUMO

HORTA, M. C. **Estudo epidemiológico de *Rickettsia felis* em áreas endêmicas e não-endêmicas para febre maculosa no Estado de São Paulo.** [Epidemiologic study of *Rickettsia felis* in endemic and non-endemic areas for spotted fever in the State of São Paulo]. 2006. 106 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Estudos recentes demonstraram a existência de *Rickettsia felis*, riquetsia do Grupo da Febre Maculosa, em sangue de pacientes com quadro clínico compatível com a doença e em pulgas infectadas. Este projeto visa determinar a prevalência de *R. felis* em vetores (pulgas e carrapatos) e em potenciais reservatórios (gambás, cães, gatos, eqüinos e humanos), procedentes de áreas endêmicas (Mogi das Cruzes, Pedreira, Piracicaba e São Paulo), e não endêmicas (Pirassununga) para FM no Estado de São Paulo. Foram utilizados métodos moleculares (reação em cadeia pela polimerase e sequenciamento de DNA), diagnóstico sorológico e cultivo celular. Em gambás capturados (*Didelphis aurita* e *Didelphis albiventris*) foram colhidas 312 pulgas, pertencentes às Famílias Pulicidae (141), Rhopalopsyllidae (170) e Ctenophthalmidae (1) e 709 carrapatos (*Amblyomma* spp e *Ixodes loricatus*). Nos cães foram colhidos 212 pulgas (*Ctenocephalides felis felis*) e 115 carrapatos (*Amblyomma cajennense*, *Amblyomma aureolatum* e *Rhipicephalus sanguineus*). Nos gatos foram colhidos 66 pulgas (59 *C. felis felis* e 7 *Rhopalopsyllus lutzi lutzi*) e 10 carrapatos (*R. sanguineus* e *Amblyomma* spp). A colheita de sangue foi realizada em 94 gambás, 55 cães, 25 gatos, 85 eqüinos e 238 humanos. *Rickettsia felis* foi detectada em 42-45,8% das pulgas *C. felis felis* de gambás, cães e gatos; em 4% das pulgas *Polygenis (N) atopus* de gambás e em 1,8% e 0,7% de carrapatos *I. loricatus* e *Amblyomma* spp, respectivamente, colhidos de gambás. *Rickettsia bellii* foi detectada em carrapatos *I. loricatus* (59,1%), *A. dubitatum* (8,7%) e *Amblyomma* spp (0,9%) e em uma pulga *P. (N.) atopus* (1%). Não foi possível a detecção de infecção por *Rickettsia* spp em sangue dos animais e humanos. Contudo, constatou-se presença anticorpos frente aos antígenos de *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri*, *R. felis* e *R. bellii* nas áreas estudadas. A titulação obtida sugere infecção por *R. rickettsii* em gambás, cães, eqüinos e humanos e por *R. parkeri* em gambás, cães e eqüinos. *R. felis* e *R. bellii* foram isoladas e cultivadas com a utilização de células C6/36 e VERO, respectivamente.

Palavras-chave: *Rickettsia felis*. Febre maculosa. Gambá. Pulga. Carrapatos.

ABSTRACT

HORTA, M. C. **Epidemiologic study of *Rickettsia felis* in endemic and non-endemic areas for spotted fever in the State of São Paulo.** [Estudo epidemiológico de *Rickettsia felis* em áreas endêmicas e não-endêmicas para febre maculosa no Estado de São Paulo]. 2006. 106 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Recent studies have showed the presence of *Rickettsia felis*, a spotted fever group *Rickettsiae*, in human blood with clinical signs compatible with spotted fever and in infected fleas. This work aims to determine the prevalence of *R. felis* in potential vectors (fleas and ticks) and reservoirs (opossums, dogs, cats, equines and humans) from endemic (Mogi das Cruzes, Pedreira, Piracicaba e São Paulo), and non-endemic (Pirassununga) areas for spotted fever in the State of São Paulo. Molecular probes (polimerase chain reaction and DNA sequencing), serologic diagnoses and cell culture were used. From trapped opossums (*Didelphis aurita* and *Didelphis albiventris*) a total of 312 fleas, belonging to Family Pulicidae (141), Rhopalopsyllidae (170) and Ctenophthalmidae (1) and 709 ticks (*Amblyomma* spp and *Ixodes loricatus*) were collected. On dogs a total of 212 fleas (*Ctenocephalides felis felis*) and 115 ticks (*Amblyomma cajennense*, *Amblyomma aureolatum* and *Rhipicephalus sanguineus*) were collected. On cats, 66 fleas (59 *C. felis felis* and 7 *Rhopalopsyllus lutzi lutzi*) and 10 ticks (*R. sanguineus* and *Amblyomma* spp) were collected. Blood samples were collected from 94 opossums, 55 dogs, 25 cats, 85 equines and 238 humans. *Rickettsia felis* was detected in 42-45,8% of the *C. felis felis* collected on opossums, dogs and cats. This same *Rickettsia* species was detected in 4% of *Polygenis (N.) atopus* fleas, and 1,8% and 0,7% of *I. loricatus* and *Amblyomma* spp ticks, respectively, collected from opossums. *Rickettsia bellii* was found in ticks *I. loricatus* (59,1%), *A. dubitatum* (8,7%) and *Amblyomma* spp (0,9%) and in a flea *P. (N.) atopus* (1%). No *Rickettsia* DNA was detected in animal or human blood samples. However antibodies against *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri*, *R. felis* and *R. bellii* were detected in all locations. The titers suggest infection by *R. rickettsii* in opossums, dogs, equines and humans and by *R. parkeri* in opossums, dogs and equines. *R. felis* and *R. bellii* were isolated and cultivated with the C6/36 and VERO cells, respectively.

Key words: *Rickettsia felis*. Spotted fever. Opossum. Flea. Ticks.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

- Figura 1 – Distribuição dos casos e febre maculosa no Estado de São Paulo: 1985-2005. CVE, 2006. Em destaque: áreas de estudos: (a) Pedreira, (b) Piracicaba, (c) Mogi das Cruzes, (d) São Paulo, (e) Pirassununga 31
- Figura 2 – Sítios de Colheita: (a) Pedreira, (b) Piracicaba, (c) Mogi das Cruzes, (d) São Paulo, (e) Pirassununga 33
- Figura 3 – (a) *Didelphis aurita* (gambá de orelha preta). Pedreira/SP – 2004; (b) *Didelphis albiventris* (gambá de orelha branca). Piracicaba/SP – 2003 46
- Figura 4 – Soro de gambá reagente ao antígeno de *R. felis* na reação de imunofluorescência indireta 56
- Figura 5 – (a), (b) células C6/36 infectadas com *Rickettsia felis* cepa PEDREIRA, coradas com fucsina e verde malaquita; (c), (d) células VERO infectadas com *R. bellii* cepa IXODES, coradas com fucsina e verde malaquita 62

QUADROS

- Quadro 1 – Número de amostras de sangue colhidas por município estudado . 47

TABELAS

- Tabela 1 – “Primers” utilizados para identificação gênica de riquetsias 38
- Tabela 2 – Pulgas colhidas sobre gambás em municípios do Estado de São Paulo, 2003-2006 48
- Tabela 3 – Pulgas colhidas sobre cães e gatos em municípios do Estado de São Paulo, 2003-2006 48
- Tabela 4 – Carrapatos colhidos sobre gambás em municípios do Estado de São Paulo, 2003-2006 49

Tabela 5	– Carrapatos colhidos sobre cães em municípios do Estado de São Paulo, 2003-2006	50
Tabela 6	– Carrapatos colhidos sobre gatos em municípios do Estado de São Paulo, 2003-2006	50
Tabela 7	– Pulgas positivas na PCR, para o gene <i>gltA</i> , colhidas sobre gambás capturados no Estado de São Paulo	51
Tabela 8	– Pulgas positivas na PCR, para o gene <i>gltA</i> , colhidas sobre cães e gatos no Estado de São Paulo	51
Tabela 9	– Carrapatos positivos na PCR, para o gene <i>gltA</i> , colhidos sobre gambás capturados no Estado de São Paulo	52
Tabela 10	– Amostras de DNA de riquetsias seqüenciadas em carrapatos positivos na PCR, para o gene <i>gltA</i> , colhidos sobre gambás capturados no Estado de São Paulo	53
Tabela 11	– Grau de identidade calculado para cada par de seqüências de nucleotídeos, entre as amostras de pulgas obtidas, através do sequenciamento de DNA (gene <i>gltA</i> , 350 pb) e seqüências de <i>Rickettsia</i> spp do GenBank	54
Tabela 12	– Grau de identidade calculado para cada par de seqüências de nucleotídeos, entre as amostras de carrapatos obtidas, através do sequenciamento de DNA (gene <i>gltA</i> , 350 pb) e seqüências de <i>Rickettsia</i> spp do GenBank	54
Tabela 13	– Grau de identidade calculado para cada par de seqüências de nucleotídeos, entre uma amostra <i>pool</i> de carrapatos <i>Amblyomma</i> spp colhida sobre gambá, através do sequenciamento de DNA (gene <i>gltA</i> , 350 pb) e seqüências de <i>Rickettsia</i> spp do GenBank	55
Tabela 14	– Presença de anticorpos anti- <i>Rickettsia</i> spp em gambás do Estado de São Paulo, através da reação de imunofluorescência indireta	56
Tabela 15	– Presença de anticorpos anti- <i>Rickettsia</i> spp em cães do Estado de São Paulo, através da reação de imunofluorescência indireta	57
Tabela 16	– Presença de anticorpos anti- <i>Rickettsia</i> spp em gatos do Estado de São Paulo, através da reação de imunofluorescência indireta	57
Tabela 17	– Presença de anticorpos anti- <i>Rickettsia</i> spp em eqüinos do Estado de São Paulo, através da reação de imunofluorescência indireta	58
Tabela 18	– Presença de anticorpos anti- <i>Rickettsia</i> spp em humanos do Estado de São Paulo, através da reação de imunofluorescência indireta ..	58

Tabela 19	–	Títulos de anticorpos anti- <i>Rickettsia</i> spp através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), em gambás, cães, eqüinos e humanos, de cinco áreas do estado de São Paulo para quatro espécies de <i>Rickettsia</i>	59
Tabela 20	–	Grau de identidade calculado para cada par de seqüências de nucleotídeos, entre <i>Rickettsia felis</i> cepa PEDREIRA isolada de pulgas <i>Ctenocephalides felis felis</i> de cães, através do sequenciamento de DNA (gene <i>gltA</i>, 1.070 pb) e seqüências de <i>Rickettsia</i> spp do GenBank. 2006	63
Tabela 21	–	Grau de identidade calculado para cada par de seqüências de nucleotídeos, entre <i>Rickettsia felis</i> cepa PEDREIRA isolada de pulgas <i>Ctenocephalides felis felis</i> de cães, através do sequenciamento de DNA (gene <i>17kDa</i>, 376 pb) e seqüências de <i>Rickettsia</i> spp do GenBank. 2006	64
Tabela 22	–	Grau de identidade calculado para cada par de seqüências de nucleotídeos, entre <i>Rickettsia felis</i> cepa PEDREIRA isolada de pulgas <i>Ctenocephalides felis felis</i> de cães, através do sequenciamento de DNA (gene <i>OmpB</i>, 703 pb) e seqüências de <i>Rickettsia</i> spp do GenBank. 2006	65
Tabela 23	–	Grau de identidade calculado para cada par de seqüências de nucleotídeos, entre <i>Rickettsia bellii</i> cepa IXODES isolada de carrapato <i>Ixodes loricatus</i> de gambá, através do sequenciamento de DNA (gene <i>gltA</i>, 1.109 pb) e seqüências de <i>Rickettsia</i> spp do GenBank. 2006	66
Tabela 24	–	Grau de identidade calculado para cada par de seqüências de nucleotídeos, entre <i>Rickettsia bellii</i> cepa IXODES isolada de carrapato <i>Ixodes loricatus</i> de gambá, através do sequenciamento de DNA (gene <i>17kDa</i>, 376 pb) e seqüências de <i>Rickettsia</i> spp do GenBank. 2006	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GT	=	Grupo do Tifo
GFM	=	Grupo das Febres Maculosa
GA	=	Grupo Ancestral
FMB	=	Febre Maculosa Brasileira
EUA	=	Estados Unidos da América
ESALQ	=	Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
FMVZ	=	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
USP	=	Universidade de São Paulo
CVE	=	Centro de Vigilância Epidemiológica
SUCEN	=	Superintendência de Controle de Endemias
DEPAVE	=	Departamento de Parques e Áreas Verdes
B.O.D.	=	<i>Biological Oxygen Demand</i>
PCR	=	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em Cadeia pela Polimerase
DNA	=	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> - Ácido Desoxirribonucléico
rRNA	=	<i>Ribonucleic Acid</i> - Ácido Ribonucléico Ribossômico
Taq	=	<i>Thermus aquaticus</i>
OmpA	=	<i>Outer membrane protein A</i> - proteína externa de membrana A
OmpB	=	<i>Outer membrane protein B</i> - proteína externa de membrana B
gltA	=	gene citrato sintase
RIFI	=	Reação de Imunofluorescência Indireta

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (CONTINUAÇÃO)

SFB	=	Soro fetal bovino
SBB	=	Soro de bezerro bovino
EDTA	=	ácido etileno-diamino-tetracético
TBE	=	tris-borato-EDTA
TE	=	tampão TRIS HCl-EDTA
TRIS	=	tris(hidroximetil)amino metano
PBS	=	<i>Phosphate Buffered Saline solution</i> – Solução fosfato tamponada
GPS	=	<i>Gobal Position System</i>
pb	=	pares de bases
et al.	=	e colaboradores

OBS: Algumas abreviaturas seguem as iniciais de sua grafia no idioma inglês, visto terem seu uso consagrado na literatura técnica.

LISTA DE SÍMBOLOS

cm = centímetros

mm = milímetros

°C = graus Celcius

M = molar

mM = mili molar

U = unidades

g = grama

μg = micrograma

mL = mililitro

μL = microlitro

μm = micrometro

x *g* = múltiplos da gravidade terrestre (9,81 m/s²)

kDa = kilodalton

pH = potencial hidrogeniônico

min = minutos

seg = segundos

% = por cento

= = igual

≈ = semelhante

≅ = aproximadamente

> = maior

≥ = maior ou igual

® = marca registrada

x = vezes

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	OBJETIVOS	30
3	MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1	LOCAL DE ESTUDO	31
3.1.1	Grupo 1 – Áreas com Casos Confirmados de Febre Maculosa	32
3.1.2	Grupo 2 - Área sem Casos Confirmados de Febre Maculosa	33
3.2	CAPTURA DE GAMBÁS	34
3.3	COLHEITA DE SANGUE	35
3.4	COLHEITA DE ECTOPARASITOS	35
3.4.1	Pulgas	35
3.4.2	Carrapatos	36
3.5	PESQUISA DE RIQUETSIAS EM POTENCIAIS VETORES	37
3.5.1	Extração de DNA	37
3.5.2	Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	37
3.5.3	Purificação e Sequenciamento de DNA	39
3.6	PESQUISA DE RIQUETSIAS EM POTENCIAIS HOSPEDEIROS VERTEBRADOS	40
3.6.1	Produção de Lâminas de Antígeno	40
3.6.2	Reação de Imunofluorescência Indireta	41
3.6.2	Extração de DNA	42
3.6.3	PCR, Purificação e Sequenciamento de DNA	42

SUMÁRIO (CONTINUAÇÃO)

3.7	CULTIVO CELULAR	42
3.7.1	Células VERO	43
3.7.2	Células C6/36	43
3.7.3	Isolamento de <i>Rickettsia felis</i>	43
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
4	RESULTADOS	46
4.1	CAPTURA E IDENTIFICAÇÃO DE GAMBÁS	46
4.2	COLHEITA DE SANGUE	47
4.3	COLHEITA DE ECTOPARASITOS	47
4.3.1	Pulgas	47
4.3.2	Carrapatos	48
4.4	PESQUISA DE RIQUEÍSIAS EM POTENCIAIS VETORES	50
4.4.1	Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	50
4.4.2	Sequenciamento de DNA	52
4.5	PESQUISA DE RIQUEÍSIAS EM POTENCIAIS HOSPEDEIROS	55
4.5.1	Imunofluorescência indireta	55
4.5.1.1	Gambás	55
4.5.1.2	Cães	56
4.5.1.3	Gatos	57
4.5.1.4	Eqüinos	57
4.5.1.4	Humanos	58
4.5.1.5	Análise dos títulos de anticorpos	58

SUMÁRIO (CONTINUAÇÃO)

4.5.2	Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	60
4.6	CULTIVO CELULAR	60
4.6.1	Isolamento de <i>Rickettsia felis</i>	60
4.6.2	Isolamento de <i>Rickettsia bellii</i>	61
5	DISCUSSÃO	68
6	CONCLUSÕES	77
	REFERÊNCIAS	79
	APÊNDICES	90

1 INTRODUÇÃO

As doenças causadas por riquetsias estão amplamente distribuídas pelo mundo em focos endêmicos e geralmente aparecem em intervalos esporádicos, re-emergindo de forma epidêmica na população humana (AZAD; BEARD, 1998). As riquetsioses estão associadas a diversos artrópodes, incluindo piolhos, pulgas, carrapatos e outros ácaros (RAOULT; ROUX, 1997). A interação dessas bactérias, tanto com hospedeiros vertebrados (reservatórios ou suscetíveis) como com seus vetores, constitui um excelente modelo de estudo do complexo hospedeiro-parasita. A interação do agente com artrópodes que se alimentam de sangue representa um importante passo na evolução biológica dos organismos. As relações íntimas das riquetsias com os vetores são caracterizadas pela eficiência de sua multiplicação e estabelecimento no artrópode, transmissão transestadial e transovariana e, ainda, pela sua distribuição geográfica e ecológica. As riquetsias diferem consideravelmente em termos do vetor, distribuição geográfica e virulência (AZAD; BEARD, 1998).

O gênero *Rickettsia* é composto pelo “Grupo do Tifo” (GT) e pelo “Grupo da Febre Maculosa” (GFM). Um terceiro grupo, denominado “Grupo Ancestral” (GA), foi proposto por Sekeyova, Roux e Raoult (2001), e inclui *Rickettsia canadensis* e *Rickettsia bellii*, bactérias de patogenicidade ainda desconhecida. O GT inclui *Rickettsia prowazekii*, causadora do tifo epidêmico, e *Rickettsia typhi*, agente do tifo endêmico ou tifo murino (EREMEEVA; DASCH, 2000). O GFM é constituído por mais de 30 espécies, dentre as quais pelo menos 15 causam diferentes doenças ao homem (*Rickettsia aeschlimannii*, *Rickettsia africae*, *Rickettsia akari*, *Rickettsia*

australis, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia felis*, *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia honei*, *Rickettsia japonica*, *Rickettsia marmionii*, *Rickettsia mongolotimonae*, *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia sibirica*, *Rickettsia slovaca*). Com exceção de *R. akari* e *R. felis* transmitidas por pequenos ácaros e pulgas, respectivamente, todas as outras representantes desse grupo são veiculadas por carrapatos (BROUQUI et al., 2004; RAOULT; ROUX, 1997; RAOULT et al., 2002; SEKEYOVA; ROUX; RAOULT, 2001).

No Brasil, a doença causada por riquetsias do GFM é denominada Febre Maculosa Brasileira (FMB), tendo sido notificada em todos os estados da região Sudeste do país (DIAS; MARTINS, 1939; SEXTON et al., 1993). Os casos comprovados da doença com transmissão por carrapatos do gênero *Amblyomma* são conhecidos desde a década de 30. A doença é causada pela bactéria *Rickettsia rickettsii*; contudo, com o avanço das pesquisas, principalmente no âmbito da biologia molecular, outras riquetsias foram caracterizadas nos últimos anos na região Sudeste, como *Rickettsia bellii* e *Rickettsia* sp ($\approx$ *Rickettsia parkeri*) em carrapatos *Amblyomma dubitatum* (antigo *Amblyomma cooperi*) (LABRUNA et al., 2004a); *R. bellii* em *Amblyomma aureolatum* (PINTER, 2003); *R. parkeri* em *Amblyomma triste* (SILVEIRA et al., 2005); e *R. felis*, em pulgas *Ctenocephalides felis felis* (HORTA et al., 2005d; OLIVEIRA et al., 2002,) e em carrapatos *Amblyomma* spp (CARDOSO et al., 2006; HORTA, 2002; PINTER, 2003; VIANNA, 2002). Na região Norte do país, *R. bellii* e *R. amblyommii* foram caracterizadas em carrapatos do gênero *Amblyomma* (LABRUNA et al., 2004b) e *R. rhipicephali* em carrapatos *Haemaphysalis juxtakochi* (LABRUNA et al., 2005a). Em humanos, até o presente momento, somente a *R. rickettsii* foi isolada e caracterizada, oriunda de pacientes de diferentes localidades do Estado de São Paulo (GEHRKE et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2005).

Das 2.000 espécies e sub-espécies de pulgas existentes no mundo, apenas algumas atuam como vetores de doenças humanas, tais como a peste bubônica ou peste negra (*Yersinia pestis*), tifo murino (*R. typhi*), riquetsiose felis (*R. felis*) e doença da arranhadura do gato (*Bartonella henselae*). Vários agentes transmitidos pelas pulgas são mantidos em um ciclo zoonótico envolvendo mamíferos como hospedeiros naturais, tais como roedores, cães e gatos selvagens, gambás, guaxinins e esquilos. Esses vetores são trazidos para o interior das casas por animais domésticos. Contudo, essas doenças tornam-se epidêmicas, nas populações humanas, apenas quando há uma diminuição populacional desses hospedeiros naturais, fazendo com que as pulgas passem a procurar outras fontes de alimento, tornando o homem um hospedeiro acidental (AZAD et al., 1997).

Rickettsia felis já foi descrita em todos os continentes. Inicialmente denominada “agente ELB” (Els Labs, Soquel, CA), foi observada pela primeira vez em tecidos da pulga do gato (*Ctenocephalides felis* Bouché) através de microscopia eletrônica nos EUA (ADAMS; SCHMIDTMAN; AZAD, 1990). O nome *Rickettsia felis* (de *Felis domesticus*, o gato doméstico) foi proposto, em 1996, quando a sua diferença com outras riquetsias do mesmo gênero foi esclarecida (HIGGINS et al., 1996). O agente foi associado a casos clínicos de febre maculosa em pacientes no Texas (EUA), inicialmente suspeitos de terem contraído tifo murino (SCHRIEFER et al., 1994a). Embora a doença em humanos causada por *R. felis* seja clinicamente semelhante à causada por *R. rickettsii*, suspeita-se que o primeiro agente deva ser menos virulento, dada a ausência de relatos de casos letais. Classicamente, *R. rickettsii* é reconhecida, desde o início do século passado, como responsável pela alta letalidade dos casos clínicos em humanos não tratados (DIAS; MARTINS, 1939; ZAVALA-VELÁZQUEZ et al., 2000). Além dos EUA, casos humanos de febre

maculosa, causados por *R. felis*, foram notificados no México (ZAVALA-VELÁZQUEZ et al., 2000), Brasil, França (RAOULT et al., 2001), Alemanha (RICHTER et al., 2002) e Tailândia (PAROLA et al., 2003).

Paralelamente, o agente foi detectado em pulgas nos EUA (ADAMS; SCHMIDTMAN; AZAD, 1990; HIGGINS et al., 1994), México (ZAVALA-VELAZQUEZ et al., 2002), Brasil (HORTA et al., 2005d; OLIVEIRA et al., 2002), Peru (BLAIR et al., 2004), Uruguai (VENZAL et al., 2005), Espanha (MÁRQUEZ et al., 2002), Reino Unido (KENNY et al., 2003; SHAW et al., 2004), Tailândia (PAROLA et al., 2003), Nova Zelândia (KELLY et al., 2004), Gabão (ROLAIN et al., 2005) e Tunísia (ZNAZEN et al., 2006).

No Brasil, pouco se conhece sobre a epidemiologia da riquetsiose causada pela *R. felis*, sua relação com casos de febre maculosa originadas por outras riquetsias ou sobre sua interação com outras bactérias e vetores. A doença foi diagnosticada no país apenas em 2001, no Estado de Minas Gerais, através da detecção de *R. felis* a partir do sangue de pacientes que apresentavam sinais clínicos compatíveis com febre maculosa (RAOULT et al., 2001). Posteriormente, o agente foi detectado e caracterizado através de técnicas moleculares em pulgas colhidas de cães provenientes de uma área com casos suspeitos de febre maculosa (OLIVEIRA et al., 2002). A presença desta bactéria foi detectada em carrapatos *Amblyomma* spp, colhidos em áreas endêmicas para FMB, tanto em Minas Gerais como em São Paulo (CARDOSO et al., 2006; HORTA, 2002; PINTER, 2003; VIANNA, 2002). Entretanto, não se sabe exatamente se existe uma efetiva participação dos carrapatos no ciclo da *R. felis* nas regiões estudadas. A interação entre essa bactéria e o carrapato, além da comprovação da capacidade e competência vetorial, precisam ser melhor estudadas.

O agente *R. felis* é uma bactéria intracelular obrigatória, gram-negativa da ordem Rickettsiales. Cresce em células XTC-2 (derivada do anfíbio *Xenopus laevis*) e em células VERO (derivada de rim de macaco), embora nesse último tipo celular apresente uma taxa de infecção inferior a 50% (RAOULT et al., 2001). Radulovic et al. (1995) consideraram *R. felis* como pertencente ao grupo do tifo, devido a características comuns a esse grupo, como propriedades biológicas, padrões de cultivo celular e similaridade antigênica. No entanto, anos mais tarde, foi descoberto que houve contaminação laboratorial por *R. typhi* e que as características reportadas não eram, na verdade, causadas pela *R. felis* (RADULOVIC et al., 1996).

Posteriormente, ensaios moleculares visando uma adequada caracterização da bactéria foram realizados. A análise das seqüências de bases de um fragmento amplificado (434 pb) do gene que codifica a proteína 17 kDa (proteína de superfície comum a espécies do gênero *Rickettsia*) indicou tratar-se de uma bactéria distinta das demais riquetsias GT, inclusive de *R. typhi*, principal espécie encontrada em pulgas até então (AZAD et al., 1992). A análise do gene 16S rRNA, usada para estudos filogenéticos de bactérias, aproximou *R. felis* de duas bactérias do GFM, *R. akari* e *R. australis*, tendo as três bactérias diferentes espécies de vetores (STOTHARD; FUERST, 1995). Estudo semelhante, com análise do gene codificador da Citrato Sintase, obteve resultados que corroboram os trabalhos anteriores (HIGGINS et al., 1996). No entanto, estudos preliminares não foram capazes de detectar o antígeno de proteína externa de membrana (*OmpA*), encontrado em todas as espécies de riquetsias pertencentes ao GFM (HIGGINS et al., 1996). Finalmente, em 2001, com base no sequenciamento e análise de DNA do gene *OmpA*, descrito pela primeira vez nessa bactéria, a inclusão da *R. felis* no GFM foi admitida (BOUYER et al., 2001).

Ctenocephalides felis é a espécie de pulga de maior prevalência encontrada em gambás, cães e gatos do continente Americano. Na análise realizada através de PCR de exemplares colhidos de gambás no Texas (EUA), 3,8% desses apresentaram-se positivos para *R. felis* e 0,8% para *R. typhi*, fato que sugere um importante papel do gambá na manutenção do ciclo epidemiológico dessas riquetsias. Na natureza, ainda não foram encontradas essas duas bactérias co-habitando a mesma pulga (SCHRIEFER et al., 1994a,b); entretanto, foi possível detectar a presença de ambos agentes em pulgas previamente infectadas com *R. felis* com subsequente infecção experimental por *R. typhi*, indicando laboratorialmente a possibilidade de co-existência no mesmo vetor. Nessa condição, a taxa de infecção das pulgas por *R. felis* decaiu de 86% - 94% para 13 - 26% (NODEN et al., 1998).

Nos EUA, em estudo de pulgas colhidas de gambás (*Didelphis virginiana*), cães e gatos procedentes de várias regiões geográficas, no período de 1986 a 1996, verificou-se a presença de *R. felis* em mais de 50% das amostras estudadas. No entanto, essa taxa chegou a 93% em alguns dos locais examinados, demonstrando a vasta distribuição da bactéria em habitats sub-urbanos, onde gambás adentram em habitações humanas e compartilham pulgas com cães e gatos (HIGGINS et al., 1994). A infecção de *R. felis* é mantida por transmissão vertical (transovariana) por sucessivas gerações da pulga, sem a necessidade de um reservatório vertebrado, o que justifica a alta incidência dos agentes nesses vetores (WEDINCAMP; FOIL, 2002). Além disso, infecções por *R. typhi* e *R. felis* não são letais para seus vetores naturais, diferentemente do que acontece com outras riquetsias, como por exemplo *R. prowazekii* (AZAD et al., 1997) e *R. rickettsii* (NIEBYLSKI; PEACOCK; SCHWAN, 1999) para piolhos e carrapatos, respectivamente.

No Brasil, os eqüinos assumem o papel de sentinela da febre maculosa (HORTA et al., 2004; LEMOS et al., 1996a; SANGIONI et al., 2005). Em áreas endêmicas para FMB nos Estados de Minas Geras e São Paulo, estes animais se apresentam com altos títulos de anticorpos frente a *R. rickettsii*, possivelmente correlacionados ao alto parasitismo destes animais pelo carrapato vetor *A. cajennense* (HORTA et al., 2004; SANGIONI et al., 2005; VIANNA, 2002). Os cães, gatos e gambás apresentam papel importante como hospedeiros da pulga. Os gambás, em particular, são incriminados como potencial reservatório silvestre de riquetsias. Até hoje, no país, o único isolado de *Rickettsia* sp de animal silvestre ocorreu em gambá *Didelphis marsupialis* (MOREIRA et al., 1935). Em soros colhidos de gatos febris, notificados por veterinários no nordeste dos EUA, observou-se uma soropositividade frente à *R. felis* de 8%, indicando uma possível ligação destes animais na transmissão do agente (HIGGINS et al., 1996). Ainda não foram realizados estudos sobre a participação de cães e gatos como fontes de infecção para *R. felis*.

A soropositividade de animais para tifo murino está relacionada com a doença detectada em humanos. A sorologia, realizada utilizando-se antígenos de *R. typhi*, realizada em gambás e gatos demonstrou uma positividade de 40% e 90%, respectivamente. Em áreas controles, onde a doença não foi detectada, nenhum animal se apresentou positivo (SORVILLO et al., 1993). Não existe, até o momento, trabalho relacionando a sorologia frente a *R. felis* em áreas endêmicas ou não para febre maculosa.

Todos os testes sorológicos, incluindo a maioria daqueles realizados pelos laboratórios de referência para diagnóstico da doença no Brasil, utilizam antígenos cedidos por pesquisadores americanos e europeus (*R. rickettsii* e *R. typhi*). Para o

diagnostico da febre maculosa, estes métodos sorológicos são válidos, uma vez que todas as bactérias do GFM apresentam reações cruzadas entre si. No entanto, os títulos se apresentam mais elevados quando testados contra seu antígeno específico (reação homóloga) (PHILIP et al., 1978).

A transmissão de *R. felis* aos humanos precisa ser melhor estudada. Não se sabe se a infecção se dá pelo contato com secreções salivares ou através da picada do artrópode, tal como ocorre com várias espécies de riquetsias veiculadas por carrapatos, ou através de restos celulares e/ou fezes de vetores contaminados, verificada na transmissão de *R. typhi* por pulgas ou de *R. prowazekii* por piolhos (AZAD; BEARD, 1998). Macerados de fezes de pulgas infectadas se apresentaram positivas para *R. felis* quando testadas pela PCR. Contudo, isso pode indicar que o DNA encontrado estivesse apenas transitando pelo intestino da pulga, não esclarecendo sobre o estabelecimento de uma infecção na mesma. A transmissão horizontal de *R. felis*, via alimentação de larvas de pulgas com fezes de vetor infectado, foi estudada, porém, não apresentou resultados positivos. (WEDINCAMP et al., 2002).

Em resumo, embora a FMB tenha como principal agente a *R. rickettsii* há várias décadas, a riquetsiose causada por *R. felis* foi identificada somente há alguns anos. Os achados de *R. felis* em pulgas e carrapatos, provenientes de áreas endêmicas no Estado de São Paulo, são intrigantes e indicam a possível participação de mais uma espécie de riquetsia na etiologia da doença. Por esta razão, tornam-se necessárias investigações sobre a história natural destes agentes que poderão fornecer subsídios para o entendimento da epidemiologia da febre maculosa e auxiliar na escolha das estratégias visando prevenção e controle da doença.

2 OBJETIVOS

Este estudo visou buscar o entendimento do ciclo epidemiológico de *Rickettsia felis* em áreas endêmicas e não-endêmicas para febre maculosa no Estado de São Paulo, através de:

1. Colheita e identificação de pulgas e carrapatos, em fase de parasitismo, de cães, gatos e gambás.
2. Determinação da prevalência de infecção por riquetsias em pulgas, carrapatos e no sangue de seus hospedeiros (cães, gatos e gambás), através da técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR).
3. Caracterização molecular das riquetsias encontradas nos ectoparasitos e no sangue de seus hospedeiros, através do sequenciamento e análise do DNA amplificado.
4. Determinação da prevalência de anticorpos anti-*R. rickettsii*, anti-*R. parkeri*, anti-*R. felis* e anti-*R. bellii* em soros de gambás, cães, gatos, eqüinos e humanos; através da reação de imunofluorescência indireta.
5. Isolamento de *R. felis*, através do cultivo celular, a partir de pulgas colhidas de cães residentes nas áreas investigadas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE ESTUDO

Este estudo foi realizado em propriedades localizadas em municípios situados em áreas endêmicas e não-endêmicas para febre maculosa brasileira (FMB), no Estado de São Paulo. Os municípios foram escolhidos e agrupados a partir da análise dos dados referentes aos casos humanos de febre maculosa nos últimos 21 anos (CVE, 2006). O número de municípios foi escolhido conforme a capacidade operacional do projeto (Figura 1).

Figura 1 – Distribuição dos casos e febre maculosa no Estado de São Paulo: 1985-2005. CVE, 2006. Em destaque: áreas de estudos: (a) Pedreira, (b) Piracicaba, (c) Mogi das Cruzes, (d) São Paulo, (e) Pirassununga

3.1.1 Grupo 1 – Áreas com Casos Confirmados de Febre Maculosa

O município de **Pedreira** é considerado área endêmica para a doença desde 1985, quando surgiram as primeiras suspeitas diagnósticas na região. Estudos realizados no município comprovam a ocorrência de, pelo menos, quatro espécies de riquetsias na região: *R. bellii*, *R. rickettsii*, *R. felis* e *Rickettsia* sp ($\approx$ *Rickettsia parkeri*) (HORTA et al., 2004; HORTA et al., 2005d, LABRUNA et al., 2004a; NASCIMENTO et al., 2005). Foram escolhidos quatro sítios de coleta, todos representando locais prováveis de infecção para humano: 1) Fazenda Santa Tereza, 2) Fazendas Jaguari/ Monte Nilo, 3) Fazendas Quitandinha/Ingatuba e 4) Zoobosque (região central).

No município de **Mogi das Cruzes**, endêmico para FMB, foram relatados quatro casos humanos fatais no ano de 1998 (FONTES et al., 2000). Até o presente momento, *R. rickettsii*, *R. bellii* e *R. felis* foram detectadas na região (HORTA et al., 2005d; PINTER; LABRUNA, 2005). O sítio de coleta está localizado em locais prováveis de infecção no distrito de Taiacupeba, zona sul do município.

Nos últimos quatro anos, no município de **Piracicaba**, ocorreram 14 casos confirmados da doença. Algumas áreas prováveis de infecção estão situadas dentro dos limites do Campus da Escola Superior Luis de Queiroz – ESALQ/USP, localizada na área urbana da cidade (CVE, 2006).

No município de **São Paulo**, no primeiro terço do século passado, houve relatos da doença, que desapareceram depois do aumento da urbanização da cidade. Nos últimos quatro anos, foram notificados cinco casos confirmados pelo Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE, 2006). São quatro os sítios de coleta do

município: 1) Campus da USP (zona oeste), 2) Parque Ibirapuera (zona Sul), 3) SESC Interlagos (Zona sul) e 4) outras áreas do município.

3.1.2 Grupo 2 - Área sem Casos Confirmados de Febre Maculosa

No município de **Pirassununga**, não há relatos da doença, constituindo assim área controle do presente estudo. O sítio de coleta é o campus da USP de Pirassununga, que apresenta condições geográficas semelhantes às áreas pertencentes ao Grupo 1 (SANGIONI et al., 2005).

Figura 2 – Sítios de Colheita: (a) Pedreira, (b) Piracicaba, (c) Mogi das Cruzes, (d) São Paulo, (e) Pirassununga

3.2 CAPTURA DE GAMBÁS

Nas localidades estudadas, foram realizadas capturas de gambás de vida livre. Devido a variações climáticas, época do ano, densidade populacional, dentre outros fatores, foi necessária a realização de várias viagens a campo em um mesmo local para atingir sucesso nas capturas. Com isso, o esforço de captura dos gambás variou entre 15 a 25 dias de trabalho, em cada localidade, envolvendo os seguintes números de viagens: 3 para Mogi das Cruzes, 4 para Pedreira, 4 para Pirassununga e 5 para Piracicaba. Objetivou-se atingir a captura mínima 12 gambás/localidade, por constituir uma expectativa numérica baseada em estudos epidemiológicos envolvendo capturas de gambás (CÁCERES; MONTEIRO-FILHO, 2001). A exceção foi o município de São Paulo, onde, além das capturas, o Departamento de Parques e Áreas Verdes (DEPAVE/Prefeitura Municipal), forneceu material biológico de 14 gambás.

Foram utilizadas 30 armadilhas de arame galvanizado, do tipo “*live-trap*”, nas dimensões de 20x20x40cm, dispostas próximas a trilhas e/ou em bases de árvores das matas. As armadilhas eram montadas no período vespertino e vistoriadas na manhã seguinte. As iscas utilizadas para atrair os animais foram alimentos embutidos (*bacon*, mortadela, salsicha) e frutas (banana, laranja, goiaba). As armadilhas eram lavadas após a captura dos animais, de modo a eliminar os odores naturais deixado por alguns mamíferos (LINARDI; GUIMARÃES, 2000).

Após a captura dos gambás, procedeu-se a sedação dos mesmos com quetamina (Vetaset®, Quetamina 50®, Vetanarcol®). Em seguida, realizou-se a colheita de sangue por via intracardíaca, intracaudal ou intramamária (fêmeas), conforme a viabilidade destes. Uma vez colhido o sangue, cada animal foi

minuciosamente examinado para a colheita dos ectoparasitos. Os gambás foram marcados através de perfuração auricular (2mm), para que pudessem ser identificados no caso de serem novamente capturados. Após os procedimentos, os animais foram liberados no mesmo local onde foram encontrados.

3.3 COLHEITA DE SANGUE

Em cada uma das áreas, além dos gambás, foram colhidas amostras de sangue de cães, gatos e eqüinos. Amostras de sangue de humanos que residiam nas propriedades em estudo e/ou que relataram histórico de infestação por carrapatos ou pulgas também foram colhidas com auxílio de enfermeiras devidamente credenciadas.

As colheitas foram realizadas por punção venosa, com auxílio de uma agulha e tubos de vidro estéreis. As amostras obtidas foram centrifugadas para obtenção de soro e separação do coágulo e, posteriormente, foram refrigeradas a -20°C.

3.4 COLHEITA DE ECTOPARASITOS

Pulgas e carrapatos foram colhidos a partir de cães, gatos e gambás capturados em cada um dos locais de estudo.

3.4.1 Pulgas

As pulgas colhidas de cães, gatos e gambás foram acondicionadas em tubos plásticos, vedados e armazenados em embalagens térmicas (temperatura $\cong$ 24°C).

Em cada tubo plástico foi colocada uma quantidade de pêlos do hospedeiro para devido acondicionamento das mesmas, diminuindo assim a mortalidade durante transporte. No laboratório, as pulgas foram lavadas em álcool-iodado e identificadas de acordo com Linardi e Guimarães (2000).

3.4.2 Carrapatos

Os carrapatos colhidos a partir de cães, gatos e gambás foram colocados em frascos plásticos secos, vedados com tampas com pequenos furos e acondicionados em embalagens térmicas. Dentro dessas embalagens, colocou-se um pouco de capim para manutenção da umidade. No laboratório, os exemplares foram mantidos por pelo menos 72 horas em incubadora a 25°C e, a seguir, identificados (ARAGÃO; FONSECA, 1961).

Os estádios imaturos (larvas e ninfas) ingurgitados foram colocados na estufa B.O.D. (25°C) para realização da ecdise. Alguns exemplares necessitaram de repasto em animais de laboratório, como coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), ratos (*Rattus norvegicus*) e/ou cobaias (*Cavia porcellus*), para o desenvolvimento até a fase adulta, tornando possível sua classificação específica. Contudo, assim como ocorre na natureza, uma porcentagem dos carrapatos imaturos morreu antes de se tornarem adultos. Nesse caso, foram identificados de forma genérica.

3.5 PESQUISA DE RIQUEÍSIAS EM POTENCIAIS VETORES

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) a partir de DNA genômico extraído, objetivou o diagnóstico direto de riquetsias em carrapatos e pulgas colhidos sobre os animais.

3.5.1 Extração de DNA

A extração de DNA das riquetsias das pulgas e carrapatos foi realizada conforme o protocolo padronizado por Horta (2002), que consiste na maceração dos artrópodes em tubos, com auxílio de micropistilos. As pulgas e os adultos de carrapatos foram processados individualmente; e os estádios imaturos dos carrapatos (larvas e ninfas) foram processados individualmente ou em “*pools*” conforme a sua disponibilidade. No caso das pulgas e carrapatos imaturos utilizou-se o indivíduo inteiro em carrapatos adultos somente as patas seccionadas. Cada amostra foi acrescida de 50 µl de TE (10 mM Tris HCl; 1mM EDTA, pH 8,0), submetido à fervura (100°C, 20 min) e, posteriormente, conservado a -20°C.

3.5.2 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

O preparo das soluções utilizadas nas reações, assim como o número de ciclos, tempos e temperaturas, foram adotados conforme cada tipo de fragmento do gene a ser pesquisado (EREMEEVA; YU; RAOULT, 1994; SCHRIEFER et al., 1994a; WEBB et al., 1990). Como controle positivo, foi utilizado DNA extraído de

riquetsias de carrapatos experimentalmente infectados com *R. parkeri*, conservados a -70°C (SANGIONI et al., 2005).

Para diagnóstico de detecção de *Rickettsia* spp, foram utilizados pares de oligonucleotídeos iniciadores (“*primers*”) que amplificam fragmentos do gene *gltA* (CS2-62/CS2-462 e CS3-922/CS3-1068) e do gene 17kDa (17K1/17K2 e 17K3/17K4). Para a realização do sequenciamento de DNA, o par de “*primers*” CS4-239/CS4-1069 também foi utilizado (AZAD et al., 1990; LABRUNA et al., 2004a).

Para o diagnóstico diferencial de *Rickettsia* spp, pertencentes ao GFM, foram utilizados pares de “*primers*” que amplificam fragmentos dos genes que codificam proteínas externas de membrana das riquetsias, *OmpA* (A1-190.70/A3-190.701) (EREMEEVA; YU; RAOULT, 1994; RAOULT et al., 2001) e *OmpB* (B3-190.59/B4-190.807) (RAOULT et al., 2001; ROUX; RAOULT, 2000).

As seqüências de nucleotídeos dos “*primers*”, assim como a espécie de origem e o tamanho do produto amplificado estão relacionados na tabela 1.

Tabela 1 – “*Primers*” utilizados para identificação gênica de riquetsias

Pares de “ <i>Primer</i> ”	Espécie de origem	Gene	Seqüência de nucleotídeo (5'-3')	Tamanho do produto amplificado
CS2-62 CS2-462	<i>R. rickettsii</i>	<i>gltA</i>	GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT	401 pb*
CS3-922 CS3-1068	<i>R. rickettsii</i>	<i>gltA</i>	GAGAGAAAATTATATATCCAAATGTTGAT AGGGCTTTCGTGCATTCTT	147 pb
CS4-239 CS4-1069	<i>R. rickettsii</i>	<i>gltA</i>	GCTCTTCTCATCCTATGGCTATTAT CAGGGTCTTCGTGCATTCTT	834 pb
17 K1 17 K2	<i>R. rickettsii</i>	17 kDa	GCTCTTGCAACTTCTATGTT CATTGTCGTCAGGTTGGCG	434 pb
17 K3 17 K4	<i>R. rickettsii</i>	17 kDa	GCTTTACAAAATTCTAAAAACCATATA TGCTATCAATTCACAACTTGCC	549 pb
A1-190.70p A3-190.701	<i>R. rickettsii</i>	<i>OmpA</i>	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA GTTCCGTTAATGGCAGCATCT	631 pb
B3-190.59 B4-190.807	<i>R. rickettsii</i>	<i>OmpB</i>	CCGCAGGGTTGGTAACTGC CCTTTTAGATTACCGCCTAA	862 pb

* pb = pares de bases

Para a visualização do fragmento de DNA amplificado, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,5 %, em cuba horizontal contendo tampão de corrida TBE, sob 100 V ($\cong$ 1 hora), coradas por brometo de etídeo e observadas em luz de ultravioleta (SAMBROOK et al., 1989).

3.5.3 Purificação e Sequenciamento de DNA

Após a confirmação da positividade da amostra na PCR, o material amplificado foi purificado. Quando no gel foi observado apenas um fragmento positivo, sem ruídos da técnica, realizava-se a purificação a partir da amostra amplificada, com o protocolo etanol/propanol, que consiste na adição de 133 μ l de etanol 70% aos 40 μ l da amostra amplificada, seguido de centrifugação (12.000g, 25 min. 24°C). O etanol foi cuidadosamente retirado do microtubo, acrescentando-se em seguida 133 μ l de isopropanol, procedendo-se uma nova centrifugação (12.000g, 25 min. 24°C). Após a retirada do isopropanol, o microtubo foi incubado à 90°C por 5 minutos. O *pellet* foi então ressuspensionado com adição de 50 μ l de TE (10 mM Tris HCl; 1mM EDTA, pH 8,0).

A reação de sequenciamento foi feita usando o “Kit Big Dye 3.1”, de acordo com as instruções do fabricante (4 μ l DNA purificado - concentração máxima de 100 nG, 1 μ l água mili Q, 0,75 μ l Big Dye, 1 μ l primers específicos “senso e anti-senso” (5pmoles/ μ l) e 3,25 μ l “Save Money”). Foi utilizado o sequenciador de DNA modelo ABI Prism 3100 *Genetic Analyser* (Applied Biosystems/Perkin Elmer), segundo seu manual de instruções (“Automated DNA Sequencing”, 1998).

As seqüências dos fragmentos de DNA de *Rickettsia* spp, obtidas a partir de pulgas e carrapatos de gambás, cães e gatos, foram analisadas e comparadas às

seqüências existentes no GenBank. As identidades das seqüências alinhadas pelo método Clustal/W foram calculadas com o programa BioEdit v. 7. 0. 5. (HALL, 1999).

3.6 PESQUISA DE RIQUEÍSIAS EM POTENCIAIS HOSPEDEIROS VERTEBRADOS

3.6.1 Produção de Lâminas de Antígeno

As lâminas contendo antígeno específico de *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. felis* e *R. bellii* foram produzidas no laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – FMVZ/USP.

Dentro do fluxo laminar, as lâminas foram previamente incubadas em acetona por 10 minutos. Após a secagem das mesmas, realizou-se limpeza com álcool etílico absoluto. Depois de nova secagem, colocou-se em cada poço da lâmina, com ajuda de uma haste flexível, solução de poli-L-lisina (Sigma-Aldrich Co). As lâminas foram deixadas à temperatura ambiente para uma nova secagem, prontas para receberem os antígenos.

O antígeno foi feito a partir de *Rickettsia* spp infectada em cultivo celular, no momento em que a infecção verificada pela coloração de Gimenez (1964), atingiu taxas de 90 a 100%. A partir de uma garrafa de cultivo celular com volume de 150 cm³, foi possível a produção de aproximadamente 60 lâminas com 12 poços cada. Procedeu-se então a raspagem das células juntamente com o meio, com auxílio de um raspador plástico descartável “*cell scraper*” (Corning Incorpotared) O conteúdo foi colocado em tubo tipo falcon 50ml, e submetido à centrifugação (3.000 g, 5 min., 4°C). O meio foi descartado, e o precipitado ressuspendido em 8 ml de PBS (solução

fosfato tamponada, pH 7,2) contendo 10% “Soro de Bezerro Bovino” + 0,01% azida sódica (para desativar as riquetsias). Após uma nova centrifugação (3.000g, 5 minutos, 4°C), o sobrenadante foi descartado e uma nova ressuspensão realizada com 8 ml do PBS. Com auxílio de um micro-pipetador multicanal, colocou-se 10 µl dessa suspensão em cada poço da lâmina, visando atingir aproximadamente 10.000 células/poço. As lâminas permaneceram dentro do fluxo até a secagem total. Depois, foram submersas em acetona por 10 minutos para fixação do material, secadas e armazenadas a -70°C.

3.6.2 Reação de Imunofluorescência Indireta

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) foi utilizada para detecção dos títulos de anticorpos anti-*R. rickettsii*, anti-*R. parkeri*, anti-*R. felis* e anti-*R. bellii* nos soros obtidos.

Uma alíquota de soro era diluída em PBS e a seguir depositada sobre a lâmina contendo o antígeno de riquetsia. Após incubação em estufa (37°C, 30 minutos) a lâmina foi lavada com PBS, seguido de água destilada, ficando em repouso até sua secagem total. À cada lâmina, foi adicionado o conjugado específico (isotiocianato) em diferentes diluições para cada espécie (gambás 1/300; cães 1/400; gatos 1/1.000; eqüinos 1/100 e humanos 1/200). Após nova incubação (37°C, 30 minutos) e lavagem, a secagem foi feita em câmara escura. A leitura da lâmina era realizada em um microscópio de imunofluorescência. Foram considerados positivos os soros com títulos ≥ 64 . Em seguida, os soros positivos foram diluídos em duas vezes, repetidamente, até se chegar ao último título verificado. Para cada lâmina, foram utilizados controles padrões, positivos e

negativos, de acordo com cada espécie animal (HORTA et al., 2004). Os controles positivos e negativos de gambás foram gentilmente cedidos por Celso Eduardo de Souza (SUCEN/SP). Os protocolos utilizados seguiram as recomendações de Walker et al. (1992).

3.6.2 Extração de DNA

Procedeu-se extração de DNA a partir do coágulo e/ou sangue total dos diferentes hospedeiros utilizando-se de “kits” comerciais de extração DNeasy® Tissue Kit (Qiagen) e Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA).

3.6.3 PCR, Purificação e Sequenciamento de DNA

A amplificação, revelação, purificação e análise do DNA de riquetsias detectadas a partir do sangue dos mamíferos, foram realizadas de acordo com os procedimentos utilizados para os vetores (itens 3.5.2 e 3.5.3).

3.7 CULTIVO CELULAR

O cultivo celular visa o isolamento, crescimento, replicação e manutenção das riquetsias, objetivando a formação de um banco de amostras, obtenção de controle positivo, produção de anticorpos e a caracterização molecular da cepa. As células permanecem armazenadas a -80°C, e são oportunamente descongeladas conforme a necessidade.

3.7.1 Células VERO

A principal linhagem utilizada para cultivo de *Rickettsia* spp é a de células VERO, provenientes de rim de macaco verde da África. Dentro do fluxo laminar, o repique é realizado a partir da monocamada estabelecida dentro de uma garrafa de cultivo (25 cm³). A monocamada é removida com auxílio de tripsina (5 ml para cada 3 ml meio). Adiciona-se meio de cultivo “*Minimum Essential Medium*” (MEM/Invitrogen), acrescido de 5 % de “Soro de Bezerro Bovino” (SBB/HyColne). Homogeneíza-se e, então, o conteúdo é distribuído entre duas outras garrafas. As garrafas com as células VERO são incubadas à temperatura de 37°C, para formação da monocamada.

3.7.2 Células C6/36

Uma linhagem de células de mosquito *Aedes albopictus*, C6/36 (IGARASHI, 1978), foi mantida no laboratório. O repique é feito semanalmente, com homogeneização da garrafa com meio de cultivo “*Leibovitz 15*” acrescido de 10% de SBB. As garrafas com as células C6/36 são incubadas à temperatura de 28°C, para formação e manutenção da monocamada.

3.7.3 Isolamento de *Rickettsia felis*

Visando o isolamento de *R. felis*, parte das pulgas colhidas de cães dos municípios de Pedreira foi destinada ao cultivo celular.

Uma vez estabelecia a linhagem celular (VERO e/ou C6/36), as células foram transferidas das garrafas de cultivo para tubos cilíndricos com fundos chatos, denominados “*shell vial*”, numa concentração aproximada de 200.000 células por tubo (KELLY; RAOULT; MASON, 1991).

As pulgas foram submersas em álcool-iodado por 10 minutos, para eliminar a contaminação externa dos artrópodes. Em seguida, foram submetidas a uma série de lavagens consecutivas com PBS. Procedeu-se a maceração das mesmas com auxílio de um micro-pistilo estéril e 1,0 ml do meio específico para a célula utilizada, com 1% de antibiótico [penicilina (100 U.I./ml); estreptomicina (0,1 mg/ml)]. Uma alíquota de cada amostra foi separada para realização da PCR e sequenciamento de DNA (itens 3.5.1 e 3.5.2), para confirmação da infecção por *R. felis*. Outra parte foi adicionada ao “*shell vial*” previamente preenchido pela linhagem celular escolhida (dois dias de incubação).

Em seguida, após a centrifugação (700g, 1 hora, 22°C) os tubos foram colocados na estufa à temperatura de 28°C. Após 48-72 horas, o meio dos tubos infectados foi trocado, desta vez, por outro sem antibiótico. A troca de meio foi realizada até a detecção de riquetsias através da coloração de fucsina/verde malaquita (GIMENEZ, 1964) nas células do meio a ser desprezado. Neste momento, a monocamada foi coletada e transferida para uma garrafa de cultivo de 25 cm³, também contendo uma monocamada com a mesma linhagem celular, e novamente incubada a 28°C (RAOULT et al., 2001). A taxa de infecção celular foi observada a cada 4 dias e uma vez atingindo $\cong$ 90%, a monocamada foi transferida para uma garrafa de 75 cm³, previamente inoculada com a mesma linhagem celular. Novamente, quando a infecção celular atingiu $\cong$ 100%, novos repiques foram feitos

em células não infectadas. Para confirmação e caracterização da cepa isolada, foi realizada PCR e sequenciamento de DNA (itens 3.5.2 e 3.5.3).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A frequência de pulgas positivas para *R. felis* e de animais reagentes à RIFI frente aos antígenos de *Rickettsia rickettsii*, *R. parkeri*, *R. felis* e *R. bellii*, de acordo com os dois grupos de municípios estudados, foram comparados utilizando-se o Teste Exato de Fisher, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). As análises foram realizadas com auxílio do programa SPSS para Windows, versão 9.0 (SPSS, 1999).

4 RESULTADOS

4.1 CAPTURA E IDENTIFICAÇÃO DE GAMBÁS

Foram capturados 94 gambás, pertencentes a duas espécies, 65 *Didelphis aurita* (gambá de orelha-preta, Figura 3a) e 29 *Didelphis albiventris* (gambá de orelha-branca, Figura 3b), representando 69,1% e 30,9% dos animais, respectivamente

Figura 3 – (a) *Didelphis aurita* (gambá de orelha preta). Pedreira/SP – 2004; (b) *Didelphis albiventris* (gambá de orelha branca). Piracicaba/SP – 2003

Durante os trabalhos, outros animais foram capturados acidentalmente, dentre eles 3 marsupiais (*Lutreolina crassicaudata*, *Monodelphis* sp, *Gracilinanus* sp), 2 roedores de médio porte não identificados, 2 roedores de médio porte (*Phyllomys* sp), 4 roedores de pequeno porte (*Akodon* sp) e 3 répteis (*Tupinambis* sp), que foram soltos em seguida. Recapturas de gambás ocorreram em Mogi das Cruzes e Pirassununga, e, embora não tenham entrado na contagem total, seus ectoparasitos foram colhidos e analisados.

4.2 COLHEITA DE SANGUE

No quadro 1, constam os números de amostras de sangue colhidas segundo hospedeiros residentes e/ou freqüentadores dos sítios de capturas.

Sangue	Grupo 1				Grupo 2	Total
	Pedreira	Mogi das Cruzes	Piracicaba	São Paulo	Pirassununga	
Humanos	52	21	69	68	28	238
Eqüinos	20	5	21	20	19	85
Cães	19	13	7	11	5	55
Gatos	3	3	7	6	6	25
Gambás	14	16	17	35	12	94
Total	108	58	121	140	70	496

Quadro 1 – Número de amostras de sangue colhidas por município estudado

4.3 COLHEITA DE ECTOPARASITOS

4.3.1 Pulgas

Foram colhidas 312 pulgas parasitando gambás. A razão sexual de *C. felis felis* encontrada parasitando gambás foi de 1 macho para 3,2 fêmeas; e a razão sexual das pulgas da Família Rhopalopsyllidae foi de 1 macho para cada 1 fêmea. Foram identificadas as seguintes espécies: *Adoratopsylla (Adoratopsylla) antiquorum antiquorum* (Família Ctenophthalmidae); *Ctenocephalides felis felis* (Família Pulicidae); *Polygenis (Neopolygenis) atopus*, *Polygenies (Polygenis) roberti roberti*, *Polygenis (Polygenis) tripus*, *Polygenis (Polygenis) rimatus*, *Rhopalopsyllus lugubris lugubris* e *Rhopalopsyllus lutzi lutzi* (Família Rhopalopsyllidae). O número de pulgas colhidas por localidade está listado na tabela 2.

Tabela 2 – Pulgas colhidas sobre gambás em municípios do Estado de São Paulo, 2003-2006

Espécie	Pedreira	Mogi das Cruzes	Piracicaba	São Paulo	Pirassununga	Total
<i>A.ant</i> ¹	0	1	0	0	0	1
<i>C.fel</i> ²	37	36	11	60	0	144
<i>P.ato</i> ³	1	61	0	0	37	99
<i>P.rob</i> ⁴	0	7	0	0	1	8
<i>P.tri</i> ⁵	0	2	1	0	1	4
<i>P.rim</i> ⁶	0	1	0	0	0	1
<i>R.lug</i> ⁷	3	0	0	0	0	3
<i>R.lut</i> ⁸	16	0	12	0	24	52
Total	57	108	24	60	63	312

¹*Adoratopsylla (Adoratopsylla) antiquorum antiquorum*, ²*Ctenocephalides felis felis*, ³*Polygenis (Neopolygenis) atopus*, ⁴*Polygenis (Polygenis) roberti roberti*, ⁵*Polygenis (Polygenis) tripus*, ⁶*Polygenis (Polygenis) rimatus*, ⁷*Rhopalopsyllus lugubris lugubris*, ⁸*Rhopalopsyllus lutzi lutzi*.

Foram colhidas 278 pulgas parasitando cães e gatos. Em relação às pulgas colhidas dos cães, todos os exemplares encontrados pertenciam à espécie *C. felis felis* (1 machos/ 2,5 fêmeas); enquanto em gatos observou-se a presença de duas espécies: *C. felis felis* (1 macho / 1,8 fêmeas) e *R. lutzi lutzi* (1 macho / 1 fêmea) em gatos (Tabela 3).

Tabela 3 – Pulgas colhidas sobre cães e gatos em municípios do Estado de São Paulo, 2003-2006

Espécie	Pedreira	Mogi das Cruzes	Piracicaba	São Paulo	Pirassununga	Total
Cão <i>C.fel</i> ¹	74	25	46	30	37	212
Gato <i>C.fel</i> ¹	6	6	6	17	24	59
Gato <i>R.lut</i> ²	1	0	1	0	5	7
Total	81	31	53	47	66	278

¹*Ctenocephalides felis felis*, ²*Rhopalopsyllus lutzi lutzi*

4.3.2 Carrapatos

Foram colhidos 709 carrapatos em gambás, pertencentes aos gêneros *Amblyomma* e *Ixodes*, relacionados na tabela 4. Dentre os carrapatos adultos

colhidos dos gambás, foram identificados *Ixodes loricatus* (98,2%) e *Amblyomma cajennense* (1,8%).

A criação de carrapatos em laboratório, colhidos em fase imatura e mantidos até adultos possibilitou o diagnóstico específico de 79 exemplares de *Amblyomma cajennense* (a partir de 27 larvas e 52 ninfas de *Amblyomma* sp) e de 23 *Amblyomma dubitatum* (a partir de 18 larvas e 5 ninfas de *Amblyomma* sp).

Tabela 4 – Carrapatos colhidos sobre gambás em municípios do Estado de São Paulo, 2003-2006

Estádio/Espécie/Local		Pedreira	Mogi Cruzes	Piracicaba	São Paulo	Pirassununga	Total
Larva (n=222)	<i>Amblyomma</i> sp	1	21	136	0	19	177
	<i>A. cajennense</i>	0	0	27	0	0	27
	<i>A. dubitatum</i>	0	9	7	0	2	18
Ninfa (n=375)	<i>Amblyomma</i> sp	35	3	254	0	26	318
	<i>A. cajennense</i>	1	0	51	0	0	52
	<i>A. dubitatum</i>	0	3	2	0	0	5
Adulto (n=112)	<i>Ixodes loricatus</i>	0	73	0	6	31	110
	<i>A. cajennense</i>	0	0	2	0	0	2
Total		37	109	479	6	78	709

Dos cães, foram colhidos 115 carrapatos com predominância da espécie *Rhipicephalus sanguineus* sobre as do gênero *Amblyomma* (Tabela 5). Dos dez exemplares colhidos dos gatos, um foi identificado como *Rhipicephalus sanguineus* e os demais como carrapatos do gênero *Amblyomma* (Tabela 6).

Tabela 5 – Carrapatos colhidos sobre cães em municípios do Estado de São Paulo, 2003-2006

Estádio/Espécie/Local	Pedreira	Mogi Cruzes	Piracicaba	São Paulo	Pirassununga	Total
Larva (n=3)	<i>A. cajennense</i>	3	0	0	0	3
Ninfa (n=27)	<i>A. cajennense</i>	26	0	0	0	26
	<i>Amblyomma</i> sp	1	0	0	0	1
Adulto (n=85)	<i>A. cajennense</i>	3	0	1	0	4
	<i>A. aureolatum</i>	0	15	0	1	16
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	61	0	4	0	65
Total		94	15	5	1	115

Tabela 6 – Carrapatos colhidos sobre gatos em municípios do Estado de São Paulo, 2003-2006

Estádio/Espécie/Local	Pedreira	Mogi Cruzes	Piracicaba	São Paulo	Pirassununga	Total
Larva (n=3)	<i>A. cajennense</i>	3	0	0	0	3
Ninfa (n=6)	<i>Amblyomma</i> sp	0	0	5	0	5
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	1	0	0	0	1
Adulto (n=1)	<i>A. aureolatum</i>	0	1	0	0	1
Total		4	1	5	0	10

4.4 PESQUISA DE RIQUETSIAS EM POTENCIAIS VETORES

4.4.1 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

As pulgas colhidas sobre potenciais hospedeiros de riquetsias foram analisadas individualmente e apresentaram positividade para o gene *gltA*: 71 (22,7%) colhidas sobre gambás (Tabela 7); 89 (42,0%) sobre cães e 25 (37,9%) sobre gatos (Tabelas 8). À análise estatística, houve associação entre a positividade

de *R. felis* em pulgas de gambás e cães em áreas endêmicas (grupo 1) frente às pulgas destes hospedeiros da área não-endêmica (grupo 2) ($p < 0,05$).

Tabela 7 – Pulgas positivas na PCR, para o gene *gltA*, colhidas sobre gambás capturados no Estado de São Paulo

Espécie	Pedreira	Mogi das Cruzes	Piracicaba	São Paulo	Pirassununga	Total
<i>C.fel</i> ¹	37 (19)	36 (12)	11 (8)	60 (27)	0 (0)	144 (66)
<i>P.ato</i> ²	1 (0)	61 (2)	0 (0)	0 (0)	37 (3)	99 (5)
Total*	38 (19)	97 (14)	11 (8)	60 (27)	37 (3)	243 (71)

* n (p): n = número de indivíduos examinados; p = número de indivíduos positivos;

¹*Ctenocephalides felis felis*, ²*Polygenis (Neopolygenis) atopus*

Tabela 8 – Pulgas positivas na PCR, para o gene *gltA*, colhidas sobre cães e gatos no Estado de São Paulo

Espécie	Pedreira	Mogi das Cruzes	Piracicaba	São Paulo	Pirassununga	Total
Cão <i>C.fel</i> ¹	74 (39)	25 (10)	46 (21)	30 (14)	37 (5)	212 (89)
Gato <i>C.fel</i> ¹	6 (5)	6 (3)	6 (3)	17 (5)	24 (9)	59 (25)
Total	81 (44)	31 (13)	53 (24)	47 (19)	66 (14)	278 (114)

* n (p): n = número de indivíduos examinados; p = número de indivíduos positivos;

¹*Ctenocephalides felis felis*

Foram processados pela PCR, 709 carrapatos colhidos sobre gambás dos quais 81 apresentaram positividade para o gene *gltA* (Tabela 9). Sobre os cães e gatos, 115 e 10 carrapatos, respectivamente, mostraram-se negativos à PCR.

Tabela 9 – Carrapatos positivos na PCR, para o gene *gltA*, colhidos sobre gambás capturados no Estado de São Paulo

Estádio/Espécie/Local	Pedreira	Mogi Cruzes	Piracicaba	São Paulo	Pirassununga	Total
<i>Amblyomma</i> sp	36 (1) 2,8%	24 (1) 4,2%	390 (6) 1,5%	0 (0) 0%	45 (3) 6,7%	495 (11) 2,2%
<i>A. cajennense</i>	1 (0) 0%	0 (0) 0%	80 (1) 1,25%	0 (0) 0%	0 (0) 0%	81 (1) 1,2%
<i>A. dubitatum</i>	0 (0) 0%	12 (1) 8,3%	9 (1) 11,1%	0 (0) 0%	2 (0) 0%	23 (2) 8,7%
<i>Ixodes loricatus</i>	0 (0) 0%	73 (38) 52,0%	0 (0) 0%	6 (6) 100%	31 (23) 74,2%	110 (67) 60,9%
Total	37 (1)	109 (40)	479 (8)	6 (6)	78 (26)	709 (81) 11,4%

* n (p) %: n = número de indivíduos examinados; p = número de indivíduos positivos;
% = porcentagem de indivíduos positivos

4.4.2 Sequenciamento de DNA

Pulgas colhidas de gambás, 66 *C. felis felis* (45,8% desta espécie) e quatro *Polygenis* (*Neopolygenis*) *atopus* (4,0% desta espécie), positivas na PCR (gene *gltA*), foram submetidas ao sequenciamento de DNA, gerando seqüências iguais entre si. Os fragmentos analisados apresentaram 100% de identidade com a seqüência de nucleotídeos de *R. felis*, cepa da Califórnia/EUA (AF210692) e 98,6% de identidade à cepa de *R. felis* oriunda da Tailândia (AF516333.1), ambas disponibilizadas no GenBank. Uma pulga *P. (N.) atopus* (1,0%), também de gambá, apresentou fragmento de DNA riquetsial com seqüência de nucleotídeos mostrando 100% de identidade à *Rickettsia bellii*.

Em relação às pulgas *C. felis felis* colhidas de cães e gatos, 89 (42,0%) e 25 (42,4%), respectivamente, foram seqüenciadas, apresentando a mesma identidade com *R. felis*, das pulgas de gambás.

As seqüências obtidas, a partir de carrapatos de gambás, foram analisadas e comparadas com seqüências do Genbank, apresentaram 99,7% de identidade à *Rickettsia bellii* (U59716.1, AY362703.1) (65 *I. loricatus*, 2 *A. dubitatum*, 3 pools de larvas *Amblyomma* sp, 2 pools de ninfas de *Amblyomma* sp); 100 % de identidade a *R. felis* (CP000053.1, AF210692.1,) (2 larvas e 2 ninfas de *Amblyomma* sp e 2 adultos de *I. loricatus*); 100,0% de identidade à *Rickettsia amblyommii* (AY375163.1) (1 pool de ninfas de *Amblyomma* sp). Outras duas amostras obtiveram identidade à *Rickettsia* sp (2 pools de ninfas de *Amblyomma* sp) (Tabela 10).

Tabela 10 – Amostras de DNA de riquetsias seqüenciadas em carrapatos positivos na PCR, para o gene *gltA*, colhidos sobre gambás capturados no Estado de São Paulo

Amostras		Carrapato	Seqüências	Município
1 pool	4 ninfas	<i>Amblyomma</i> sp	1 <i>Rickettsia bellii</i>	Pedreira
38 adultos	38 adultos	<i>Ixodes loricatus</i>	38 <i>Rickettsia bellii</i>	Mogi das Cruzes
1 ninfa*	1 adulto	<i>A. dubitatum</i>	1 <i>Rickettsia bellii</i>	Mogi das Cruzes
1 larva	1 larva	<i>Amblyomma</i> sp	1 <i>Rickettsia felis</i>	Mogi das Cruzes
1 pool	11 larvas	<i>Amblyomma</i> sp	1 <i>Rickettsia bellii</i>	Piracicaba
1 pool	10 larvas	<i>Amblyomma</i> sp	1 <i>Rickettsia bellii</i>	Piracicaba
1 pool	5 larvas	<i>Amblyomma</i> sp	1 <i>Rickettsia bellii</i>	Piracicaba
1 pool	5 ninfas	<i>Amblyomma</i> sp	1 <i>Rickettsia</i> sp	Piracicaba
1 pool	5 ninfas	<i>Amblyomma</i> sp	1 <i>Rickettsia amblyommii</i>	Piracicaba
1 pool	5 ninfas	<i>Amblyomma</i> sp	1 <i>Rickettsia bellii</i>	Piracicaba
1 ninfa*	1 adulto	<i>A. dubitatum</i>	1 <i>Rickettsia bellii</i>	Piracicaba
1 ninfa*	1 adulto	<i>A. cajennense</i>	1 <i>Rickettsia</i> sp	Piracicaba
6 adultos	6 adultos	<i>Ixodes loricatus</i>	6 <i>Rickettsia bellii</i>	São Paulo
21 adultos	21 adultos	<i>Ixodes loricatus</i>	21 <i>Rickettsia bellii</i>	Pirassununga
2 adultos	2 adultos	<i>Ixodes loricatus</i>	2 <i>Rickettsia felis</i>	Pirassununga
1 larvas	1 larvas	<i>Amblyomma</i> sp	1 <i>Rickettsia felis</i>	Pirassununga
2 ninfas	2 ninfas	<i>Amblyomma</i> sp	2 <i>Rickettsia felis</i>	Pirassununga

* ninfas que realizaram ecdise para adulto

Tabela 11 – Grau de identidade calculado para cada par de seqüências de nucleotídeos, entre as amostras de pulgas obtidas, através do sequenciamento de DNA (gene *gltA*, 350 pb) e seqüências de *Rickettsia* spp do GenBank

	<i>R aka</i>	<i>R amb</i>	<i>R aus</i>	<i>R bel</i>	<i>R can</i>	<i>R con</i>	<i>R fel</i>	<i>R hon</i>	<i>R jap</i>	<i>R par</i>	<i>R pro</i>	<i>R rhi</i>	<i>R ric</i>	<i>R typ</i>	<i>R fel A1</i>	<i>R bel A2</i>
<i>R akani</i> ¹	1,000	0,908	0,968	0,840	0,845	0,928	0,948	0,925	0,917	0,925	0,882	0,925	0,92	0,882	0,948	0,837
<i>R amblyommi</i> ²	—	1,000	0,911	0,860	0,871	0,980	0,914	0,977	0,971	0,977	0,911	0,971	0,971	0,917	0,914	0,857
<i>R australis</i> ³	—	—	1,000	0,842	0,842	0,931	0,951	0,928	0,920	0,928	0,885	0,928	0,922	0,891	0,951	0,840
<i>R bellii</i> ⁴	—	—	—	1,000	0,845	0,862	0,845	0,862	0,860	0,865	0,842	0,854	0,854	0,857	0,845	0,997
<i>R canadensis</i> ⁵	—	—	—	—	1,000	0,880	0,871	0,877	0,877	0,877	0,857	0,871	0,877	0,865	0,871	0,842
<i>R conorii</i> ⁶	—	—	—	—	—	1,000	0,934	0,997	0,988	0,997	0,928	0,991	0,991	0,934	0,934	0,860
<i>R felis</i> ⁷	—	—	—	—	—	—	1,000	0,931	0,922	0,931	0,888	0,931	0,925	0,888	1,000	0,842
<i>R honei</i> ⁸	—	—	—	—	—	—	—	1,000	0,985	0,994	0,925	0,988	0,988	0,931	0,931	0,860
<i>R japonica</i> ⁹	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000	0,985	0,922	0,980	0,980	0,928	0,922	0,857
<i>R parker</i> ¹⁰	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000	0,925	0,988	0,988	0,931	0,931	0,862
<i>R prowazekii</i> ¹¹	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000	0,925	0,92	0,951	0,888	0,840
<i>R rhipicephali</i> ¹²	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000	0,982	0,931	0,931	0,851
<i>R rickettsii</i> ¹³	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000	0,925	0,925	0,851
<i>R. typhi</i> ¹⁴	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000	0,888	0,854
<i>R. felis A1</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000	0,842
<i>R bellii A2</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000

GenBank: ¹U59717.1, ²AY375163.1, ³U59718.1, ⁴U59716.1, ⁵U59713.1, ⁶U59730.1, ⁷AF210692.1, ⁸AF018074, ⁹U59724.1, ¹⁰U59732.1, ¹¹U59715.1, ¹²U59721.1, ¹³U59729.1, ¹⁴U59714.1

Tabela 12 – Grau de identidade calculado para cada par de seqüências de nucleotídeos, entre as amostras de carrapatos obtidas, através do sequenciamento de DNA (gene *gltA*, 350 pb) e seqüências de *Rickettsia* spp do GenBank

	<i>R aka</i>	<i>R amb</i>	<i>R aus</i>	<i>R bel</i>	<i>R can</i>	<i>R con</i>	<i>R fel</i>	<i>R hon</i>	<i>R par</i>	<i>R pro</i>	<i>R rhi</i>	<i>R ric</i>	<i>R typ</i>	<i>R fel A3</i>	<i>R sp A4</i>	<i>R bel A2</i>
<i>R akani</i> ¹	1,000	0,908	0,968	0,840	0,845	0,928	0,948	0,925	0,925	0,882	0,925	0,920	0,882	0,948	0,908	0,837
<i>R amblyommi</i> ²	—	1,000	0,911	0,860	0,871	0,980	0,914	0,977	0,977	0,911	0,971	0,971	0,917	0,914	1,000	0,857
<i>R australis</i> ³	—	—	1,000	0,842	0,842	0,931	0,951	0,928	0,928	0,885	0,928	0,922	0,891	0,951	0,911	0,840
<i>R bellii</i> ⁴	—	—	—	1,000	0,845	0,862	0,845	0,862	0,865	0,842	0,854	0,854	0,857	0,845	0,86	0,997
<i>R canadensis</i> ⁵	—	—	—	—	1,000	0,880	0,871	0,877	0,877	0,857	0,871	0,877	0,865	0,871	0,871	0,842
<i>R conorii</i> ⁶	—	—	—	—	—	1,000	0,934	0,997	0,997	0,928	0,991	0,991	0,934	0,934	0,98	0,860
<i>R felis</i> ⁷	—	—	—	—	—	—	1,000	0,931	0,931	0,888	0,931	0,925	0,888	1,000	0,914	0,842
<i>R honei</i> ⁸	—	—	—	—	—	—	—	1,000	0,994	0,925	0,988	0,988	0,931	0,931	0,977	0,860
<i>R parker</i> ⁹	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000	0,925	0,988	0,988	0,931	0,931	0,977	0,862
<i>R prowazekii</i> ¹⁰	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000	0,925	0,920	0,951	0,888	0,911	0,840
<i>R rhipicephali</i> ¹¹	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000	0,982	0,931	0,931	0,971	0,851
<i>R rickettsii</i> ¹²	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000	0,925	0,925	0,971	0,851
<i>R. typhi</i> ¹³	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000	0,888	0,917	0,854
<i>R. felis A3</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000	0,914	0,842
<i>R sp A4</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000	0,857
<i>R bellii A5</i> ¹⁴	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000

GenBank: ¹U59717.1, ²AY375163.1, ³U59718.1, ⁴U59716.1, ⁵U59713.1, ⁶U59730.1, ⁷AF210692.1, ⁸AF018074, ⁹U59732.1, ¹⁰U59715.1, ¹¹U59721.1, ¹²U59729.1, ¹³U59714.1, ¹⁴DQ146481.1

Tabela 13 – Grau de identidade calculado para cada par de seqüências de nucleotídeos, entre uma amostra *pool* de carrapatos *Amblyomma* spp colhida sobre gambá, através do sequenciamento de DNA (gene *gltA*, 350 pb) e seqüências de *Rickettsia* spp do GenBank

	<i>R</i> <i>aka</i>	<i>R</i> <i>amb</i>	<i>R</i> <i>aus</i>	<i>R</i> <i>bel</i>	<i>R</i> <i>can</i>	<i>R</i> <i>con</i>	<i>R</i> <i>fel</i>	<i>R</i> <i>hon</i>	<i>R</i> <i>jap</i>	<i>R</i> <i>par</i>	<i>R</i> <i>pro</i>	<i>R</i> <i>rhi</i>	<i>R</i> <i>ric</i>	<i>R</i> <i>sib</i>	<i>R</i> <i>typ</i>	<i>R</i> sp A6
<i>R. aka</i> ¹	1,000	0,908	0,968	0,840	0,845	0,928	0,948	0,925	0,917	0,925	0,882	0,925	0,920	0,925	0,882	0,908
<i>R. amblyommi</i> ²	—	1,000	0,911	0,860	0,871	0,980	0,914	0,977	0,971	0,977	0,911	0,971	0,971	0,977	0,917	0,960
<i>R. australis</i> ³	—	—	1,000	0,842	0,842	0,931	0,951	0,928	0,92	0,928	0,885	0,928	0,922	0,928	0,891	0,911
<i>R. bellii</i> ⁴	—	—	—	1,000	0,845	0,862	0,845	0,862	0,860	0,865	0,842	0,854	0,854	0,865	0,857	0,877
<i>R. canadensis</i> ⁵	—	—	—	—	1,000	0,880	0,871	0,877	0,877	0,857	0,871	0,877	0,877	0,877	0,865	0,871
<i>R. conorii</i> ⁶	—	—	—	—	—	1,000	0,934	0,997	0,988	0,997	0,928	0,991	0,991	0,997	0,934	0,980
<i>R. felis</i> ⁷	—	—	—	—	—	—	1,000	0,931	0,922	0,931	0,888	0,931	0,925	0,931	0,888	0,914
<i>R. honei</i> ⁸	—	—	—	—	—	—	—	1,000	0,985	0,994	0,925	0,988	0,988	0,994	0,931	0,980
<i>R. japonica</i> ⁹	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000	0,985	0,922	0,980	0,980	0,985	0,928	0,968
<i>R. parkeri</i> ¹⁰	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000	0,925	0,988	0,988	1,000	0,931	0,977
<i>R. prowazekii</i> ¹¹	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000	0,925	0,920	0,925	0,951	0,914
<i>R. rhipicephali</i> ¹²	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000	0,982	0,988	0,931	0,971
<i>R. rickettsii</i> ¹³	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000	0,988	0,925	0,971
<i>R. sibirica</i> ¹⁴	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000	0,931	0,977
<i>R. typhi</i> ¹⁵	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000	0,922
<i>R. sp A6</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000

GenBank: ¹U59717.1, ²AY375163.1, ³U59718.1, ⁴U59716.1, ⁵U59713.1, ⁶U59730.1, ⁷AF210692.1, ⁸AF018074, ⁹U59724.1, ¹⁰U59732.1, ¹¹U59715.1, ¹²U59721.1, ¹³U59729.1, ¹⁴U59734.1, ¹⁵U59714.1

4.5 PESQUISA DE RIQUEÍSIAS EM POTENCIAIS HOSPEDEIROS

4.5.1 Imunofluorescência Indireta

4.5.1.1 Gambás

Detectou-se a presença de anticorpos anti-*R. rickettsii* em 56 (59,6%), anti-*R. parkeri* em 55 (58,5%), anti-*R. felis* em 33 (35,1%) e anti-*R. bellii* em 15 (15,9%) gambás (Tabela 11).

Não houve associação entre a frequência de gambás reagentes aos antígenos, das áreas endêmicas e não endêmicas ($p > 0,05$).

Tabela 14 – Presença de anticorpos anti-*Rickettsia* spp em gambás do Estado de São Paulo, através da reação de imunofluorescência indireta

Gambás	<i>Rickettsia rickettsii</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	<i>Rickettsia felis</i>	<i>Rickettsia bellii</i>
Pedreira	11/14 (78,6%),	10/14 (71,4%)	9/14 (64,3%)	2/14 (14,3%)
Mogi das Cruzes	10/16 (62,5%)	8/16 (50,0%)	3/16 (18,7%)	0/16 (0,0 %)
Piracicaba	11/17 (64,7%)	12/17 (70,6%)	11/17 (64,7%)	6/17 (35,3%)
São Paulo	18/35 (51,4%)	19/35 (54,3%)	6/35 (17,1%)	6/35 (17,1%)
Pirassununga	6/12 (50,0%)	6/12 (50,0%)	4/12 (33,3%)	1/12 (8,3%)
Total	56/94 (59,6)	55/94 (58,5%)	33/94 (35,1%)	15/94 (15,9%)

Figura 4 – Soro de gambá reagente ao antígeno de *R. felis* na reação de imunofluorescência indireta

4.5.1.2 Cães

Detectou-se a presença de anticorpos anti-*R. rickettsii* e anti-*R. parkeri* em 27 (49,1%), anti-*R. felis* em 26 (47,3%) e anti-*R. bellii* em 13 (23,6%) cães (Tabela 12). Não houve associação entre a frequência de cães reagentes aos antígenos, das áreas endêmicas (grupo 1) e não endêmicas (grupo 2) ($p>0,05$).

Tabela 15 – Presença de anticorpos anti-*Rickettsia* spp em cães do Estado de São Paulo, através da reação de imunofluorescência indireta

Cães	<i>Rickettsia rickettsii</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	<i>Rickettsia felis</i>	<i>Rickettsia bellii</i>
Pedreira	11/19 (57,9%)	12/19 (63,1%)	13/19 (68,4%)	7/19 (36,8%)
Mogi das Cruzes	9/13 (69,2%)	9/13 (69,2%)	8/13 (61,5%)	5/13 (38,5%)
Piracicaba	3/7 (42,8%)	3/7 (42,8%)	2/7 (28,6%)	1/7 (14,3%)
São Paulo	3/11 (27,3%)	3/11 (27,3%)	3/11 (27,3%)	0/11 (0,0%)
Pirassununga	1/5 (20,0%)	0/5 (0,0%)	0/5 (0,0%)	0/5 (0,0%)
Total	27/55 (49,1%)	27/55 (49,1%)	26/55 (47,3%)	13/55 (23,6%)

4.5.1.3 Gatos

Detectou-se a presença de anticorpos anti-*R. rickettsii*, anti-*R. parkeri* em 19 (76,0%); anti-*R. felis* em 16 (64,0%) e anti-*R. bellii* em 11 (44,0%) gatos (Tabela 13). Não houve associação entre a frequência de gatos reagentes aos antígenos, das áreas endêmicas (grupo 1) e não endêmicas (grupo 2) ($p>0,05$).

Tabela 16 – Presença de anticorpos anti-*Rickettsia* spp em gatos do Estado de São Paulo, através da reação de imunofluorescência indireta

Gatos	<i>Rickettsia rickettsii</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	<i>Rickettsia felis</i>	<i>Rickettsia bellii</i>
Pedreira	3/3 (100,0%)	3/3 (100,0%)	3/3 (100,0%)	2/3 (66,7%)
Mogi das Cruzes	3/3 (100,0%)	3/3 (100,0%)	3/3 (100,0%)	2/3 (66,7)
Piracicaba	7/7 (100,0)	6/7 (85,7%)	6/7 (85,7%)	4/7 (57,1%)
São Paulo	3/6 (50,0%)	3/6 (50,0%)	2/6 (33,3%)	0/6 (0,0%)
Pirassununga	3/6 (50,0%)	4/6 (66,7%)	2/6 (33,3%)	3/6 (50,0%)
Total	19/25 (76,0%)	19/25 (76,0%)	16/25 (64,0%)	11/25 (44,0%)

4.5.1.4 Equínos

Detectou-se a presença de anticorpos anti-*R. rickettsii* e anti-*R. parkeri* em 48 (56,5 %), anti-*R. felis* em 47 (55,3%) e anti-*R. bellii* em 62 (72,9%) eqüinos (Tabela 14). À análise estatística, houve associação entre a frequência de eqüinos reagentes aos diferentes antígenos, das áreas endêmicas (grupo 1) e não endêmicas (grupo 2) ($p<0,05$).

Tabela 17 – Presença de anticorpos anti-*Rickettsia* spp em eqüinos do Estado de São Paulo, através da reação de imunofluorescência indireta

Eqüinos	<i>Rickettsia rickettsii</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	<i>Rickettsia felis</i>	<i>Rickettsia bellii</i>
Pedreira	18/20 (90,0%)	18/20 (90,0%)	19/20 (95,0%)	19/20 (95,0%)
Mogi das Cruzes	2/5 (40,0%)	2/5 (40,0%)	2/5 (40,0%)	3/5 (60,0%)
Piracicaba	17/21 (80,9%)	17/21 (80,9%)	17/21 (80,9%)	19/21 (90,5%)
São Paulo	7/20 (35,0%)	7/20 (35,0%)	5/20 (35,0%)	11/20 (55,0%)
Pirassununga	4/19 (21,0%)	4/19 (21,0%)	4/19 (21,0%)	10/19 (52,6%)
Total	48/85 (56,5%)	48/85 (56,5%)	47/85 (55,3%)	62/85 (72,9%)

4.5.1.4 Humanos

Detectou-se a presença de anticorpos anti-*R. rickettsii* em 34 (14,3%), anti-*R. parkeri* em 32 (13,4%), anti-*R. felis* em 28 (11,8%) e anti-*R. bellii* em 23 (9,7%) humanos (Tabela 15). Não houve associação entre a frequência de humanos reagentes aos antígenos, das áreas endêmicas e não endêmicas ($p>0,05$).

Tabela 18 – Presença de anticorpos anti-*Rickettsia* spp em humanos do Estado de São Paulo, através da reação de imunofluorescência indireta

Humanos	<i>Rickettsia rickettsii</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	<i>Rickettsia felis</i>	<i>Rickettsia bellii</i>
Pedreira	8/52 (15,4%)	8/52 (15,4%)	8/52 (15,4%)	5/52 (9,6%)
Mogi das Cruzes	4/21 (19,0%)	4/21 (19,0%)	4/21 (19,0%)	4/21 (19,0%)
Piracicaba	7/69 (10,1%)	5/69 (7,2%)	5/69 (7,2%)	6/69 (8,7%)
São Paulo	10/68 (14,7%)	10/68 (14,7%)	6/68 (8,8%)	5/68 (7,3%)
Pirassununga	5/28 (17,8%)	5/28 (17,8%)	5/28 (17,8%)	3/28 (10,7%)
Total	34/238 (14,3%)	32/238 (13,4%)	28/238 (11,8%)	23/238 (9,7%)

4.5.1.5 Análise dos títulos de anticorpos

As titulações obtidas nos soros dos hospedeiros e gambás, cães, gatos, eqüinos e humanos frente aos antígenos testados, estão relacionados nos apêndices de A a E.

Os anticorpos de um hospedeiro foram considerados homólogos a uma dada espécie de *Rickettsia* quando o título apresentado para esta foi pelo menos quatro vezes maior que o título mais alto obtido para as demais espécies, conforme interpretações previamente padronizadas (HORTA et al., 2004). Sob este critério, determinou-se como antígeno provável responsável pela infecção natural nos hospedeiros examinados: *R. rickettsii* (em 10 gambás, 4 cães, 1 eqüino e 2 humanos) e *R. parkeri* (3 gambás, 1 cão e 1 eqüino). A tabela 16 reúne os dados dos hospedeiros que apresentaram títulos nestas condições. Os dados sobre os títulos obtidos para cada um dos hospedeiros encontram-se nos apêndices F a J.

Tabela 19 – Títulos de anticorpos anti-*Rickettsia* spp através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), em gambás, cães, eqüinos e humanos, de cinco áreas do estado de São Paulo para quatro espécies de *Rickettsia*

Soro*	Município	Títulos RIFI para os seguintes antígenos				Antígeno Provável*
		<i>R. rickettsii</i>	<i>R. parkeri</i>	<i>R. felis</i>	<i>R. bellii</i>	
Gambá29	Piracicaba	512	128	64	NR	<i>R. rickettsii</i>
Gambá30	Piracicaba	32.768	4.096	2.048	4.096	<i>R. rickettsii</i>
Gambá33	Piracicaba	4.096	512	512	1.024	<i>R. rickettsii</i>
Gambá36	São Paulo	1.024	256	256	NR	<i>R. rickettsii</i>
Gambá49	Pedreira	2.048	256	128	NR	<i>R. rickettsii</i>
Gambá55	Piracicaba	512	128	128	128	<i>R. rickettsii</i>
Gambá56	Mogi das Cruzes	2.048	256	512	NR	<i>R. rickettsii</i>
Gambá70	Mogi das Cruzes	256	64	NR	NR	<i>R. rickettsii</i>
Gambá93	Pedreira	2.048	512	64	NR	<i>R. rickettsii</i>
Gambá96	Pedreira	512	64	128	NR	<i>R. rickettsii</i>
Gambá46	Pirassununga	256	1.024	256	NR	<i>R. parkeri</i>
Gambá68	Pedreira	64	256	64	NR	<i>R. parkeri</i>
Gambá71	Mogi das Cruzes	64	256	NR	NR	<i>R. parkeri</i>
Cão27	Pedreira	4096	1024	1024	128	<i>R. rickettsii</i>
Cão29	Pedreira	2048	512	256	64	<i>R. rickettsii</i>
Cão33	Mogi das Cruzes	256	64	64	NR	<i>R. rickettsii</i>
Cão36	Mogi das Cruzes	2048	512	NR	NR	<i>R. rickettsii</i>
Cão51	Piracicaba	64	256	NR	NR	<i>R. parkeri</i>
Eqüino	Piracicaba	1024	256	128	256	<i>R. rickettsii</i>
Eqüino	Piracicaba	1024	4096	512	512	<i>R. parkeri</i>
Humano75	Pedreira	256	64	64	NR	<i>R. rickettsii</i>
Humano29	Piracicaba	512	128	64	128	<i>R. rickettsii</i>

NR = Não reagente

*Não estão relacionados os hospedeiros reagentes com titulações próximas para as diferentes espécies de *Rickettsia* que impossibilitaram a inferência sobre a provável espécie de *Rickettsia* causadora da infecção.

4.5.2 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

As amostras de sangue colhidas de gambás (94), cães (55), gatos (25), eqüinos (85) e humanos (238) foram testadas na PCR para o gene *gltA*, utilizando-se os pares de “*primers*” CS3-922/CS3-1068. Não houve amplificação do DNA genômico em nenhuma das amostras.

4.6 CULTIVO CELULAR

4.6.1 Isolamento de *Rickettsia felis*

Alíquotas de dez *pools* constituídos de cinco pulgas cada um, provenientes de Pedreira/SP, foram utilizadas para realização do isolamento de *R. felis*. Cinco alíquotas foram inoculadas em “*shell vials*” contendo células C6/36 e outras cinco em “*shell vials*” contendo células VERO e, a seguir, incubadas a 28°C.

No terceiro dia pós-infecção, realizou-se a troca de meio com antibiótico por um meio sem. No quinto dia, o meio de cultivo foi retirado e corado com fucsina e verde malaquita (GIMENEZ, 1964), quando se visualizou a presença de estruturas semelhantes a *Rickettsia* infectando os dois tipos celulares, numa porcentagem de infecção de aproximadamente 1%. Em outra alíquota do meio, submetida à PCR e sequenciamento de DNA, confirmou-se a presença de *R. felis*.

A seguir, as monocamadas contidas nos “*shell vials*” foram transferidas para garrafas de 25 cm³. Trocas a cada 4-5 dias foram necessárias para manutenção e acompanhamento da evolução da taxa de infecção das células.

A infecção na linhagem de células VERO foi gradativamente diminuindo, até sua total eliminação ao final de 30 dias. No 40º dia, a linhagem de células C6/36, mantida até então a 28°C, foi incubada a 25°C. Após 20 dias de incubação nessa nova temperatura, verificou-se um aumento da taxa de infecção, chegando a 90% de células infectadas. Nesse momento, as células infectadas foram transferidas para uma garrafa de 75 cm³ e após aproximadamente 20 dias atingiram $\cong$ 100% de infecção.

Este procedimento possibilitou sucessivas infecções para manutenção da cepa isolada. Os isolados foram preservados a -80°C. A cepa isolada de *Rickettsia felis*, denominada cepa PEDREIRA, foi confirmada depois de realização de PCR e sequenciamento de DNA (HORTA et al., 2006).

Os fragmentos de DNA analisados do gene *gltA* da cepa PEDREIRA apresentaram 100% de identidade (1.080/1.080 pb) com *R. felis* cepa URRWXCAl2 (Califórnia/EUA - AF210692 e CP000053.1) (OGATA et al., 2005), 97,8% (1.045/1.068) à *R. felis* cepa RF2125 (Tailândia - AF516333.1) (PAROLA et al., 2003) e 97,4% (1.052/1.080) à *Rickettsia felis*-like (Croácia – DQ081187.1) (DUH et al., 2005). A identidade obtida entre a cepa PEDREIRA e outras riquetsias disponibilizadas no GenBank podem ser visualizadas nas tabelas 20, 21 e 22.

4.6.2 Isolamento de *Rickettsia bellii*

Um carrapato adulto *Ixodes loricatus*, fêmea, proveniente de Mogi das Cruzes/SP, foi utilizado para realização do isolamento de *R. bellii*. Seis alíquotas foram inoculadas em “*shell vials*” contendo células C6/36 e outras seis foram inoculadas em “*shell vials*” contendo células VERO. Após o procedimento, o material

foi incubado a 28°C. O meio de meio de cultivo foi retirado semanalmente, e corado com fucsina e verde malaquita (GIMENEZ, 1964). A presença de estruturas semelhantes a *Rickettsia* foi visualizada nas duas linhagens celulares. Nas garrafas infectadas com células VERO, as riquetsias apresentaram sua forma característica (bastonetes filamentosos compridos) 90 pós-infecção. A cepa de *Rickettsia bellii* foi confirmada depois de realização de extração, PCR e sequenciamento de DNA do material isolado, e foi denominada *Rickettsia bellii* cepa IXODES (HORTA et al., 2005e). A identidade obtida entre esta cepa e outras riquetsias disponibilizadas no GenBank (genes *gltA* e *17kDa*) podem ser visualizadas nas tabelas 23 e 24.

Figura 5 – (a), (b) células C6/36 infectadas com *Rickettsia felis* cepa PEDREIRA, coradas com fucsina e verde malaquita; (c), (d) células VERO infectadas com *R. bellii* cepa IXODES, coradas com fucsina e verde malaquita

Tabela 20 – Grau de identidade calculado para cada par de seqüências de nucleotídeos, entre *Rickettsia felis* cepa PEDREIRA isolada de pulgas *Ctenocephalides felis felis* de cães, através do sequenciamento de DNA (**gene *gltA*, 1.070pb**) e seqüências de *Rickettsia* spp do GenBank. 2006

	<i>R</i> <i>aes</i>	<i>R</i> <i>afr</i>	<i>R</i> <i>aka</i>	<i>R</i> <i>amb</i>	<i>R</i> <i>aus</i>	<i>R</i> <i>bel</i>	<i>R</i> <i>can</i>	<i>R</i> <i>con</i>	<i>R</i> <i>fel</i> ⁹	<i>R</i> <i>fel</i> ¹⁰	<i>R</i> <i>fel</i> ¹¹	<i>R</i> <i>fel</i> ¹²	<i>R</i> <i>hon</i>	<i>R</i> <i>jap</i>	<i>R</i> <i>par</i>	<i>R</i> <i>pro</i>	<i>R</i> <i>rhi</i>	<i>R</i> <i>ric</i>	<i>R</i> <i>sib</i>	<i>R</i> <i>typ</i>	<i>R</i> <i>fel P</i>
<i>R. aeschlimannii</i> ¹	1,000	0,987	0,937	0,985	0,946	0,866	0,911	0,988	0,94	0,943	0,937	0,940	0,988	0,985	0,991	0,928	0,989	0,982	0,992	0,926	0,940
<i>R. africae</i> ²	–	1,000	0,938	0,983	0,946	0,864	0,910	0,991	0,939	0,938	0,935	0,936	0,992	0,988	0,994	0,929	0,985	0,985	0,995	0,925	0,939
<i>R. akari</i> ³	–	–	1,000	0,935	0,970	0,854	0,891	0,939	0,946	0,942	0,940	0,940	0,938	0,934	0,938	0,909	0,939	0,933	0,939	0,910	0,946
<i>R. amblyommi</i> ⁴	–	–	–	1,000	0,943	0,862	0,913	0,985	0,938	0,939	0,934	0,933	0,985	0,983	0,985	0,925	0,984	0,978	0,986	0,925	0,938
<i>R. australis</i> ⁵	–	–	–	–	1,000	0,856	0,894	0,945	0,952	0,946	0,943	0,945	0,946	0,942	0,946	0,910	0,946	0,939	0,947	0,910	0,952
<i>R. bellii</i> ⁶	–	–	–	–	–	1,000	0,854	0,864	0,857	0,864	0,865	0,864	0,863	0,862	0,867	0,852	0,862	0,861	0,866	0,857	0,857
<i>R. canadensis</i> ⁷	–	–	–	–	–	–	1,000	0,913	0,907	0,905	0,898	0,902	0,912	0,911	0,913	0,891	0,910	0,908	0,913	0,896	0,907
<i>R. conorii</i> ⁸	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,940	0,939	0,936	0,935	0,994	0,989	0,995	0,929	0,987	0,989	0,996	0,929	0,940
<i>R. felis calif</i> USA ⁹	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,978	0,973	0,973	0,940	0,937	0,940	0,904	0,942	0,934	0,941	0,901	1,000
<i>R. felis</i> 2125 TAI ¹⁰	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,976	0,978	0,940	0,936	0,940	0,905	0,941	0,934	0,940	0,902	0,978
<i>R. felis</i> Hs CRO ¹¹	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,973	0,936	0,933	0,937	0,905	0,939	0,932	0,938	0,902	0,973
<i>R. felis</i> 31 TAI ¹²	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,935	0,932	0,936	0,905	0,938	0,933	0,937	0,903	0,973
<i>R. honei</i> ¹³	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,989	0,995	0,927	0,987	0,987	0,996	0,925	0,940
<i>R. japonica</i> ¹⁴	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,990	0,926	0,985	0,983	0,991	0,926	0,937
<i>R. parkeri</i> ¹⁵	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,929	0,988	0,988	0,999	0,927	0,940
<i>R. prowazekii</i> ¹⁶	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,927	0,922	0,929	0,966	0,904
<i>R. rhipicephali</i> ¹⁷	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,981	0,989	0,925	0,942
<i>R. rickettsii</i> ¹⁸	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,989	0,922	0,934
<i>R. sibirica</i> ¹⁹	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,927	0,941
<i>R. typhi</i> ²⁰	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,901
<i>R. felis</i> PEDREIRA	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000

GenBank: ¹AY259084.1, ²U59733.1, ³U59717.1, ⁴AY375163.1, ⁵U59718.1, ⁶U59716.1, ⁷U59713.1, ⁸U59730.1, ⁹AF210692.1, ¹⁰AF516333.1, ¹¹DQ081187.1, ¹²AF516331.1, ¹³AF018074, ¹⁴U59724.1, ¹⁵U59732.1, ¹⁶U59715.1, ¹⁷U59721.1, ¹⁸U59729.1, ¹⁹U59734.1, ²⁰U59714.1

Tabela 21 – Grau de identidade calculado para cada par de seqüências de nucleotídeos, entre *Rickettsia felis* cepa PEDREIRA isolada de pulgas *Ctenocephalides felis felis* de cães, através do sequenciamento de DNA (**gene 17kDa, 376 pb**) e seqüências de *Rickettsia* spp do GenBank. 2006

	<i>R</i> <i>aka</i>	<i>R</i> <i>amb</i>	<i>R</i> <i>aus</i>	<i>R</i> <i>bel</i>	<i>R</i> <i>can</i>	<i>R</i> <i>con</i>	<i>R</i> <i>fel</i> ⁷	<i>R</i> <i>fel</i> ⁸	<i>R</i> <i>fel</i> ⁹	<i>R</i> <i>fel</i> ¹⁰	<i>R</i> <i>fel</i> ¹¹	<i>R</i> <i>fel</i> ¹²	<i>R</i> <i>fel</i> ¹³	<i>R</i> <i>hon</i>	<i>R</i> <i>par</i>	<i>R</i> <i>pro</i>	<i>R</i> <i>rhi</i>	<i>R</i> <i>ric</i>	<i>R</i> <i>sib</i>	<i>R</i> <i>typ</i>	<i>R</i> <i>fel</i> P
<i>R. akari</i> ¹	1,000	0,944	0,970	0,781	0,845	0,949	0,936	0,936	0,936	0,936	0,936	0,928	0,952	0,954	0,952	0,875	0,952	0,952	0,949	0,880	0,936
<i>R. amblyommii</i> ²	–	1,000	0,962	0,784	0,845	0,978	0,936	0,936	0,936	0,936	0,936	0,928	0,952	0,984	0,981	0,877	0,976	0,981	0,978	0,880	0,936
<i>R. australis</i> ³	–	–	1,000	0,787	0,859	0,962	0,952	0,952	0,952	0,952	0,952	0,949	0,968	0,968	0,965	0,882	0,965	0,965	0,962	0,888	0,952
<i>R. bellii</i> ⁴	–	–	–	1,000	0,816	0,800	0,781	0,781	0,781	0,781	0,781	0,776	0,797	0,795	0,797	0,776	0,797	0,797	0,795	0,779	0,781
<i>R. canadensis</i> ⁵	–	–	–	–	1,000	0,851	0,864	0,864	0,864	0,864	0,864	0,848	0,859	0,856	0,853	0,808	0,859	0,853	0,856	0,797	0,864
<i>R. conorii</i> ⁶	–	–	–	–	–	1,000	0,936	0,936	0,936	0,936	0,936	0,928	0,957	0,994	0,997	0,877	0,981	0,997	0,994	0,880	0,936
<i>R. felis</i> calif EUA ⁷	–	–	–	–	–	–	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,976	0,962	0,941	0,938	0,880	0,938	0,938	0,941	0,880	1,000
<i>R. felis</i> EUA ⁸	–	–	–	–	–	–	–	1,000	1,000	1,000	1,000	0,976	0,962	0,941	0,938	0,880	0,938	0,938	0,941	0,880	1,000
<i>R. felis</i> scc50 EUA ⁹	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	1,000	1,000	0,976	0,962	0,941	0,938	0,880	0,938	0,938	0,941	0,880	1,000
<i>R. felis</i> Hfl87 JAP ¹⁰	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	1,000	0,976	0,962	0,941	0,938	0,880	0,938	0,938	0,941	0,880	1,000
<i>R. felis</i> TwKm03 T ¹¹	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,976	0,962	0,941	0,938	0,880	0,938	0,938	0,941	0,880	1,000
<i>R. felis</i> cf15 EUA ¹²	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,954	0,933	0,930	0,877	0,930	0,93	0,928	0,877	0,976
<i>R. felis</i> c1 e 5 EUA ¹³	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,957	0,954	0,888	0,954	0,954	0,952	0,893	0,962
<i>R. honei</i> ¹⁴	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,997	0,882	0,986	0,997	0,994	0,885	0,941
<i>R. parkeri</i> ¹⁵	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,880	0,984	1,000	0,997	0,882	0,938
<i>R. prowazekii</i> ¹⁶	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,888	0,88	0,877	0,952	0,880
<i>R. rhipicephali</i> ¹⁷	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,984	0,981	0,885	0,938
<i>R. rickettsii</i> ¹⁸	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,997	0,882	0,938
<i>R. sibirica</i> ¹⁹	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,88	0,941
<i>R. typhi</i> ²⁰	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,88
<i>R. felis</i> PEDREIRA	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000

GenBank: ¹AF445383.1, ²U11013.1, ³M74042.1, ⁴AF445380.1, ⁵AF445381.1, ⁶M28480.1, ⁷AF210693.1, ⁸AF195118.1, ⁹DQ102709.1, ¹⁰AB114813.1, ¹¹AY445822.1, ¹²AY953285.1, ¹³AY953286.1, ¹⁴AF060704.1, ¹⁵U17008.1, ¹⁶AY570301.1, ¹⁷U11020.1, ¹⁸AY281069.1, ¹⁹AF445384.1, ²⁰M28481.1

Tabela 22 – Grau de identidade calculado para cada par de seqüências de nucleotídeos, entre *Rickettsia felis* cepa PEDREIRA isolada de pulgas *Ctenocephalides felis felis* de cães, através do sequenciamento de DNA (gene **OmpB**, 703 pb) e seqüências de *Rickettsia* spp do GenBank. 2006

	R aes	R afr	R aka	R amb	R aus	R con	R fel ⁷	R fel ⁸	R fel ⁹	R fel ¹⁰	R hon	R jap	R mon	R par	R rhi	R ric	R sib	R fel P
<i>R. aeschlimannii</i> ¹	1,000	0,923	0,872	0,949	0,895	0,913	0,925	0,923	0,922	0,926	0,913	0,931	0,944	0,918	0,971	0,938	0,925	0,925
<i>R. africae</i> ²	–	1,000	0,851	0,915	0,871	0,967	0,893	0,893	0,89	0,895	0,935	0,922	0,902	0,987	0,913	0,951	0,992	0,893
<i>R. akari</i> ³	–	–	1,000	0,867	0,924	0,844	0,898	0,897	0,897	0,900	0,850	0,864	0,871	0,847	0,870	0,858	0,852	0,898
<i>R. amblyommi</i> ⁴	–	–	–	1,000	0,881	0,908	0,915	0,913	0,913	0,916	0,908	0,929	0,94	0,911	0,951	0,928	0,916	0,915
<i>R. australis</i> ⁵	–	–	–	–	1,000	0,861	0,924	0,922	0,921	0,925	0,865	0,885	0,886	0,868	0,887	0,875	0,872	0,924
<i>R. conorii</i> ⁶	–	–	–	–	–	1,000	0,882	0,883	0,882	0,883	0,925	0,916	0,890	0,961	0,905	0,936	0,968	0,882
<i>R. felis calif</i> EUA ⁷	–	–	–	–	–	–	1,000	0,998	0,994	0,998	0,885	0,903	0,917	0,888	0,921	0,899	0,895	1,000
<i>R. felis</i> EUA ⁸	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,992	0,997	0,886	0,905	0,915	0,888	0,919	0,899	0,895	0,998
<i>R. felis An</i> EUA ⁹	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,995	0,882	0,901	0,914	0,885	0,918	0,896	0,892	0,994
<i>R. felis scc50</i> EUA ¹⁰	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,886	0,905	0,918	0,889	0,922	0,901	0,896	0,998
<i>R. honei</i> ¹¹	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,912	0,891	0,932	0,912	0,945	0,934	0,885
<i>R. japonica</i> ¹²	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,92	0,918	0,923	0,925	0,923	0,903
<i>R. montanensis</i> ¹³	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,897	0,944	0,920	0,904	0,917
<i>R. parkeri</i> ¹⁴	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,908	0,946	0,984	0,888
<i>R. rhipicephali</i> ¹⁵	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,929	0,915	0,921
<i>R. rickettsii</i> ¹⁶	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,955	0,899
<i>R. sibirica</i> ¹⁷	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,895
<i>R. felis</i> PEDREIRA	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000

GenBank: ¹AF123705.1, ²AF123706.1, ³AF123707.1, ⁴AY375164.1, ⁵AF123709.1, ⁶AY643093.1, ⁷AF210695.1, ⁸AF182279.2, ⁹AY394854.1, ¹⁰DQ102711.1, ¹¹AF123724.1, ¹²AF123713.1, ¹³AF123716.1, ¹⁴AF123717.1, ¹⁵AF123719.1, ¹⁶X16353.1, ¹⁷AF123722.1

Tabela 23 – Grau de identidade calculado para cada par de seqüências de nucleotídeos, entre *Rickettsia bellii* cepa IXODES isolada de carrapato *Ixodes loricatus* de gambá, através do sequenciamento de DNA (**gene *gltA*, 1.109 pb**) e seqüências de *Rickettsia* spp do GenBank. 2006

	<i>R</i> <i>aes</i>	<i>R</i> <i>afr</i>	<i>R</i> <i>aka</i>	<i>R</i> <i>amb</i>	<i>R</i> <i>aus</i>	<i>R</i> <i>bel</i> ⁶	<i>R</i> <i>bel</i> ⁷	<i>R</i> <i>bel</i> ⁸	<i>R</i> <i>can</i>	<i>R</i> <i>con</i>	<i>R</i> <i>fel</i>	<i>R</i> <i>hon</i>	<i>R</i> <i>jap</i>	<i>R</i> <i>mon</i>	<i>R</i> <i>par</i>	<i>R</i> <i>pro</i>	<i>R</i> <i>rhi</i>	<i>R</i> <i>ric</i>	<i>R</i> <i>sib</i>	<i>R</i> <i>typ</i>	<i>R</i> <i>bel I</i>
<i>R. aeschlimannii</i> ¹	1,000	0,959	0,911	0,957	0,92	0,841	0,84	0,84	0,886	0,961	0,915	0,961	0,958	0,962	0,963	0,903	0,962	0,954	0,964	0,901	0,841
<i>R. africae</i> ²	–	1,000	0,939	0,982	0,947	0,865	0,864	0,864	0,912	0,99	0,939	0,991	0,988	0,986	0,993	0,930	0,984	0,984	0,994	0,925	0,865
<i>R. akari</i> ³	–	–	1,000	0,937	0,971	0,856	0,855	0,855	0,894	0,941	0,947	0,94	0,936	0,944	0,94	0,911	0,941	0,935	0,941	0,912	0,856
<i>R. amblyommi</i> ⁴	–	–	–	1,000	0,945	0,864	0,863	0,863	0,915	0,985	0,939	0,985	0,983	0,986	0,986	0,926	0,984	0,979	0,987	0,925	0,864
<i>R. australis</i> ⁵	–	–	–	–	1,000	0,858	0,857	0,857	0,896	0,947	0,952	0,948	0,944	0,952	0,948	0,912	0,948	0,941	0,949	0,911	0,858
<i>R. bellii</i> EUA ⁶	–	–	–	–	–	1,000	0,999	0,999	0,855	0,866	0,858	0,865	0,864	0,867	0,869	0,853	0,864	0,863	0,868	0,857	0,998
<i>R. bellii</i> RO BRA ⁷	–	–	–	–	–	–	1,000	0,998	0,854	0,865	0,857	0,864	0,863	0,866	0,868	0,853	0,863	0,862	0,867	0,856	0,997
<i>R. bellii</i> Pe BRA ⁸	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,854	0,865	0,857	0,864	0,863	0,866	0,868	0,853	0,863	0,862	0,867	0,856	0,997
<i>R. canadensis</i> ⁹	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,915	0,91	0,915	0,914	0,917	0,915	0,893	0,913	0,910	0,915	0,897	0,855
<i>R. conorii</i> ¹⁰	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,941	0,994	0,990	0,99	0,995	0,931	0,988	0,990	0,996	0,930	0,866
<i>R. felis</i> EUA ¹¹	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,942	0,938	0,946	0,942	0,905	0,943	0,935	0,943	0,902	0,858
<i>R. honei</i> ¹²	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,99	0,99	0,995	0,929	0,988	0,988	0,996	0,926	0,865
<i>R. japonica</i> ¹³	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,987	0,990	0,928	0,985	0,983	0,991	0,927	0,864
<i>R. montana</i> ¹⁴	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,990	0,932	0,989	0,985	0,991	0,930	0,867
<i>R. parkeri</i> ¹⁵	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,931	0,989	0,989	0,999	0,928	0,869
<i>R. prowazekii</i> ¹⁶	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,929	0,924	0,931	0,966	0,853
<i>R. rhipicephali</i> ¹⁷	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,981	0,990	0,926	0,864
<i>R. rickettsii</i> ¹⁸	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,990	0,923	0,863
<i>R. sibirica</i> ¹⁹	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,928	0,868
<i>R. typhi</i> ²⁰	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,857
<i>R. bellii</i> IXODES	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000

GenBank: ¹AY259084.1, ²U59733.1, ³U59717.1, ⁴AY375163.1, ⁵U59718.1, ⁶U59716.1, ⁷AY375161.1, ⁸AY362703.1, ⁹U59713.1, ¹⁰U59730.1, ¹¹AF210692.1, ¹²AF018074, ¹³U59724.1, ¹⁴U74756.1, ¹⁵U59732.1, ¹⁶U59715.1, ¹⁷U59721.1, ¹⁸U59729.1, ¹⁹U59734.1, ²⁰U59714.1

Tabela 24 – Grau de identidade calculado para cada par de seqüências de nucleotídeos, entre *Rickettsia bellii* cepa IXODES isolada de carrapato *Ixodes loricatus* de gambá, através do sequenciamento de DNA (gene **17kDa, 376 pb**) e seqüências de *Rickettsia* spp do GenBank. 2006

	<i>R</i> <i>aka</i>	<i>R</i> <i>amb</i>	<i>R</i> <i>aus</i>	<i>R</i> <i>bel</i> ⁴	<i>R</i> <i>bel</i> ⁵	<i>R</i> <i>bel</i> ⁶	<i>R</i> <i>can</i>	<i>R</i> <i>con</i>	<i>R</i> <i>fel</i>	<i>R</i> <i>hon</i>	<i>R</i> <i>mon</i>	<i>R</i> <i>par</i>	<i>R</i> <i>pro</i>	<i>R</i> <i>rhi</i>	<i>R</i> <i>ric</i>	<i>R</i> <i>sib</i>	<i>R</i> <i>typ</i>	<i>R</i> <i>bel I</i>
<i>R. akari</i> ¹	1,000	0,944	0,970	0,781	0,781	0,779	0,845	0,949	0,936	0,954	0,949	0,952	0,875	0,952	0,952	0,949	0,880	0,781
<i>R. amblyommii</i> ²	–	1,000	0,962	0,784	0,784	0,781	0,845	0,978	0,936	0,984	0,978	0,981	0,877	0,976	0,981	0,978	0,880	0,784
<i>R. australis</i> ³	–	–	1,000	0,787	0,787	0,784	0,859	0,962	0,952	0,968	0,962	0,965	0,882	0,965	0,965	0,962	0,888	0,787
<i>R. bellii</i> EUA ⁴	–	–	–	1,000	0,994	0,992	0,816	0,800	0,781	0,795	0,792	0,797	0,776	0,797	0,797	0,795	0,779	0,994
<i>R. bellii</i> Pe BRA ⁵	–	–	–	–	1,000	0,997	0,813	0,800	0,781	0,795	0,792	0,797	0,773	0,795	0,797	0,795	0,779	1,000
<i>R. bellii</i> Mg BRA ⁶	–	–	–	–	–	1,000	0,811	0,797	0,779	0,792	0,789	0,795	0,771	0,792	0,795	0,792	0,776	0,997
<i>R. canadensis</i> ⁷	–	–	–	–	–	–	1,000	0,851	0,864	0,856	0,853	0,853	0,808	0,859	0,853	0,856	0,797	0,813
<i>R. conorii</i> ⁸	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,936	0,994	0,984	0,997	0,877	0,981	0,997	0,994	0,880	0,800
<i>R. felis</i> USA ⁹	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,941	0,936	0,938	0,880	0,938	0,938	0,941	0,880	0,781
<i>R. honei</i> ¹⁰	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,989	0,997	0,882	0,986	0,997	0,994	0,885	0,795
<i>R. montana</i> ¹¹	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,986	0,888	0,984	0,986	0,984	0,888	0,792
<i>R. parkeri</i> ¹²	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,880	0,984	1,000	0,997	0,882	0,797
<i>R. prowazekii</i> ¹³	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,888	0,880	0,877	0,952	0,773
<i>R. rhipicephali</i> ¹⁴	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,984	0,981	0,885	0,795
<i>R. rickettsii</i> ¹⁵	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,997	0,882	0,797
<i>R. sibirica</i> ¹⁶	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,880	0,795
<i>R. typhi</i> ¹⁷	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000	0,779
<i>R. bellii</i> IXODES	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,000

GenBank: ¹AF445383.1, ²U11013.1, ³M74042.1, ⁴AF445380.1, ⁵AY362702.1, ⁶DQ115891.1, ⁷AF445381.1, ⁸M28480.1, ⁹AF210693.1, ¹⁰AF060704.1, ¹¹U11017.1, ¹²U17008.1, ¹³AY570301.1, ¹⁴U11020.1, ¹⁵AY281069.1, ¹⁶AF445384.1, ¹⁷M28481.1

5 DISCUSSÃO

No Brasil, são conhecidas três espécies de gambás: *Didelphis albiventris* (gambá de orelha branca) e *Didelphis marsupialis* e *Didelphis aurita* (gambás de orelha preta). Embora alguns autores tenham considerado no passado *D. aurita* como uma sub-espécie de *D. marsupialis*, atualmente é aceito pela comunidade científica a diferenciação em duas espécies. Sem diferenças significativas em relação à morfologia externa, essas espécies podem ser classificadas a partir de sua localização geográfica. *D. marsupialis* foi descrito somente na região amazônica, enquanto que *D. aurita* é encontrado na Bahia e nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (CERQUEIRA; EMMORS; FEER, 1997; LEMOS; 2000). No presente trabalho, *D. aurita* foi encontrado na região de Mata Atlântica (São Paulo, Mogi das Cruzes) e na cidade de Pedreira. Nas cidades de Piracicaba e Pirassununga, situadas mais ao centro do Estado, verificou-se somente a presença de *D. albiventris*. Dentre os animais capturados, a grande maioria era de adultos, seguido por jovens e filhotes. O período de maior incidência de fêmeas com filhotes, ocorreu de julho a dezembro (HORTA et al., 2005a, c).

O critério adotado para escolha do número de colheita de amostras de sangue dos animais domésticos (cães, gatos e eqüinos) e dos humanos, nas diferentes localidades, foi a inclusão de todos os indivíduos presentes em cada sítio pesquisado. Nestas localidades, o número de amostras analisado de algumas espécies de hospedeiro (por exemplo, gatos em Pedreira) representou 100% de sua totalidade nos sítios de colheita. Os resultados obtidos organizados em dois conjuntos, um deles constituído por dados obtidos nas áreas com registros de casos

de febre maculosa (grupo 1) e, o outro, por dados referentes à área onde a doença nunca fora notificada (grupo 2). Os resultados foram comparados entre si, através de análise estatística.

A razão sexual verificada nas pulgas *Ctenocephalides felis felis*, *Polygenis* (*Neopolygenis*) *atopus* e *Rhopalopsyllus lutzi lutzi* está de acordo com a encontrada na literatura (LINARDI; GUIMARÃES, 2000).

Ctenocephalides felis felis foi a espécie de maior prevalência em gambás, cães e gatos, o que evidencia o compartilhamento dessas pulgas entre animais silvestres e domésticos, devido à proximidade de seus habitats em ambientes suburbanos (AZAD et al., 1997; LINARDI; GUIMARAES, 2000). Em Pirassununga, os gambás não apresentaram parasitismo por essa espécie, possivelmente por terem sido capturados em ambiente menos degradado e em matas distantes de habitações humanas, o que diminui a proximidade destes marsupiais com os animais domésticos.

Os gambás vivem em áreas comuns aos hospedeiros primários dos carrapatos do gênero *Amblyomma* na natureza, podendo indicar o grau de infestação ambiental por carrapatos nas áreas onde vivem. No presente trabalho verificou-se o parasitismo nos marsupiais por carrapatos deste gênero, principalmente imaturos, em quatro das cinco áreas estudadas, com exceção do município de São Paulo. Nos sítios estudados deste município não se verificou uma população estabelecida deste grupo de carrapatos.

Foi possível relatar pela primeira vez, o encontro de larvas e ninfas de *A. dubitatum* (= *A. cooperi*) em gambás. Esta espécie de carrapato parasita preferencialmente capivaras, o que torna ainda mais intrigante a epidemiologia das riquetsias em áreas endêmicas, devido à interação que se estabelece entre os

hospedeiros e potenciais reservatórios de riquetsias, através de seus diferentes ectoparasitos (LEMOS et al., 1996b).

Embora o encontro de *Rickettsia felis* em *C. felis felis* já tenha sido verificada em áreas endêmicas para febre maculosa em São Paulo (HORTA et al., 2005d), neste trabalho pôde-se avaliar uma maior diversidade de hospedeiros e uma maior quantidade de ectoparasitos permitindo inferência sobre a inter-relação entre eles. Em pulgas de gambás verificou-se uma alta prevalência de *R. felis* em *C. felis felis* (45,8%); e uma baixa prevalência em pulgas *P. (N.) atopus* (4,0%), representando o primeiro encontro da bactéria nessa espécie. As demais espécies se mostraram negativas para *R. felis*, o que sugere uma inter-relação harmoniosa entre *Ctenocephalides* sp/*R. felis*. Recentemente, nos EUA, foi investigada a presença de infecção natural por *R. felis* em 14 espécies diferentes de pulgas silvestres, tendo sido encontrada positividade em apenas dois indivíduos pertencentes a uma única espécie (*Anomiopsyllus nudata*), representando 0,8% do total (STEVENSON et al., 2005), compatível com os resultados do presente trabalho.

Sobre cães e gatos, respectivamente, 42,0% e 42,4% das *C. felis felis* foram encontradas infectadas pela bactéria. A transmissão transovariana implica em um importante mecanismo de manutenção da *R. felis* na natureza, o que pode justificar a alta prevalência encontrada. Todos os fragmentos de DNA seqüenciados de *R. felis* das pulgas foram idênticos entre si (gene *gltA*).

Neste trabalho, após análise estatística comparativa da prevalência de pulgas positivas de gambás e cães para *R. felis*, entre os grupos, verificou-se uma associação entre o encontro de pulgas infectadas e áreas com a presença de casos confirmados de febre maculosa. Contudo, em relação às pulgas de gatos, não houve diferença significativa. Mais estudos sobre capacidade e competência vetorial destes

artrópodes precisam ser realizados. A falta de diagnóstico específico da riquetsiose causada pela *R. felis* constitui uma dificuldade no que diz respeito ao estudo natural da doença e que pode estar contribuindo para a ausência de dados sobre sua morbidade e letalidade.

No Brasil, além da *C. felis felis*, outra espécie pode ser encontrada de forma esporádica parasitando cães, *Ctenocephalides canis*, ocorrendo poucos relatos de infestações por esta espécie. A prevalência de infecção por *R. felis* foi verificada em *C. felis felis* (70,8%) e *C. canis* (29,2%), colhidas de cães em aldeias indígenas situadas dentro do município de São Paulo (HORTA et al., 2005b).

Neste estudo, registrou-se pela primeira vez, o encontro de *Rickettsia bellii* em um espécimen de pulga *P. (N.) atopus* colhido sobre gambá. É possível que o achado represente uma infecção acidental, uma vez que vários exemplares da mesma espécie, colhidos sobre o mesmo hospedeiro, foram negativos. *R. bellii* é uma bactéria de patogenicidade desconhecida e já foi descrito em diversos gêneros de carrapatos. Mais estudos são necessários para se determinar se esses artrópodes têm alguma participação no ciclo dessas riquetsias ou se apenas se infectaram através da co-alimentação com outros vetores infectados, durante o repasto sanguíneo, sobre um mesmo hospedeiro.

Embora existam indícios de infecção por *R. felis* em carrapatos, nenhum trabalho desenvolvido no país obteve êxito na adequada caracterização molecular e isolamento dessa espécie nesse tipo de vetor (CARDOSO et al., 2006; HORTA, 2002; PINTER, 2003; VIANNA, 2002). Em estudos semelhantes, verificou-se a presença de *R. felis* em carrapatos *Haemaphysalis flava*, *Haemaphysalis kitasatoe* e *Ixodes ovatus* no Japão (ISHIKURA et al., 2003) e em *Haemaphysalis sulcata* na Croácia (DUH et al., 2005). No presente trabalho, constatou-se a presença de duas

larvas e duas ninfas de *Amblyomma* sp e dois *Ixodes loricatus* infectados com *R. felis*, identificadas através de pesquisa do gene *gltA*. Todos os fragmentos de DNA seqüenciados de *R. felis* dos carrapatos foram idênticos aos das pulgas, apresentando o mesmo grau de identidade entre si. Os dados ora apresentados dão suporte aos trabalhos anteriores, comprovando o encontro de *R. felis* em carrapatos e reforçam a hipótese sobre uma potencial participação destes artrópodes no ciclo desta riquetsia. No entanto, para que se possam incriminar essas espécies de carrapatos como potenciais vetores, necessita-se de mais estudos epidemiológicos, principalmente em relação à capacidade e competência vetorial desses artrópodes.

Em carrapatos de gambás, verificou-se através de estudo molecular, uma taxa de infecção por *Rickettsia* spp em 2,3% dos carrapatos do gênero *Amblyomma*, sendo apenas 0,5% para riquetsia do GFM, o que está de acordo com a literatura registrada para esse gênero (LEMOS et al., 1997). Em carrapatos *Ixodes loricatus*, a prevalência de infecção por *R. bellii* foi de 59,1%. Essa bactéria é considerada não-patogênica para os mamíferos (PHILIP et al., 1983). A alta prevalência verificada em *I. loricatus* sugere que essa bactéria não tenha ação deletéria na população dessa espécie de carrapatos, diferentemente do que ocorre com bactérias do GFM, patogênicas ao homem, em seus vetores (NIEBYLSKI; PEACOCK; SCHWAN, 1999).

A partir de uma fêmea *I. loricatus* ingurgitada, positiva para *R. bellii*, colhida de um gambá no município de Mogi das Cruzes, foi possível o estabelecimento e manutenção de uma colônia em laboratório. A infecção nas gerações sucessiva foi avaliada pela PCR, o que permitiu verificar pela primeira vez a transmissão trans-ovariana e a sobrevivência trans-estadial desta espécie de riquetsia neste artrópode (HORTA et al., 2005e). A partir de indivíduos da colônia foi possível o isolamento e

cultivo de *R. bellii* em células VERO (cepa IXODES) (HORTA et al., 2005e). Adultos de *I. loricatus* são freqüentemente encontrados sobre marsupiais (gambás e cuícas) e os imaturos sobre roedores silvestres (ABEL et al., 2000; SCHUMAKER et al., 2000).

Pela primeira vez no país, foram realizados testes sorológicos de animais e humanos, frente aos antígenos de *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. felis* e *R. bellii*, espécies notificadas na região Sudeste do país. A análise comparativa dos títulos de anticorpos específicos permitiu inferência sobre o possível agente etiológico causador da infecção no hospedeiro.

Pela análise estatística, somente o sorodiagnóstico dos eqüinos apresentou diferença entre os dois grupos estudados (endêmicos e não endêmicos) ($p < 0,5$) (Tabela 17), confirmando estudos anteriores (SANGIONI et al., 2005). Embora a prevalência de amostras reagente em gambás não tenha apresentado diferença significativa quanto às titulações entre os grupos analisados, verificou-se uma provável infecção por *R. rickettsii* em 10 indivíduos e por *R. parkeri* em dois outros, todos oriundos dos quatro municípios do grupo 1 (endêmico). Os títulos verificados contra essas riquetsias foram quatro vezes mais elevados do que aqueles referentes às demais espécies. Empregando-se o mesmo critério em Pirassununga (grupo 2), *R. parkeri* constitui a causa provável de infecção de um gambá. Portanto, esta área controle representa o único local estudado onde não foi possível se determinar uma provável infecção por *R. rickettsii* tanto em gambás como em outros hospedeiros (Tabela 19). Este fato associado à ausência de casos confirmados da doença no município e à observação de títulos mais baixos em relação aos verificados no grupo endêmico (Apêndices A a E), sugere que a infecção por riquetsias nesse local seja

causada por espécies menos virulentas, como *R. parkeri* (PADDOCK et al., 2004) e *R. felis* (GALVÃO et al., 2004, RAOULT et al., 2001).

Verificou-se humanos e animais reagentes a antígenos de *R. felis* que apresentaram títulos de anticorpos maiores para esta espécie (Apêndices F a J) em relação às outras. Porém, a infecção por essa espécie não pôde ser confirmada através da análise da resposta do hospedeiro frente aos diferentes antígenos testados (RIFI), segundo os critérios adotados, podendo se tratar de reação cruzada. No entanto, esses achados podem representar indícios de infecção por esse agente, o que poderia ser comprovado por técnicas de diagnóstico mais específicas (“*cross-adsorption*”, “*western blotting*”) (JENSENIUS et al., 2004; LA-SCOLA; RAOULT, 1997).

Os hospedeiros primários de *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma aureolatum*, respectivamente, eqüinos e cães, são considerados sentinelas da doença no país (HORTA et al., 2004; LEMOS et al., 1996a; PINTER, 2003). No presente trabalho, além destes hospedeiros, verificou-se também uma alta prevalência de gatos e gambás, hospedeiros secundários, com altos títulos anti-*Rickettsia* spp. Considerando-se os hábitos destes animais (domiciliar e/ou peridomiciliar), pode-se supor que em algumas áreas, na ausência dos hospedeiros primários, estes possam ser empregados como sinalizadores da circulação de riquetsias do grupo febre maculosa.

As amostras de sangue colhidas de gambás, cães, gatos, eqüinos e humanos mostraram-se negativas na pesquisa do gene *gltA*. A detecção de *Rickettsia* spp em sangue ocorre no período de bacteremia dos hospedeiros, isto é, durante o período da evolução desta doença aguda para a cura ou morte. Este fato pode justificar a negatividade observada nas amostras de sangue analisadas.

A prevalência de um agente etiológico é, em princípio, maior entre seus reservatórios naturais. Porém, a pesquisa direta do agente no sangue de gambás, potenciais reservatórios naturais de riquetsias, também apresentaram resultados negativos. É necessário ressaltar, contudo, que no que se refere a riquetsias do GFM, o papel de reservatório precisa ser melhor esclarecido. Alguns mamíferos como, por exemplo, capivaras (TRAVASSOS; VALLEJO, 1942), apresentam uma bacteremia de curta duração, o que lhes confere um caráter de reservatórios temporários, isto é mamíferos amplificadores temporários. Neste curto período podem infectar vetores das riquetsias.

A análise dos resultados obtida no presente trabalho demonstra a presença de anticorpos anti-*Rickettsia* spp nos animais, inclusive em gambás, indicando fortemente a participação desses mamíferos como amplificadores das riquetsioses nas áreas investigadas. Estudos mais aprofundados devem ser realizados para se comprovar a duração da bacteremia nestes hospedeiros.

O isolamento e cultivo de *R. felis* foi realizado, de forma inédita, em uma linhagem de células de mosquito *Aedes albopictus* (C6/36). Estas células podem ser cultivadas a uma temperatura mais baixa, o que possibilitou a manutenção do agente no cultivo celular. Raoult et al. (2001) relataram o isolamento de *R. felis* pela primeira vez, em células de anfíbio *Xenopus laevis* (XTC-2), porém a taxa de infecção celular obtida não foi relatada. O presente estudo fornece um modelo eficiente de cultivo celular onde as células atingem 90-100% de infecção após alguns dias de incubação, a partir do isolamento primário (HORTA et al., 2006). Espera-se que essa técnica venha a contribuir para o desenvolvimento de novas pesquisas, particularmente sobre a epidemiologia de *R. felis* no âmbito mundial.

O presente trabalho fornece subsídios para o entendimento da epidemiologia da febre maculosa no Estado de São Paulo, através da colheita de informações sobre o grau de participação dos potenciais hospedeiros de riquétsias e seus diferentes ectoparasitos.

Desta forma, espera-se que os resultados obtidos sirvam como base para estudos posteriores visando diagnóstico laboratorial mais específico e aspectos da capacidade e competência vetorial das diferentes espécies de artrópodes encontradas naturalmente infectadas. Adicionalmente, são necessários estudos sobre os diversos aspectos da interação entre as riquétsias e seus diferentes hospedeiros.

6 CONCLUSÕES

No presente estudo foi possível:

1. identificar pulgas (*Adoratopsylla* (*Adoratopsylla*) *antiquorum antiquorum*, *Ctenocephalides felis felis*, *Polygenis* (*Neopolygenis*) *atopus*, *Polygenies* (*Polygenis*) *roberti roberti*, *Polygenis* (*Polygenis*) *tripus*, *Polygenis* (*Polygenis*) *rimatus*, *Rhopalopsyllus lugubris lugubris* e *Rhopalopsyllus lutzi lutzi*) e carrapatos (*Amblyomma dubitatum*, *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma aureolatum*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Ixodes loricatus*) colhidos em gambás, cães e gatos de áreas endêmicas e não endêmicas para febre maculosa do Estado de São Paulo;
2. verificar uma associação entre pulgas infectadas por *Rickettsia felis*, colhidas em gambás e cães, e áreas endêmicas para febre maculosa;
3. detectar a infecção por *R. felis* em pulgas *Ctenocephalides felis felis* de gambás (45,8%), de cães (42,0%) e de gatos (42,4%); em *Polygenis* (*Neopolygenis*) *atopus* de gambás (4,0%) e, em carrapatos, *Amblyomma* spp (0,7%) e *Ixodes loricatus* (1,8%);
4. detectar a infecção por *R. bellii* em carrapatos *Ixodes loricatus* (59,1%), *Amblyomma dubitatum* (8,7%) e *Amblyomma* spp (0,9%) e em pulga *P. (N.) atopus* (1%);

5. detectar a infecção por *Rickettsia amblyommii* em carrapato *Amblyomma cajennense* (1,2%);
6. detectar a infecção por *Rickettsia* sp do Grupo da Febre Maculosa em carrapatos *Amblyomma* spp (0,3%);
7. verificar identidade de 100% entre as seqüências de *R. felis* encontradas nos vetores oriundos de diferentes regiões geográficas;
8. avaliar o sangue de animais e humanos das áreas estudadas, não tendo sido detectada a presença de *Rickettsia* spp;
9. constatar a presença de animais e humanos reagentes para antígenos de *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri*, *R. felis* e *R. bellii*;
10. sugerir, através da análise da titulação de anticorpos, infecção por *R. rickettsii* em humanos, gambás, cães, eqüinos e *R. parkeri* em gambás, cães e eqüinos;
11. verificar que células de mosquito C6/36 e células VERO foram eficazes no isolamento, respectivamente, de *R. felis* a partir de pulgas e de *R. bellii* partir de carrapatos.

REFERÊNCIAS¹

ABEL, I. S.; MARZAGÃO, G.; IOSINARI, N. H.; SCHUMAKER, T. T. S. *Borrelia*-like spirochetes recovered from ticks in the Atlantic Forest Reserve, Cotia County, State of São Paulo. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 5, p. 521-524, 2000.

ADAMS, J. R.; SCHMIDTMAN, E. T.; AZAD, A. F. Infection of colonized cat fleas *Ctenocephalides felis* (Bouché) with a *Rickettsia*-Like microorganism. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 43, p. 400-409, 1990.

ARAGÃO, H.; FONSECA, F. Notas de Ixodologia. VII Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 59, p. 115-129, 1961.

AZAD, A. F.; BEARD, C. B. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 2, p. 179-186, 1998.

AZAD, A. F.; RADULOVIC, S.; HIGGINS, J. A.; NODEN, B. H.; TROYER, J. M. Flea-borne Rickettsioses: ecologic considerations. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, n. 3, p. 319-327, 1997.

AZAD, A. F.; SACCI-JR, J. B.; NELSON, W. M.; DASCH, G. A.; SCHMIDTMAN, E. T.; CARL M. Genetic characterization and transovarial transmission of a typhus-like *Rickettsia* found in cat fleas. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, p. 43-46, 1992.

AZAD, A. F.; WEBB, L.; CARL, M.; DASCH, G. A. Detection of *Rickettsiae* in arthropod vectors by DNA amplification using the polymerase chain reaction. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 590, p. 557-563, 1990.

BLAIR, P. J.; JIANG, J.; SCHOELLER, G. B.; MORON, C.; ANAYA, E.; CESPEDES, M.; CRUZ, C.; FELICES, V.; GUEVARA, C.; MENDOZA, L.; VILLASECA, P.; SUMNER, J. W.; RICHARDS, A. L.; OLSON, J. G.; Characterization of spotted fever group *Rickettsiae* in flea and tick specimens from northern Peru. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 11, p. 4961-4967, 2004.

¹ Conforme as diretrizes para apresentação de dissertações e teses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da universidade de São Paulo. 4ª ed. São Paulo: FMVZ-USP, 2003.

BOUYER, D. H.; STENOS, J.; VALDES, P. C.; MORON, C. G.; POPOV, V. L.; ZAVALA-VELAZQUEZ, J. E.; FOIL, L. D.; STOTHARD, D. R.; AZAD, A. F.; WALKER, D. H. *Rickettsia felis*: molecular characterization of a new member of the spotted fever group. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 339-347, 2001.

BROUQUI, P.; BACELLAR, F.; BARANTON, G.; BIRTLES, R. J.; BJOERSDORFF, A.; BLANCO, J. R.; CARUSO, G.; CINCO, M.; FOURNIER, P. E.; FRANCAVILLA, E.; JENSENIUS, M.; KAZAR, J.; LAFERL, H.; LAKOS, A.; LOTRIC-FURLAN, S.; MAURIN, M.; OTEO, J. A.; PAROLA, P.; PEREZ-EID, C.; PETER, O.; POSTIC, D.; RAOULT, D.; TELLEZ, A.; TSELENTIS, Y.; WILSKKE, B. Guideline for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n. 12, p. 1108-1132, 2004.

CÁCERES, N. C.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A. Foods habits, home range and activity of *Didelphis aurita* (Mammalia, Marsupialia) in a forest fragment of southern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 36, n. 2, p. 85-92, 2001.

CARDOSO, L. D.; FREITAS, R. N.; MAFRA, C. L.; NEVES, C. V. B.; FIGUEIRA, F. C. B.; LABRUNA, M. B.; GENNARI, S. M.; WALKER, D. H.; GALVÃO, M. A. M. Caracterização de *Rickettsia* spp circulante em foco silencioso de febre maculosa brasileira no Município de Caratinga, Minas Gerais, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 22, n. 3, p. 495-501, 2006.

CERQUEIRA, R.; LEMOS, B. Morphometric differentiation between neotropical black-eared opossums, *Didelphis marsupialis* and *D. aurita* (Didelphimorphia, Didelphidae). **Mammalia**, v. 64, n. 3, p. 319-327, 2000.

CVE – CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Distribuição dos casos confirmados de febre maculosa segundo município provável de infecção no Estado de São Paulo: 1985–2005.** Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/zoo/fm_d9803.htm>. Acesso em: 26 mar. 2006.

DIAS, E.; MARTINS, A. V. Spotted Fever in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 19, p. 103-108, 1939.

DUH, D. PUNDA-POLIC, V.; PETROVEC, M.; TRILAR, T.; BRADARIC, N.; AVSIC-ZUPANA, T. Molecular identification of flea-transmitted *Rickettsia felis*-like bacteria in *Haemaphysalis sulcata* ticks collected from domestic animals in southern Croatia. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON RICKETTSIAE AND RICKETTSIAL DISEASES, 4, 2005b, Logroño, Espanha. **Anais...** res. P-123.

EMMORS, L. H.; FEER, F. **Neotropical rainforest mammals – a field guide**, 2. ed. Chicago; London: The University of Chicago Press. 1997. 307 p.

EREMEEVA, M. E.; DASCH, G. A. Rickettsiae. In: LEDERBERG, J. **Encyclopedia of microbiology**, New York: Academic Press, 2000. v. 4, p. 140-180.

EREMEEVA, M. E.; YU, X.; RAOULT, D. Differentiation among Spotted Fever Group *Rickettsiae* species by analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 803-810, 1994.

FONTES, L. R.; GOMES, S. M. A.; ANJOS, E. D.; ANDRADE, J. C. R. Brazilian Spotted Fever transmitted by *Amblyomma aureolatum* (ACARI) in Mogi das Cruzes, Brazil: Report of four human cases and environmental control measures. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 21., 2000, Brasil. **Anais...** p. 749.

GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C.; CHAMONE, C. B.; CALIC, S. B.; ZAVALA-VELAZQUEZ, J. E.; WALKER, D. H. Clinical and laboratorial evidence of *Rickettsia felis* infections in Latin America. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 3, p.238-240, 2004.

GEHRKE, F.; NASCIMENTO, E. M. M.; SOUZA, E. R.; COLOMBO, S.; SILVA, L. J.; SCHUMAKER, T. T. S. Detection of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia* sp in 24 patient blood clots from different municipalities of the State of São Paulo. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON RICKETTSIAE AND RICKETTSIAL DISEASES, 4, 2005, Logroño, Espanha. **Anais...** res. P-164.

GIMÉNEZ, D. F. Staining Rickettsiae in yolk-sac cultures. **Stain Technology**, v. 39, n. 3, p. 135-140, 1964.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, v. 41, P. 95-98. 1999.

HIGGINS, J. A.; RADULOVIC, S.; SCHRIEFER, M. E.; AZAD, A. F. *Rickettsia felis*: A new species of pathogenic *Rickettsia* isolated from cat fleas. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 671-674, 1996.

HIGGINS, J. A.; SACCI, J. B. J.; SCHRIEFER, M. E.; ENDRIS, R. G.; AZAD, A. F. Molecular identification of *Rickettsia*-like microorganisms associated with colonized cat fleas (*Ctenocephalides felis*). **Insect Molecular Biology**, v. 3, p. 27-33, 1994.

HORTA, M. C. **Pesquisa de Infecção por Riquetsias do Grupo da Febre Maculosa em Humanos, Equídeos, Caninos e em Diferentes Estádios de Vida de *Amblyomma cajennense*, Provenientes de uma Área Endêmica do Estado de São Paulo.** 2002. 72 f. Dissertação (Mestrado Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, SP, 2002.

HORTA, M. C.; BERTOLA, P. B.; FERREIRA, P. M.; BATAGLIOLI, M. C.; SCHUMAKER, T. T. S. Análise populacional de *Didelphis aurita* e *D. albiventris* no Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MASTOZOOLOGIA, 3, 2005, Aracruz/ES. **Anais...** 2005a. p. 21.

HORTA, M. C.; CHIEBAO, D. P.; SOUZA, D. B.; FERREIRA, F.; PINHEIRO, S. R.; LABRUNA, M. B.; SCHUMAKER, T. T. S. Prevalence of *Rickettsia felis* in the fleas *Ctenocephalides felis felis* and *Ctenocephalides canis* from two Indian communities in São Paulo municipality, Brazil. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON RICKETTSIAE AND RICKETTSIAL DISEASES, 4, 2005b, Logroño, Espanha. **Anais...** res. P-165.

HORTA, M. C.; FERREIRA, P. M.; GERALDI, V. C.; SUMMA, M. E. L.; ROSSI, F. W.; JOPPERT, A. M.; BERTOLA, P. B.; FERREIRA, F.; SCHUMAKER, T. T. S. Mapeamento da distribuição de gambás (*Didelphis* sp) capturados no município de São Paulo e avaliação do parasitismo por pulgas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MASTOZOOLOGIA, 3, 2005c, Aracruz/ES. **Anais...** p. 31.

HORTA, M. C.; LABRUNA, M. B.; DURIGON, E. L.; SCHUMAKER, T. T. S. Isolation and Cultivation of *Rickettsia felis* in the mosquito cell line C6/36. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 2, p. 1705-1707, 2006.

HORTA, M. C.; PINTER, A.; CORTEZ, A.; SOARES, R. M.; GENNARI, S. M.; SCHUMAKER, T. T. S.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia felis* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae) in the State of São Paulo, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 3, p. 321-325, 2005d.

HORTA, M. C.; PINTER, A.; SCHUMAKER, T. T. S.; LABRUNA, M. B. Natural infection, transovarial transmission, and transstadial survival of *Rickettsia bellii* in the tick *Ixodes loricatus* (Acari: Ixodidae) from Brazil. INTERNATIONAL CONFERENCE ON RICKETTSIAE AND RICKETTSIAL DISEASES, 4, 2005e, Logroño, Espanha. **Anais...** res. O-55.

HORTA, M. C.; SANGIONI, L. A.; VIANNA, M. C.; SCHUMAKER, T. T. S.; LABRUNA, M. B.; WALKER, D. H. Prevalence of antibodies to spotted fever group *Rickettsiae* in humans and domestic animals in a Brazilian spotted fever-endemic area in the State of São Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group *Rickettsia*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 1, p.93-97, 2004.

IGARASHI, A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. **The Journal of General Virology**, v. 40, p. 531-544, 1978.

ISHIKURA, M.; ANDO, S.; SHINAGAWA, Y.; MATSUURA, K.; HASEGAWA, S.; NAKAYAMA, T.; FUJITA, H.; WATANABE, M. Phylogenetic analysis of spotted fever group *Rickettsiae* based on *gltA*, 17-kDa, and *rOmpA* genes Amplified by nested PCR from ticks in Japan. **Microbiology and Immunology**, v. 47, n. 11, p. 823-832, 2003.

JENSENIUS, M.; FOURNIER, P. E.; VENE, S.; RINGERTZ, S. H.; MYRVANG, B.; RAOULT, D. Comparison of immunofluorescence, western blotting, and cross-adsorption assays for diagnosis of African Tick Bite Fever. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, n.4, p. 786-788, 2004.

KELLY, P. J.; MEADS, N.; THEOBALD, A.; FOURNIER, P. E.; RAOULT, D. *Rickettsia felis*, *Bartonella henselae*, and *B. clarridgeiae*, New Zealand. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 5, p. 967-968, 2004.

KELLY, P. J.; RAOULT, D.; MASON, P. R. Isolation of Spotted Fever Group *Rickettsias* from triturated ticks using a modification of the centrifugation-shell vial technique. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, p.397-398, 1991.

KENNY, M. J.; BIRTLES, R. J.; DAY, M. J.; SHAW, S. E. *Rickettsia felis* in the United Kingdom. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 8, p. 1023-1024, 2003.

LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; CAMARGO, E. P.; WALKER, D. H. Detection of a spotted fever group *Rickettsia* in the tick *Haemaphysalis justakochi* in Rondonia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 169-174, 2005a.

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; BOUYER, D. H.; MCBRIDE, J.; CAMARGO, L. M. A.; CAMARGO, E. P.; POPOV, V.; WALKER, D. H. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 6, p. 1073-1081, 2004b.

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M. C.; BOUYER, D. H.; McBRIDE, J. W.; PINTER, A.; POPOV, V.; GENNARI, S. M.; WALKER, D. H. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of São Paulo, Brazil, where brazilian spotted fever is endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 90-98, 2004a.

LA-SCOLA, B.; RAOULT, D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 11, p. 2715–2727, 1997.

LEMOS, E. R. S.; MACHADO, R. D.; COURA, J. R.; GUIMARÃES, M. A. A. M.; CHAGAS, N. Epidemiological Aspects of the Brazilian Spotted Fever: Serological Survey of Dogs and Horses in an Endemic Area in the State of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 36, n. 6, p. 427-430, 1996a.

LEMOS, E. R. S.; MELLES, H. H. B.; COLOMBO, S.; MACHADO, R. D.; COURA, J. R.; GUIMARÃES, M. A. A.; SANSEVERINO, S. R.; MOURA, A. Primary isolation of Spotted Fever Group *Rickettsiae* from *Amblyomma cooperi* collected from *Hydrochaeris hydrochaeris* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 273-275, 1996b.

LEMOS, E. R. S.; MACHADO, R. D.; PIRES, F. D. A.; MACHADO, S. L.; COSTA, L. M. C.; COURA, J. R. *Rickettsiae*-infected ticks in an endemic area of Spotted Fever in the State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 4, p. 477-481, 1997.

LINARDI, P. M.; GUIMARÃES, L. R. **Sifonápteros do Brasil**. São Paulo: Museu de Zoologia USP/FAPESP, 2000. 291p.

MÁRQUEZ, F. J.; MUNIAN, M. A.; PÉREZ, J. M.; PACHÓN, J. Presence of *Rickettsia felis* in the cat flea from Southwestern Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 1, p. 89-91, 2002.

MOREIRA, J. A.; MAGALHAES, O. Typho exanthematico em Minas Gerais. **Brasil-Medico**, v. 21, p. 465-470, 1935.

NASCIMENTO, E. M.; GEHRKE, F. S.; MALDONADO, R. A.; COLOMBO, S.; SILVA, L. J.; SCHUMAKER, T. T. S. Detection of a Brazilian spotted fever infection by polymerase chain reaction in a patient from the state of São Paulo. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 3, p. 277-279, 2005.

NIEBYLSKI, M. L.; PEACOCK, M. G.; SCHWAN, T. G. Lethal effect of *Rickettsia rickettsii* on its tick vector (*Dermacentor andersoni*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 773-338, 1999.

NODEN, B. H.; RADULOVIC, S.; HIGGINS, J. A.; AZAD, A. F. Molecular Identification of *Rickettsia typhi* and *Rickettsia felis* in co-infected *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 35, n. 4, p. 410-414, 1998.

OGATA, H.; RENESTO, P.; AUDIC, S.; ROBERT, C.; BLANC, G.; FOURNIER, P. E.; PARINELLO, H.; CLAVERIE, J. M.; RAOULT, D. The genome sequence of *Rickettsia felis* identifies the first putative conjugative plasmid in an obligate intracellular parasite. **PLoS Biology**, v. 3, n. 8, p. 1-12, 2005.

OLIVEIRA, R. P.; GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C. L.; CHAMONE, C. B.; CALIC, S. B.; SILVA, S. U.; WALKER, D. H. *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides* spp fleas, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 3, p. 317-319, 2002.

PADDOCK, C. D.; SUMMER, J. W.; COMER, J. A.; ZAKI, S. R.; GOLDSMITH, C. S.; GODDARD, J.; McLELAN, S. L. F.; TAMMINGA, C. L.; OHL, C. A. *Rickettsia parkeri*: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 15, p. 805-811, 2004.

PAROLA, P.; SANOGO, O. Y.; LERDTHUSNEE, K.; ZEAITER, Z.; CHAUVANCY, G.; GONZALEZ, J. P.; MILLER, R. S.; TELFORD III, S. R.; WONGSRICHANALAI, C.; RAOULT, D. Identification of *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. in fleas from the Thai-Myanmar border. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 990, p. 173-181, 2003.

PHILIP, R. N.; CASPER, E. A.; BURGDORFER, W.; GERLOFF, R. K.; HUGHES, L. E.; BELL, E. J. Serologic typing of *Rickettsiae* of the Spotted Fever Group by microimmunofluorescence. **The Journal of Immunology**, v. 121, n. 5, p. 1961-1968, 1978.

PHILIP, R. N.; CASPER, E. A.; ANACKER, R. L.; CORY, J.; HAYES, S. F.; BURGDORFER, W.; YUNKER, E. *Rickettsia bellii* sp. Nov.: a tick-borne *Rickettsia*, widely distributed in the United States, that is distinct from the spotted fever and typhus biogroups. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 33, n. 1, p. 94-106, 1983.

PINTER, A. **Aspectos epidemiológicos da febre maculosa em uma área endêmica do município de Mogi das Cruzes (SP) e estudo em laboratório do ciclo de vida do vetor *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae)**. 2003. 100 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paula, 2003.

PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. INTERNATIONAL CONFERENCE ON RICKETTSIAE AND RICKETTSIAL DISEASES, 4, 2005, Logroño, Espanha. **Anais...** res. O-54.

RADULOVIC, S.; HIGGINS, J. A.; JAWORSKI, D. C.; AZAD, A. F. *In vitro* and *in vivo* antibiotic susceptibilities of ELB rickettsiae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p. 2564-2566, 1995.

RADULOVIC, S.; HIGGINS, J. A.; JAWORSKI, D. C.; AZAD, A. F. *In vitro* and *in vivo* antibiotic susceptibilities of ELB rickettsiae (erratum). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p. 2912, 1996.

RAOULT, D.; FOURNIER, P. E.; ABBOUD, P.; CARON, F. First documented human *Rickettsia aeschlimannii* infection. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 7, p. 748-749, 2002.

RAOULT, D.; LA-SCOLA, B.; ENEA, M.; FOURNIER, P. E.; ROUX, V.; FENOLLAR, F.; GALVÃO, M. A. M.; LAMBALLERIE, X. D. A flea-associated *Rickettsia* pathogenic for humans. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, p. 73-81, 2001.

RAOULT, D.; ROUX, V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, p. 694-719, 1997.

RICHTER, J.; FOURNIER, P. E.; PETRIDOU, J.; HAUSSINGER, D.; RAOULT, D. *Rickettsia felis* infection acquired in Europe and documented by Polymerase Chain Reaction. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 2, p. 207-208, 2002.

ROLAIN, J. M.; BOURRY, O.; DAVOUST, B.; RAOULT, D. *Bartonella Quintana* and *Rickettsia felis* in Gabon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 11, p. 1742-1744, 2005.

ROUX, V.; RAOULT, D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (*OmpB*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 1449-1455, 2000.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory Manual**. 2. ed. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANGIONI, L. A.; HORTA, M. C.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. M.; GALVÃO, M. A. M.; SCHUMAKER, T. T. S.; FERREIRA, F.; VIDOTTO, O.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in animals and Brazilian Spotted Fever endemicity. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 265-270, 2005.

SCHRIEFER, M. E.; SACCI-JR; J. B.; DUMLER, J. S.; BULLEN, M. G.; AZAD, A. F. Identification of a novel Rickettsial infection in a patient diagnosed with murine typhus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 949-954, 1994a.

SCHRIEFER, M. E.; SACCI-JR, J. B.; TAYLOR, J. P.; HIGGINS, J. A.; AZAD, A. F. Murine Typhus: update roles of multiple urban components and a second typhuslike *Rickettsia*. **Journal of Medical Entomology**, v. 31, p. 681-685, 1994b.

SCHUMAKER, T. T. S.; LABRUNA, M. B.; ABEL, I. S.; CLERICI, P. T. S. Lyfe cycle of *Ixodes (Ixodes) loricatus* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Journal of Medical Entomology**, v. 37, n. 5, p. 714-720, 2000.

SEKEYOVA, Z.; ROUX, V.; RAOULT, D. Phylogeny of *Rickettsia* spp inferred by comparing sequences of 'gene D', which encodes an intracytoplasmic protein. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1353-1360, 2001.

SEXTON, D. J.; MUNIZ, M.; COREY, G. R.; BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; DUMLER, S.; WALKER, D. H.; PECANHA, P. M.; DIETZE, R. Brazilian spotted fever in Espírito Santo, Brazil: description of a focus of infection in a new endemic region. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 2, p. 222-226, 1993.

SHAW, S. E.; KENNY, M. J.; TASKER, S.; BIRTLES, R. J. Pathogen carriage by the cat flea *Ctenocephalides felis* (Bouché) in the United Kingdom. **Veterinary Microbiology**, v. 102, p. 183-188, 2004.

SILVEIRA, I.; PACHECO, R. C.; SZABÓ, M. P.; CASTRO, M. B.; PETERKA, C. R. L.; VERONEZ, V. A.; GARCIA, M. V.; PRETTE, N.; PEREIRA, L. F.; ROCHA, H.; LABRUNA, M. B. Isolamento de *Rickettsia parkeri* em cultura de células Vero a partir do carrapato *Amblyomma triste*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 19., 2005, Porto Alegre. **Anais...** v. 34.

SPSS base 9.0 Chicago: SPSS Inc., 1999. 1 CD-Rom.

SORVILLO, F. J.; GONDO, B.; EMMONS, R.; RYAN, P.; WATERMAN, S. H. TILZER, A. A suburban focus of Endemic Typhus in Los Angeles County: association with seropositive domestic cats and opossums. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, p. 269-273, 1993.

STEVENSON, H. L.; LABRUNA, M. B.; MONTENIERI, J. A.; KOSOV, M. Y.; GAGE, K. L.; WALKER, D. H. Detection of *Rickettsia felis* in a new world flea species, *Anomiopsyllus nudata* (Siphonaptera: Ctenophthalmidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n. 2, p. 163-167, 2005.

STOTHARD, D. R.; FUERST, P. A. Evolutionary analysis of the Spotted Fever and Typhus Group *Rickettsiae* using 16S rRNA gene sequences. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 18, p.52-61, 1995.

TRAVASSOS, J.; VALLEJO, A. Comportamento de alguns cavídeos (*Cavia aperea* e *Hydrochoerus capybara*) às inoculações experimentais do vírus da Febre Maculosa. Possibilidade desses cavídeos representarem o papel de depositários transitórios do vírus na natureza. **Memórias do Instituto Butantã**, v. 15, p. 73-86, 1942.

VENZAL, J. M.; PÉREZ-MARTINEZ, L.; FÉLIX, M. L.; PORTILLO, A.; BLANCO, J. R.; OTEO, J. A. Prevalence of *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis* from Uruguay. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON RICKETTSIAE AND RICKETTSIAL DISEASES, 4, 2005, Logroño, Espanha. **Anais...** res. O-63.

VIANNA, M. C. B. **Pesquisa de Infecção por Riquetsia do Grupo da Febre Maculosa em Humanos, Cães, Equídeos e em Adultos de Carrapatos *Amblyomma cajennense* em uma Área Endêmica do Estado de Minas Gerais.** 2002. 67 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

WALKER, D. H.; LIU, Q. H.; YU, X. L.; LI, H.; TAYLOR, C.; FENG, H. M. Antigenic diversity of *Rickettsia conorii*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 47, p. 78-86, 1992.

WEBB, L.; CARL, M.; MALLOY, D. C.; DASCH, G. A.; AZAD, A. F. Detection of Murine Typhus infection in fleas by using the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 530-534, 1990.

WEDINCAMP, J.; FOIL, L. D. Vertical Transmission of *Rickettsia felis* in the cat flea (*Ctenocephalides felis* Bouché). **Journal of Vector Ecology**, v. 27, n. 1, p. 96-101, 2002.

ZAVALA-VELÁZQUEZ, J. E.; RUÍZ-SOSA, J. A.; SÁNCHEZ-ELIAS, R. A.; BECERRA-CARMONA, G.; WALKER, D. H. *Rickettsia felis* rickettsiosis in Yucatán. **Lancet**, v. 356, p. 1079-1080, 2000.

ZAVALA-VELÁZQUEZ, J. E.; ZAVALA-CASTRO, J. E.; VADO-SOLÍS, I.; RUIZ-SOSA, J. A.; MORON, C. G.; BOUYER, D. H.; WALKER, D. H. Identification of *Ctenocephalides felis* fleas as a host of *Rickettsia felis*, the agent of a spotted fever rickettsiosis in Yucatán, Mexico. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 2, n. 2, p. 69-75, 2002.

ZNAZEN, A.; ROLAIN, J. M.; HAMMAMI, N.; HAMMAMI, A.; JEMMA, M. B.; RAOULT, D. *Rickettsia felis* infection, Tunisia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n.1, p.138-140, 2006.

APÊNDICE A

Títulos de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii* em gambás do Estado de São Paulo, verificados através da reação de imunofluorescência indireta

Cidades/Titulação	(+)	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	(-)	Total
Pedreira	11	2	2	2	2	1	2	-	-	3	14
Piracicaba*	11	2	-	2	3	1	-	1	1	6	17
São Paulo	18	2	6	2	4	4	-	-	-	17	35
Pirassununga	6	1	3	2	-	-	-	-	-	6	12
Mogi das Cruzes	10	2	-	4	1	2	1	-	-	6	16
Total	56	9	11	12	10	8	3	1	1	38	94

* (1) 32.768

Títulos de anticorpos anti-*Rickettsia parkeri* em gambás do Estado de São Paulo, verificados através da reação de imunofluorescência indireta

Cidades/Titulação	(+)	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	(-)	Total
Pedreira	10	2	3	2	2	1	-	-	-	4	14
Piracicaba	12	1	5	2	2	-	-	2	-	5	17
São Paulo	19	3	7	4	4	1	-	-	-	16	35
Pirassununga	6	-	3	2	-	1	-	-	-	6	12
Mogi das Cruzes	8	1	-	3	4	-	-	-	-	8	16
Total	55	7	18	13	12	3	-	2	-	40	94

Títulos de anticorpos anti-*Rickettsia felis* em gambás do Estado de São Paulo, verificados através da reação de imunofluorescência indireta

Cidades/Titulação	(+)	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	(-)	Total
Pedreira	9	6	3	-	-	-	-	-	-	5	14
Piracicaba	11	5	2	2	1	-	1	-	-	6	17
São Paulo	6	-	4	2	-	-	-	-	-	29	35
Pirassununga	4	3	-	1	-	-	-	-	-	8	12
Mogi das Cruzes	3	1	-	1	1	-	-	-	-	13	16
Total	33	15	9	6	2	-	1	-	-	61	94

Títulos de anticorpos anti-*Rickettsia bellii* em gambás do Estado de São Paulo, verificados através da reação de imunofluorescência indireta

Cidades/Titulação	(+)	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	(-)	Total
Pedreira	2	1	1	-	-	-	-	-	-	12	14
Piracicaba	6	-	1	3	-	1	-	1	-	11	17
São Paulo	6	3	2	1	-	-	-	-	-	29	35
Pirassununga	1	-	-	1	-	-	-	-	-	11	12
Mogi das Cruzes	0	-	-	-	-	-	-	-	-	16	16
Total	15	4	4	5	-	1	-	1	-	79	94

APÊNDICE B

Títulos de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii* em cães do Estado de São Paulo, verificados através da reação de imunofluorescência indireta

Cidades/Titulação	(+)	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	(-)	Total
Pedreira*	11	1	1	2	2	0	2	1	0	8	19
Piracicaba	3	3	0	0	0	0	0	0	0	4	7
São Paulo	3	0	3	0	0	0	0	0	0	8	11
Pirassununga	1	1	0	0	0	0	0	0	0	4	5
Mogi das Cruzes	9	1	3	2	0	0	2	1	0	4	13
Total	27	6	7	4	2	0	4	2	0	28	55

* (2) 16.384

Títulos de anticorpos anti-*Rickettsia parkeri* em cães do Estado de São Paulo, verificados através da reação de imunofluorescência indireta

Cidades/Titulação	(+)	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	(-)	Total
Pedreira	12	2	0	5	1	2	0	0	1	7	19
Piracicaba	3	1	0	2	0	0	0	0	0	4	7
São Paulo	3	1	2	0	0	0	0	0	0	8	11
Pirassununga	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5
Mogi das Cruzes	9	4	1	1	1	0	2	0	0	4	13
Total	27	8	3	8	2	2	2	0	1	28	55

* (1) 32768

Títulos de anticorpos anti-*Rickettsia felis* em cães do Estado de São Paulo, verificados através da reação de imunofluorescência indireta

Cidades/Titulação	(+)	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	(-)	Total
Pedreira	13	3	4	2	1	2	0	1	0	6	19
Piracicaba	2	1	1	0	0	0	0	0	0	5	7
São Paulo	3	3	0	0	0	0	0	0	0	8	11
Pirassununga	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5
Mogi das Cruzes	8	6	0	0	1	1	0	0	0	5	13
Total	26	13	5	2	2	3	0	1	0	29	55

Títulos de anticorpos anti-*Rickettsia bellii* em cães do Estado de São Paulo, verificados através da reação de imunofluorescência indireta

Cidades/Titulação	(+)	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	(-)	Total
Pedreira	7	3	2	1	0	1	0	0	0	12	19
Piracicaba	1	0	1	0	0	0	0	0	0	6	7
São Paulo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	11
Pirassununga	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5
Mogi das Cruzes	5	1	2	0	1	1	0	0	0	8	13
Total	13	4	5	1	1	2	0	0	0	42	55

APÊNDICE C

Títulos de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii* em gatos do Estado de São Paulo, verificados através da reação de imunofluorescência indireta

Cidades/Titulação	(+)	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	(-)	Total
Pedreira	3	-	-	-	2	-	1	-	-	0	3
Piracicaba	7	2	3	-	2	-	-	-	-	0	7
São Paulo	3	1	1	1	-	-	-	-	-	3	6
Pirassununga	3	-	-	2	-	1	-	-	-	3	6
Mogi das Cruzes	3	-	1	-	1	-	1	-	-	0	3
Total	19	3	5	3	5	1	2	-	-	6	25

Títulos de anticorpos anti-*Rickettsia parkeri* em gatos do Estado de São Paulo, verificados através da reação de imunofluorescência indireta

Cidades/Titulação	(+)	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	(-)	Total
Pedreira	3	-	-	1	1	-	1	-	-	0	3
Piracicaba	6	1	2	1	2	-	-	-	-	1	7
São Paulo	3	1	2	-	-	-	-	-	-	3	6
Pirassununga	4	-	1	2	-	-	1	-	-	2	6
Mogi das Cruzes	3	-	1	1	-	-	1	-	-	0	3
Total	19	2	6	5	3	-	3	-	-	6	25

Títulos de anticorpos anti-*Rickettsia felis* em gatos do Estado de São Paulo, verificados através da reação de imunofluorescência indireta

Cidades/Titulação	(+)	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	(-)	Total
Pedreira	3	2	1	-	-	-	-	-	-	0	3
Piracicaba	6	3	2	1	-	-	-	-	-	1	7
São Paulo	2	2	-	-	-	-	-	-	-	4	6
Pirassununga	2	-	1	1	-	-	-	-	-	4	6
Mogi das Cruzes	3	2	1	-	-	-	-	-	-	0	3
Total	16	9	5	2	-	-	-	-	-	9	25

Títulos de anticorpos anti-*Rickettsia bellii* em gatos do Estado de São Paulo, verificados através da reação de imunofluorescência indireta

Cidades/Titulação	(+)	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	(-)	Total
Pedreira	2	-	-	1	1	-	-	-	-	1	3
Piracicaba	4	-	2	2	-	-	-	-	-	3	7
São Paulo	0	-	-	-	-	-	-	-	-	6	6
Pirassununga	3	-	2	-	-	1	-	-	-	3	6
Mogi das Cruzes	2	1	-	1	-	-	-	-	-	1	3
Total	11	1	4	4	1	1	-	-	-	14	25

APÊNDICE D

Títulos de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii* em eqüinos do Estado de São Paulo, verificados através da reação de imunofluorescência indireta

Cidades/Titulação	(+)	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	(-)	Total
Pedreira	18	0	1	0	2	8	3	3	1	2	20
Piracicaba	17	2	2	1	3	5	0	2	2	4	21
São Paulo	7	4	0	0	1	2	0	0	0	13	20
Pirassununga	4	0	0	2	1	1	0	0	0	15	19
Mogi das Cruzes	2	1	1	0	0	0	0	0	0	3	5
Total	48	7	4	3	7	16	3	5	3	37	85

Títulos de anticorpos anti-*Rickettsia parkeri* em eqüinos do Estado de São Paulo, verificados através da reação de imunofluorescência indireta

Cidades/Titulação	(+)	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	(-)	Total
Pedreira	18	1	1	0	5	3	4	3	1	2	20
Piracicaba	17	0	5	3	0	1	3	5	0	4	21
São Paulo	7	2	1	1	1	2	0	0	0	13	20
Pirassununga	4	0	1	2	1	0	0	0	0	15	19
Mogi das Cruzes	2	0	2	0	0	0	0	0	0	3	5
Total	48	3	10	6	7	6	7	8	1	37	85

Títulos de anticorpos anti-*Rickettsia felis* em eqüinos do Estado de São Paulo, verificados através da reação de imunofluorescência indireta

Cidades/Titulação	(+)	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	(-)	Total
Pedreira	19	1	2	8	4	3	1	0	0	1	20
Piracicaba	17	3	4	0	3	2	4	0	1	4	21
São Paulo	7	2	3	1	1	0	0	0	0	13	20
Pirassununga	4	0	1	2	1	0	0	0	0	15	19
Mogi das Cruzes	2	0	1	1	0	0	0	0	0	3	5
Total	49	6	11	12	9	5	5	0	1	36	85

Títulos de anticorpos anti-*Rickettsia bellii* em eqüinos do Estado de São Paulo, verificados através da reação de imunofluorescência indireta

Cidades/Titulação	(+)	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	(-)	Total
Pedreira	19	2	6	8	3	0	0	0	0	1	20
Piracicaba	19	6	3	3	4	2	0	0	1	2	21
São Paulo	11	6	2	3	0	0	0	0	0	9	20
Pirassununga	10	7	2	0	1	0	0	0	0	9	19
Mogi das Cruzes	3	3	0	0	0	0	0	0	0	2	5
Total	62	24	13	14	8	2	0	0	1	23	85

APÊNDICE E

Títulos de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii* em humanos do Estado de São Paulo, verificados através da reação de imunofluorescência indireta

Cidades/Titulação	(+)	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	(-)	Total
Pedreira	8	0	4	1	2	1	0	0	0	43	51
Piracicaba	7	1	4	1	1	0	0	0	0	62	69
São Paulo	10	3	4	3	0	0	0	0	0	58	68
Pirassununga	5	1	2	1	1	0	0	0	0	23	28
Mogi das Cruzes	4	2	0	1	1	0	0	0	0	17	21
Total	34	7	14	7	5	1	0	0	0	204	238

Títulos de anticorpos anti-*Rickettsia parkeri* em humanos do Estado de São Paulo, verificados através da reação de imunofluorescência indireta

Cidades/Titulação	(+)	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	(-)	Total
Pedreira	8	2	3	2	1	0	0	0	0	43	51
Piracicaba	5	1	4	0	0	0	0	0	0	64	69
São Paulo	10	1	7	1	1	0	0	0	0	58	68
Pirassununga	5	1	1	2	0	1	0	0	0	23	28
Mogi das Cruzes	4	1	0	2	1	0	0	0	0	17	21
Total	32	6	15	7	3	1	0	0	0	206	238

Títulos de anticorpos anti-*Rickettsia felis* em humanos do Estado de São Paulo, verificados através da reação de imunofluorescência indireta

Cidades/Titulação	(+)	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	(-)	Total
Pedreira	8	5	0	2	1	0	0	0	0	43	51
Piracicaba	5	3	0	2	0	0	0	0	0	64	69
São Paulo	6	0	0	4	2	0	0	0	0	62	68
Pirassununga	5	5	0	0	0	0	0	0	0	23	28
Mogi das Cruzes	4	1	2	0	1	0	0	0	0	17	21
Total	28	14	2	8	4	0	0	0	0	210	238

Títulos de anticorpos anti-*Rickettsia bellii* em humanos do Estado de São Paulo, verificados através da reação de imunofluorescência indireta

Cidades/Titulação	(+)	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	(-)	Total
Pedreira	5	2	1	1	1	0	0	0	0	46	51
Piracicaba	6	3	3	0	0	0	0	0	0	63	69
São Paulo	5	1	3	0	1	0	0	0	0	63	68
Pirassununga	3	0	1	1	1	0	0	0	0	25	28
Mogi das Cruzes	4	1	2	1	0	0	0	0	0	17	21
Total	23	7	10	3	3	0	0	0	0	215	238

APÊNDICE F

Amostras de gambás testadas frente à *Rickettsia* spp, oriundos do Estado de São Paulo, 2006

(continua)

Cidade	Gambá	RIFI ¹				PCR ²	Pulgas			Carrapatos		
		<i>R. rickettsii</i>	<i>R. parkeri</i>	<i>R. felis</i>	<i>R. bellii</i>		n ³	p ⁴	<i>Rickettsia</i>	n ³	p ⁴	<i>Rickettsia</i>
Pedreira	G49	2048	256	128	-	-	11	0	-	28	0	-
	G50	1024	1024	-	-	-	11	0	-	8	1	<i>R. bellii</i>
	G68	64	256	64	-	-	1	0	-	0	0	-
	G89	-	-	64	-	-	4	0	-	0	0	-
	G90	-	-	-	-	-	7	4	<i>R. felis</i>	0	0	-
	G91	256	-	128	64	-	1	1	<i>R. felis</i>	0	0	-
	G92	64	128	64	-	-	2	0	-	0	0	-
	G93	2048	512	64	-	-	3	2	<i>R. felis</i>	0	0	-
	G94	256	128	64	128	-	5	5	<i>R. felis</i>	0	0	-
	G95	128	64	64	-	-	0	0	-	1	0	-
	G96	512	64	128	-	-	1	1	<i>R. felis</i>	0	0	-
	G97	512	512	-	-	-	10	6	<i>R. felis</i>	0	0	-
	G99	128	128	-	-	-	1	0	-	0	0	-
Piracicaba	G3	64	64	-	-	-	0	0	-	41	0	-
	G5	512	256	64	-	-	0	0	-	79	0	-
	G29	512	128	64	-	-	0	0	-	1	0	-
	G30	32768	4096	2048	4096	-	4	0	-	7	0	-
	G31	64	128	64	-	-	0	0	-	22	1	<i>R. bellii</i>
	G32	-	-	-	-	-	0	0	-	1	0	-
	G33	4096	512	512	1024	-	5	0	-	122	2	<i>R. bellii</i>
	G53	256	128	-	-	-	6	3	<i>R. felis</i>	8	1	<i>Rickettsia</i> sp
	G54	-	-	-	-	-	4	4	<i>R. felis</i>	0	0	-
	G55	512	128	128	128	-	0	0	-	9	0	-
	G65	-	-	-	-	-	0	0	-	5	0	-
	G66	-	-	-	-	-	1	0	-	0	0	-
	G67	1024	512	128	256	-	0	0	-	0	0	-
	G76	8192	4096	256	256	-	3	1	<i>R. felis</i>	148	2	<i>R. bellii</i>
											1	<i>R. amblyommii</i>

APÊNDICE F

Amostras de gambás testadas frente à *Rickettsia* spp, oriundos do Estado de São Paulo, 2006

(continuação)

Cidade	Gambá	RIFI ¹				PCR ²	Pulgas			Carrapatos		
		<i>R. rickettsii</i>	<i>R. parkeri</i>	<i>R. felis</i>	<i>R. bellii</i>		n ³	p ⁴	<i>Rickettsia</i>	n ³	p ⁴	<i>Rickettsia</i>
Piracicaba	G77	-	-	64	-	-	1	0	-	3	0	-
	G78	256	256	256	256	-	0	0	-	29	1	<i>Rickettsia</i> sp
	G79	-	128	64	-	-	0	0	-	4	0	-
São Paulo	G1	1024	512	-	-	-	0	0	-	0	0	-
	G2	1024	1024	-	-	-	0	0	-	0	0	-
	G4	256	512	-	256	-	0	0	-	0	0	-
	G7	-	128	128	64	-	0	0	-	0	0	-
	G8	512	256	128	-	-	0	0	-	0	0	-
	G9	128	64	-	-	-	0	0	-	0	0	-
	G10	-	-	-	-	-	5	2	<i>R. felis</i>	0	0	-
	G11	1024	512	256	-	-	0	0	-	0	0	-
	G13	-	-	-	-	-	0	0	-	1	1	<i>R. bellii</i>
	G14	-	-	-	-	-	0	0	-	1	1	<i>R. bellii</i>
	G16	128	128	-	-	-	0	0	-	0	0	-
	G17	-	-	-	-	-	1	1	<i>R. felis</i>	0	0	-
	G18	-	-	-	-	-	1	0	-	1	1	<i>R. bellii</i>
	G19	128	128	-	-	-	1	0	-	3	3	<i>R. bellii</i>
	G20	64	128	-	-	-	0	0	-	0	0	-
	G21	128	64	-	-	-	0	0	-	0	0	-
	G26	-	-	-	64	-	4	2	<i>R. felis</i>	0	0	-
	G27	256	128	-	-	-	1	1	<i>R. felis</i>	0	0	-
	G28	-	-	-	-	-	7	6	<i>R. felis</i>	0	0	-
	G34	64	128	-	-	-	0	0	-	0	0	-
	G36	1024	256	256	-	-	2	0	-	0	0	-
	G37	128	64	-	-	-	4	0	-	0	0	-
	G38	-	-	-	-	-	21	8	<i>R. felis</i>	0	0	-

APÊNDICE F

Amostras de gambás testadas frente à *Rickettsia* spp, oriundos do Estado de São Paulo, 2006 (continuação)

Cidade	Gambá	RIFI ¹				PCR ²	Pulgas			Carrapatos		
		<i>R. rickettsii</i>	<i>R. parkeri</i>	<i>R. felis</i>	<i>R. bellii</i>		n ³	p ⁴	<i>Rickettsia</i>	n ³	p ⁴	<i>Rickettsia</i>
São Paulo	G40	512	512	-	128	-	0	0	-	0	0	-
	G41	-	-	-	128	-	0	0	-	0	0	-
	G45	512	256	-	-	-	7	4	<i>R. felis</i>	0	0	-
	G47	-	-	-	-	-	1	0	-	0	0	-
	G51	512	256	128	64	-	0	0	-	0	0	-
	G52	128	128	128	-	-	4	2	<i>R. felis</i>	0	0	-
Pirassununga	G88	-	-	-	-	-	1	1	<i>R. felis</i>	0	0	-
	G42	128	256	-	-	-	3	0	-	4	1	<i>R. bellii</i>
	G43	256	256	-	-	-	4	0	-	0	0	-
	G44	128	128	-	256	-	14	0	-	3	0	-
	G46	256	1024	256	-	-	2	0	-	3	1	<i>R. bellii</i>
	G80	-	-	64	-	-	2	1	<i>R. felis</i>	5	1	<i>R. bellii</i>
	G81	-	-	-	-	-	5	0	-	2	1	<i>R. bellii</i>
	G82	-	-	-	-	-	9	2	<i>R. felis</i>	2	1	<i>R. bellii</i>
	G83	-	-	-	-	-	7	0	-	1	1	<i>R. felis</i>
	G84	64	128	-	-	-	11	0	-	52	13	<i>R. bellii</i>
											2	<i>R. felis</i>
	G85	-	-	-	-	-	4	0	-	3	1	<i>R. bellii</i>
											2	<i>R. felis</i>
	G86	128	128	64	-	-	2	0	-	2	2	<i>R. bellii</i>
	G87	-	-	64	-	-	0	0	-	1	0	-
Mogi das Cruzes	G56	2048	256	512	-	-	7	0	-	8	3	<i>R. bellii</i>
	G57	512	512	-	-	-	7	0	-	10	5	<i>R. bellii</i>
	G58	-	-	-	-	-	9	0	-	4	3	<i>R. bellii</i>
	G59	-	-	-	-	-	16	6	<i>R. felis</i>	9	8	<i>R. bellii</i>
	G60	-	-	-	-	-	9	0	-	28	8	<i>R. bellii</i>
	G61	1024	512	-	-	-	3	0	-	1	0	-
	G62	1024	512	64	-	-	21	6	<i>R. felis</i>	2	1	<i>R. bellii</i>

APÊNDICE F

Amostras de gambás testadas frente à *Rickettsia* spp, oriundos do Estado de São Paulo, 2006 (conclusão)

Cidade	Gambá	RIFI ¹				PCR ²	Pulgas		<i>Rickettsia</i>	Carrapatos		<i>Rickettsia</i>
		<i>R. rickettsii</i>	<i>R. parkeri</i>	<i>R. felis</i>	<i>R. bellii</i>		n ³	p ⁴		n ³	p ⁴	
Mogi das Cruzes	G63	64	-	-	-	-	9	0	-	10	1	<i>R. bellii</i>
	G64	256	512	-	-	-	3	0	-	3	1	<i>R. bellii</i>
	G69	-	-	-	-	-	2	0	-	2	1	<i>R. bellii</i>
	G70	256	64	-	-	-	1	0	-	2	0	-
	G71	64	256	-	-	-	4	0	-	4	2	<i>R. bellii</i>
	G72	256	-	256	-	-	1	1	<i>R. felis</i>	5	2	<i>R. bellii</i>
	G73	-	-	-	-	-	12	1	<i>R. bellii</i>	5	2	<i>R. bellii</i>
	G74	-	-	-	-	-	3	0	-	12	1	<i>R. bellii</i>
											1	<i>R. felis</i>
	G75	256	256	-	-	-	0	0	-	5	1	<i>R. bellii</i>
Total	88	56	55	33	15	0	312	71	71	709	81	81

¹ títulos de anticorpos anti-*Rickettsia* spp verificados nos soros dos animais testados pela RIFI; ² resultado da PCR nas amostras de sangue; ³ número de ectoparasitos analisados; ⁴ indivíduos positivos para *Rickettsia* spp pela PCR.

Observação: Não constam na tabela, dados de gambás não reagentes pela RIFI e que não apresentavam ectoparasitos: 1 indivíduo de Pedreira e 5 de São Paulo

APÊNDICE G

Amostras de cães testadas frente à *Rickettsia* spp, oriundos do Estado de São Paulo, 2006

(continua)

Cidade	Cão	RIFI ¹				PCR ²	Pulgas			Carrapatos		
		<i>R. rickettsii</i>	<i>R. parkeri</i>	<i>R. felis</i>	<i>R. bellii</i>		n ³	p ⁴	<i>Rickettsia</i>	n ³	p ⁴	<i>Rickettsia</i>
Pedreira	C1	-	-	-	-	-	1	0	-	26	0	-
	C3	256	256	128	256	-	5	3	<i>R. felis</i>	4	0	-
	C4	-	-	64	-	-	2	0	-	11	0	-
	C5	-	64	64	-	-	3	1	<i>R. felis</i>	0	0	-
	C6	256	256	128	64	-	0	0	-	9	0	-
	C7	-	-	-	-	-	0	0	-	8	0	-
	C8	-	-	-	-	-	0	0	-	1	0	-
	C9	-	-	-	-	-	2	1	<i>R. felis</i>	9	0	-
	C20	64	64	128	-	-	3	2	<i>R. felis</i>	6	0	-
	C21	512	256	256	-	-	1	0	-	2	0	-
	C22	128	256	64	-	-	9	4	<i>R. felis</i>	1	0	-
	C23	-	-	-	-	-	7	7	<i>R. felis</i>	2	0	-
	C24	-	-	-	-	-	2	0	-	4	0	-
	C25	16384	8192	1024	-	-	2	1	<i>R. felis</i>	3	0	-
	C26	16384	32768	4096	1024	-	14	6	<i>R. felis</i>	6	0	-
	C27	4096	1024	1024	128	-	2	0	-	1	0	-
	C28	512	256	128	64	-	9	6	<i>R. felis</i>	0	0	-
	C29	2048	512	256	64	-	7	4	<i>R. felis</i>	0	0	-
	C30	2048	1024	512	128	-	5	4	<i>R. felis</i>	1	0	-
Piracicaba	C15	-	-	-	-	-	1	1	<i>R. felis</i>	0	0	-
	C16	-	-	128	-	-	1	1	<i>R. felis</i>	4	0	-
	C51	64	256	-	-	-	0	0	-	1	0	-
	C52	-	-	64	-	-	0	0	-	0	0	-
	C54	64	64	-	-	-	19	5	<i>R. felis</i>	0	0	-
	C55	64	256	-	128	-	25	14	<i>R. felis</i>	0	0	-
	C40	128	128	64	-	-	5	3	<i>R. felis</i>	0	0	-
	C41	-	-	-	-	-	3	3	<i>R. felis</i>	1	0	-

APÊNDICE G

Amostras de cães testadas frente à <i>Rickettsia</i> spp, oriundos do Estado de São Paulo, 2006												(conclusão)
Cidade	Cão	RIFI ¹				PCR ²	Pulgas			Carrapatos		
		<i>R. rickettsii</i>	<i>R. parkeri</i>	<i>R. felis</i>	<i>R. bellii</i>		n ³	p ⁴	<i>Rickettsia</i>	n ³	p ⁴	<i>Rickettsia</i>
São Paulo	C42	-	-	-	-	-	1	0	-	0	0	-
	C44	-	-	-	-	-	3	1	<i>R. felis</i>	0	0	-
	C45	-	-	-	-	-	7	2	<i>R. felis</i>	0	0	-
	C46	128	128	64	-	-	0	0	-	0	0	-
	C48	128	64	-	-	-	4	3	<i>R. felis</i>	0	0	-
	C49	-	-	64	-	-	2	2	<i>R. felis</i>	0	0	-
Pirassununga	C17	-	-	-	-	-	36	5	<i>R. felis</i>	0	0	-
	C19	-	-	-	-	-	1	0	-	0	0	-
	C32	64	-	-	-	-	0	0	-	0	0	-
Mogi das Cruzes	C2	-	-	-	-	-	10	5	<i>R. felis</i>	0	0	-
	C10	-	-	-	64	-	2	0	-	0	0	-
	C11	-	-	-	-	-	0	0	-	2	0	-
	C12	128	64	64	128	-	0	0	-	0	0	-
	C13	128	128	64	-	-	0	0	-	0	0	-
	C14	4096	2048	1024	1024	-	2	0	-	12	0	-
	C33	256	64	64	-	-	1	0	-	0	0	-
	C34	128	64	64	-	-	3	3	<i>R. felis</i>	1	0	-
	C35	256	256	64	-	-	0	0	-	0	0	-
	C36	2048	512	-	-	-	0	0	-	0	0	-
	C37	2048	2048	512	512	-	0	0	-	0	0	-
	C38	-	-	-	-	-	1	0	-	0	0	-
	C39	64	64	64	128	-	6	2	<i>R. felis</i>	0	0	-
Total	49	27	27	26	13	0	121	89	-	115	0	-

¹ títulos de anticorpos anti-*Rickettsia* spp verificados nos soros dos animais testados pela RIFI; ² resultado da PCR nas amostras de sangue; ³ número de ectoparasitos analisados; ⁴ indivíduos positivos para *Rickettsia* spp pela PCR.

Observação: Não constam na tabela, dados de cães não reagentes pela RIFI e que não apresentavam ectoparasitos: 1 indivíduo de Piracicaba, 3 de São Paulo e 2 de Pirassununga

APÊNDICE H

Amostras de gatos testadas frente à *Rickettsia* spp, oriundos do Estado de São Paulo, 2006

Cidade	Gato	RIFI ¹				PCR ²	Pulgas			Carrapatos		
		<i>R. rickettsii</i>	<i>R. parkeri</i>	<i>R. felis</i>	<i>R. bellii</i>		n ³	p ⁴	<i>Rickettsia</i>	n ³	p ⁴	<i>Rickettsia</i>
Pedreira	Ga1	2048	2048	128	512	-	4	3	<i>R. felis</i>	1	0	-
	Ga2	512	512	64	256	-	0	0	-	0	0	-
	Ga20	512	256	64	-	-	3	2	<i>R. felis</i>	3	0	-
Piracicaba	Ga6	64	128	64	128	-	1	0	-	2	0	-
	Ga7	64	64	-	-	-	1	1	<i>R. felis</i>	0	0	-
	Ga8	128	-	256	-	-	1	1	<i>R. felis</i>	0	0	-
	Ga9	512	512	64	256	-	2	1	<i>R. felis</i>	0	0	-
	Ga10	128	256	64	-	-	0	0	-	0	0	-
	Ga11	512	512	128	256	-	2	0	-	1	0	-
	Ga12	128	128	128	128	-	0	0	-	2	0	-
São Paulo	Ga14	-	-	64	-	-	8	4	<i>R. felis</i>	0	0	-
	Ga21	64	64	-	-	-	2	0	-	0	0	-
	Ga22	256	128	-	-	-	6	1	<i>R. felis</i>	0	0	-
	Ga23	-	-	-	-	-	1	0	-	0	0	-
	Ga24	128	128	64	-	-	0	0	-	0	0	-
	Ga25	-	-	-	-	-	0	0	-	0	0	-
	Ga13	-	128	256	-	-	1	0	<i>R. felis</i>	0	0	-
Pirassununga	Ga15	256	256	-	128	-	16	5	<i>R. felis</i>	0	0	-
	Ga16	-	-	-	-	-	3	0	-	0	0	-
	Ga17	1024	2048	128	1024	-	0	0	-	0	0	-
	Ga18	-	-	-	-	-	9	4	<i>R. felis</i>	0	0	-
	Ga19	256	256	-	128	-	0	0	-	0	0	-
Mogi das Cruzes	Ga3	128	128	64	-	-	5	3	<i>R. felis</i>	0	0	-
	Ga4	512	256	128	64	-	0	0	-	1	0	-
	Ga5	2048	2048	64	256	-	1	0	-	0	0	-
Total	25	19	19	16	11	0	66	25	25	10	0	-

¹ títulos de anticorpos anti-*Rickettsia* spp verificados nos soros dos animais testados pela RIFI; ² resultado da PCR nas amostras de sangue; ³ número de ectoparasitos analisados; ⁴ indivíduos positivos para *Rickettsia* spp pela PCR

APÊNDICE I

Amostras de eqüinos testadas frente à *Rickettsia* spp, oriundos do Estado de São Paulo, 2006 (continua)

Cidade	Eqüino	RIFI ¹				PCR ²
		<i>R. rickettsii</i>	<i>R. parkeri</i>	<i>R. felis</i>	<i>R. bellii</i>	
Pedreira	E44	1024	1024	512	128	-
	E46	512	512	256	128	-
	E47	-	-	128	64	-
	E48	512	128	256	256	-
	E49	128	64	64	64	-
	E50	2048	2048	256	256	-
	E51	4096	4096	1024	256	-
	E52	8192	8192	512	512	-
	E53	4096	2048	2048	256	-
	E54	1024	2048	256	256	-
	E55	1024	512	256	128	-
	E56	1024	512	256	128	-
	E57	2048	2048	512	256	-
	E58	4096	4096	1024	512	-
	E59	1024	1024	256	512	-
	E60	1024	1024	512	128	-
	E61	1024	512	128	128	-
	E62	1024	512	256	256	-
	E63	2048	4096	1024	256	-
Piracicaba	E1	4096	4096	1024	512	-
	E2	128	256	64	64	-
	E3	8192	4096	2048	1024	-
	E4	1024	2048	2048	512	-
	E5	512	1024	512	64	-
	E6	1024	2048	2048	512	-

APÊNDICE I

Amostras de eqüinos testadas frente à *Rickettsia* spp, oriundos do Estado de São Paulo, 2006 (continuação)

Cidade	Eqüino	RIFI ¹				PCR ²
		<i>R. rickettsii</i>	<i>R. parkeri</i>	<i>R. felis</i>	<i>R. bellii</i>	
Piracicaba	E7	1024	256	64	256	-
	E8	64	128	128	128	-
	E9	-	-	64	64	-
	E10	128	128	128	256	-
	E11	256	128	128	128	-
	E12	512	256	-	64	-
	E13	8192	4096	8192	8192	-
	E14	-	-	-	64	-
	E15	64	128	128	128	-
	E16	512	128	1024	64	-
	E18	1024	2048	512	256	-
	E19	4096	4096	2048	1024	-
	E20	1024	4096	512	512	-
São Paulo	E68	64	64	128	64	-
	E70	-	-	-	64	-
	E71	-	-	64	64	-
	E72	64	64	128	128	-
	E73	1024	1024	128	64	-
	E74	64	256	256	256	-
	E75	1024	1024	128	128	-
	E78	512	512	512	256	-
	E80	64	128	-	256	-
	E84	-	-	-	64	-
	E85	-	-	64	64	-

APÊNDICE I

Amostras de eqüinos testadas frente à *Rickettsia* spp, oriundos do Estado de São Paulo, 2006 (conclusão)

Cidade	Eqüino	RIFI ¹				PCR ²
		<i>R. rickettsii</i>	<i>R. parkeri</i>	<i>R. felis</i>	<i>R. bellii</i>	
Pirassununga	E26	-	-	-	64	-
	E28	256	128	256	64	-
	E30	256	256	256	128	-
	E32	-	-	-	64	-
	E35	-	-	-	64	-
	E36	-	-	-	64	-
	E37	-	-	-	64	-
	E38	-	-	-	64	-
	E41	1024	512	128	128	-
	E43	512	256	512	512	-
Mogi das Cruzes	E22	-	-	-	64	-
	E24	128	128	128	64	-
	E64	64	128	256	64	-
Total	85	48	48	47	62	0

¹ títulos de anticorpos anti-*Rickettsia* spp verificados nos soros dos animais testados pela RIFI; ² resultado da PCR nas amostras de sangue.

Observação: Não constam na tabela, dados de eqüinos não reagentes pela RIFI: 1 indivíduo de Pedreira, 2 de Piracicaba, 9 de São Paulo, 9 de Pirassununga e 2 de Mogi das Cruzes

APÊNDICE J

Amostras de humanos testadas frente à *Rickettsia* spp, oriundos do Estado de São Paulo, 2006 (continua)

Cidade	Humano	RIFI ¹				PCR ²
		<i>R. rickettsii</i>	<i>R. parkeri</i>	<i>R. felis</i>	<i>R. bellii</i>	
Pedreira	H1	128	128	256	128	-
	H17	512	256	64	-	-
	H56	128	128	64	64	-
	H61	512	256	256	256	-
	H68	1024	512	512	512	-
	H74	128	64	64	-	-
	H75	256	64	64	-	-
	H80	128	-	64	64	-
Piracicaba	H28	128	64	64	64	-
	H29	512	128	64	128	-
	H31	256	128	64	128	-
	H47	128	-	-	64	-
	H102	64	-	-	-	-
	H106	128	128	256	128	-
São Paulo	H109	128	128	256	64	-
	H178	128	128	-	-	-
	H187	128	128	128	-	-
	H191	128	128	256	-	-
	H192	64	256	256	128	-
	H195	128	512	512	64	-
	H206	256	256	512	128	-
	H208	128	64	-	128	-
	H211	64	64	-	-	-
	H219	128	256	256	512	-
	H231	128	128	-	-	-

APÊNDICE J

Amostras de humanos testadas frente à *Rickettsia* spp, oriundos do Estado de São Paulo, 2006 (conclusão)

Cidade	Humano	RIFI ¹				PCR ²
		<i>R. rickettsii</i>	<i>R. parkeri</i>	<i>R. felis</i>	<i>R. bellii</i>	
Pirassununga	H141	512	1024	64	-	-
	H147	-	-	64	64	-
	H161	128	256	64	512	-
	H163	64	128	-	-	-
	H164	128	128	64	-	-
	H166	256	256	64	256	-
Mogi das Cruzes	H88	512	512	512	128	-
	H89	256	256	128	256	-
	H94	64	64	64	64	-
	H96	64	256	128	128	-
Total	238	34	32	28	23	0

¹ títulos de anticorpos anti-*Rickettsia* spp verificados nos soros dos humanos testados pela RIFI; ² resultado da PCR nas amostras de sangue.

Observação: Não constam na tabela, dados de humanos não reagentes pela RIFI: 44 indivíduos de Pedreira, 62 de Piracicaba, 59 de São Paulo, 22 de Pirassununga e 17 de Mogi das Cruzes