RICHARD DE CAMPOS PACHECO

Pesquisa de *Rickettsia* spp. em carrapatos *Amblyomma dubitatum*
Neumann 1899 e *Amblyomma triste* Koch 1844, provenientes do
Brasil e Uruguai, respectivamente

São Paulo
2007

RICHARD DE CAMPOS PACHECO

Pesquisa de *Rickettsia* spp. em carrapatos *Amblyomma dubitatum*
Neumann 1899 e *Amblyomma triste* Koch 1844, provenientes do
Brasil e Uruguai, respectivamente

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 de título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

São Paulo

2007

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1847
FMVZ

Pacheco, Richard de Campos

Pesquisa de *Rickettsia* spp. em carrapatos *Amblyomma dubitatum* Neumann 1899 e *Amblyomma triste* Koch 1844, provenientes do Brasil e Uruguai, respectivamente / Richard de Campos Pacheco. – São Paulo : R. C. Pacheco, 2007.

51 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2007.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna.

1. Carrapatos. 2. *Amblyomma dubitatum*. 3. *Amblyomma triste*. 4. *Rickettsia bellii*. 5. *Rickettsia parkeri*. 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 "Isolamento em cultivo de células e análises filogenética e taxonômica de uma riquetsia detectada em carrapatos *Amblyomma cooperi*, provenientes de áreas endêmicas para febre maculosa Brasileira no Estado de São Paulo", protocolo nº594/2004, utilizando colheita de parasitas em animais infectados, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, 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 "Isolation in cell culture and phylogenetic and taxo analysis of a Rickettsia detected in ticks *Amblyomma cooperi* from endemic area of Brazilian spotted fever in the State of São Paulo", protocol number 594/2004, under the responsibility of Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 20 de dezembro de 2004

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Pacheco, Richard de Campos

Título: Pesquisa de *Rickettsia* spp. em carrapatos *Amblyomma dubitatum* Neumann 1899 e *Amblyomma triste* Koch 1844, provenientes do Brasil e Uruguai, respectivamente

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: _____

Agradecimentos

Agradeço, de uma maneira geral, a todos os que tenham contribuído para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho, que por descuido ou esquecimento não foram aqui mencionados.

Aos meus pais Willian e Rosária, meus irmãos Ricardo, Willdner, Cristiane e Adriana, minha tia Vastí que apesar da distância jamais foram esquecidos e sempre foram incentivadores na formação da minha vida profissional desde início.

A minha esposa Daniela pelo apoio, incentivo, companheirismo, paciência e a minha filha Catarina, sem dúvida, o maior presente e fonte de inspiração na realização de qualquer trabalho.

A minha sogra Evanilda e meu sogro Toninho pelo ajuda e apoio desde minha chegada a São Paulo e, sem duvida, imprescindível para realização desse trabalho.

Ao professor Marcelo Labruna pela amizade, ensinamentos, apoio, paciência e orientação despendidos na realização deste trabalho.

Aos meus grandes amigos do Laboratório “Carrapatos” pelo agradável período que passamos juntos e também por compartilharem comigo de minhas aflições e alegrias: Adriano Pinter, Mauricio Horta, Alexandre Ataliba, Ricardo Cabrera, Jonas M. Filho, Silvio Chagas, Maria Ogrzewalska, Thiago Martins, Marcelo Nardi, Simone Rosa, Iara Silveira e Daniel Aguiar.

Aos meus amigos da pós-graduação do VPS: Luís Ivan, Renata Monteiro, Alexandre Thomaz, Adriana Cortez, Mikaela, Patrícia Ferreira, Cássio Peterka e os amigos e funcionários do Laboratório de Doenças Parasitárias: Hilda F. J. Penna, Luciana Nunes, Renato Caravieri e Pedro César Ferreira pelo convívio, conhecimentos e experiência a mim concedido.

Ao Venzal pela coleta e envio dos carrapatos do Uruguai.

Aos proprietários da Fazenda Monte Nilo e Quitandinha por disponibilizarem a coleta de carrapatos nessas duas propriedades.

Ao professor Leonardo J. Richtzenhain pela colaboração na realização desse trabalho (permitindo a utilização do Laboratório de Biologia Molecular e seus equipamentos).

Aos professores Marcos Amaku e Rodrigo Martins Soares pelo valioso auxílio durante o desenvolvimento da tese.

Ao professor Silvio Arruda Vasconcellos, Solange Maria Gennari e Fernando Ferreira pelo apoio e incentivo nesta jornada.

Ao Walter pela ajuda de materiais no laboratório nas horas mais críticas do experimento.

A técnica de Laboratório Sheila Oliveira e Renata pelo apoio e auxílio no sequenciamento das amostras.

Aos funcionários e amigos Alexandre Sanches, Sandra Abelardo Sanches, Orlando Bispo pelo apoio, amizade e força.

Aos funcionários da secretaria do VPS: Virgínia, Cristiane e Danival pelo incentivo, apoio e dedicação.

Aos funcionários da Biblioteca e da secretaria de Pós Graduação da FMVZ/USP pela gentileza, atenção e esclarecimentos bibliográficos.

A FAPESP pelo apoio financeiro para execução deste trabalho (Processo n.º 03/13871-8)

RESUMO

PACHECO, R. C. Pesquisa de *Rickettsia* spp. em carrapatos *Amblyomma dubitatum* Neumann 1899 e *Amblyomma triste* Koch 1844, provenientes do Brasil e Uruguai, respectivamente. [Survey of *Rickettsia* spp. in *Amblyomma dubitatum* Neumann 1899 and *Amblyomma triste* Koch 1844 ticks from Brazil and Uruguay, respectively]. 2007. 51 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Com o objetivo de obtermos isolados de *Rickettsia* spp. para confirmar as evidências sobre o papel do *A. dubitatum* e do *A. triste* na transmissão de riquetsia do GFM no Brasil e Uruguai, respectivamente, realizou-se em áreas endêmicas para febre maculosa nesses dois países, a avaliação da presença de riquetsia em carrapatos da espécie *A. dubitatum* no município de Pedreira, estado de São Paulo e em carrapatos da espécie *A. triste*, em uma área suburbana no sudeste do Uruguai, além da tentativa de isolamento em cultivo de células Vero e posterior caracterização molecular de isolados provenientes dessas duas espécies de carrapatos. Foram coletados um total de 841 (367 machos e 474 fêmeas) carrapatos adultos da espécie *A. dubitatum* e 78 (25 machos e 53 fêmeas) amostras de *A. triste*, os quais foram submetidos ao teste de hemolinfa. Todas as amostras foram submetidas à extração de DNA e testadas pela técnica da PCR para o gene *gltA*, presente em todas as espécies de riquetsias. Dos 841 *A. dubitatum* colhidos, em 153 (18,18%) amostras de hemolinfa foram observados organismos morfollogicamente compatíveis com riquetsias, 452 foram negativas (53,74%) e 236 (28,06%) amostras de carrapatos foram inconclusivas. Todas as 78 amostras de carrapatos da espécie *A. triste* provenientes do Uruguai foram negativas no teste de hemolinfa. Dos 841 *A. dubitatum*, um total de 378 (44,94%) amostras foram positivas para o gene *gltA* e, posteriormente, foram testadas para o gene *ompA*, sendo que nenhuma das amostras foi positiva. Dos 378 *A. dubitatum* positivos na PCR, o produto amplificado de 93 foi seqüenciado, sendo todos identificados como *Rickettsia bellii* de acordo com seqüências disponíveis no GenBank. Das 78 amostras de carrapatos da espécie *A. triste*, provenientes do Uruguai, duas amostras,

denominadas de carrapatos #5 e #35, foram positivas na PCR e, submetidas à tentativa de isolamento em células Vero, pela técnica de “shell vial”. O estabelecimento do isolado de riquetsia somente foi obtido com sucesso do carrapato #5, sendo este isolado designado de At#5-URG, o qual foi depositado como amostra de referência em nosso laboratório. Amostras de DNA do isolado At#5-URG foram testadas para uma bateria de oligonucleotídeos iniciadores objetivando a amplificação de fragmentos de mais três genes de riquetsias: *gltA*, *ompB* e *ompA*, os quais foram, posteriormente seqüenciados e os fragmentos de 1.084, 775 e 491 nucleotídeos dos genes *gltA*, *ompB* e *ompA*, respectivamente, foram obtidos e mostraram 100% de identidade com as seqüências correspondentes disponíveis no GenBank para a cepa Maculatum de *Rickettsia parkeri* dos EUA.

Palavras-chave: Carrapatos. *Amblyomma dubitatum*. *Amblyomma triste*. *Rickettsia bellii*.

Rickettsia parkeri.

ABSTRACT

PACHECO, R. C. **Survey of *Rickettsia* spp. in *Amblyomma dubitatum* Neumann 1899 and *Amblyomma triste* Koch 1844 ticks from Brazil and Uruguay, respectively.** [Pesquisa de *Rickettsia* spp. em carrapatos *Amblyomma dubitatum* Neumann 1899 e *Amblyomma triste* Koch 1844, provenientes do Brasil e Uruguai, respectivamente]. 2007. 51 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Owing to the potential role of the tick *Amblyomma dubitatum* and *Amblyomma triste* in the transmission of the Spotted Fever Group (SFG) *Rickettsia*, this study evaluated infection by *Rickettsia* in ticks collected in Brazil and Uruguay, where rickettsial infection is endemic. A total of 841 (367 males e 474 females) *A. dubitatum* adult ticks were collected in Pedreira, an area of Brazilian Spotted Fever (BSF) endemicity in the state of São Paulo, and 78 adult ticks (25 males, 53 females) identified as *A. triste* were collected from vegetation in the suburban area of Toledo Chico, southern Uruguay. At the laboratory, all samples were individually processed by the hemolymph test with Gimenez staining and PCR targeting a fragment of the rickettsial gene *gltA*, present in all *Rickettsia* species. From 841 *A. dubitatum* ticks tested by the hemolymph test, 153 (18.18%) samples were positive, 452 (53.74%) were negative, and 236 (28.06%) were inconclusive. All 78 samples of *A. triste* ticks from Uruguay were negative by the hemolymph test. All 841 samples of *A. dubitatum* were submitted to PCR, being 378 (44.94%) positive and afterwards tested by PCR targeting a 150-bp fragment of the *ompA* (a major outer membrane protein A present only in SFG *Rickettsia*), being all samples negative. From the 378 PCR-positive samples of *A. dubitatum*, DNA sequence was determined for 93 samples, being all identified as *Rickettsia bellii* according to GenBank available sequences. For the *A. triste* samples, only 2 ticks (1 male, 1 female) yielded expected amplicons by PCR. *Rickettsia* isolation in cell culture was attempted by using the shell vial technique from these two PCR-positive ticks. Rickettsiae were successfully isolated and established in Vero cell culture from the female tick. This isolate, designated as At#5-

URG, has been deposited as a reference strain in the Rickettsial Collection of Faculty of Veterinary Medicine in the University of São Paulo. DNA extracted from infected cells of the third passage was tested by a battery of PCRs that used primer pairs targeting fragments of 3 rickettsial genes: *gltA*, *ompB* (a major outer membrane protein B), and *ompA*. PCR products of expected size were obtained in all reactions and subjected to DNA sequencing. Fragments of 1,084, 775, and 491 bp of the *gltA*, *ompB*, and *ompA* genes, respectively, were obtained and showed 100% identity to the corresponding sequences available in GenBank for the Maculatum strain of *Rickettsia parkeri* from United States.

Key-words: Ticks. *Amblyomma dubitatum*. *Amblyomma triste*. *Rickettsia bellii*. *Rickettsia parkeri*.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Par de oligonucleotídeos iniciadores utilizado na amplificação dos genes de <i>Rickettsia</i> sp. _____	31
TABELA 2 -	Total de amostras de carrapatos <i>Amblyomma dubitatum</i> e <i>Amblyomma triste</i> distribuídas conforme o sexo e local _____	32
TABELA 3 -	Resultado das amostras de carrapatos <i>Amblyomma dubitatum</i> e <i>Amblyomma triste</i> submetidas ao teste de hemolinfa _____	33
TABELA 4 -	Resultado das amostras de carrapatos <i>Amblyomma dubitatum</i> e <i>Amblyomma triste</i> submetidas ao teste da PCR _____	34

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Localização do município de Pedreira, no estado de São Paulo, área endêmica para FMB e local de coleta de carrapatos _ _ _ _ _	24
FIGURA 2 -	Armadilha de gelo seco montada para captura de carrapatos _ _ _ _	24
FIGURA 3 -	Armadilha de gelo seco montada após 1 hora para captura de carrapatos _ _ _ _ _	25
FIGURA 4 -	Localização do estado de Canelones, no Uruguai, área de ocorrência de riquetsiose naquele país e local de coleta de carrapatos <i>Amblyomma triste</i> _ _ _ _ _	25

LISTA DE ABREVIATURAS

%	porcento
,	minutos
”	segundos
°	graus
°C	graus Celsius
B.O.D.	“Biological Oxygen Demand”
BHI	“brain and heart infusion” – infusão de cérebro e coração
cm ³	centímetros cúbicos
DNA	ácido desoxirribonucléico
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
EUA	Estados Unidos da América
et al.	e colaboradores
FMB	febre maculosa brasileira
FMMR	febre maculosa das montanhas rochosas
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
<i>g</i>	gravidade terrestre
<i>glutA</i>	gene citrato sintase
GT	grupo tifo
GFM	grupo da febre maculosa
IFD	imunofluorescência direta
HCl	cloreto de hidrogênio
MEM	“Minimum Essential Medium”
μL	microlitro
mL	mililitro

nG	nanograma
mM	milimolar
<i>ompA</i>	“outer membrane protein A” – proteína externa de membrana A
<i>ompB</i>	“outer membrane protein B” – proteína externa de membrana B
pmoles	pico moles
PCR	“Polymerase Chain Reaction” - Reação em Cadeia pela Polimerase
pb	pares de bases
pH	potencial hidrogeniônico
RIFI	reação de imunofluorescência indireta
S	“South”
SPG	sucrose-fosfato-glutamato
TE	tampão Tris HCL-EDTA
Tris	tris (hidroximetil) amino metano
USP	Universidade de São Paulo
VPS	Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal
W	“West”

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	22
3	MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1	Local de estudo e obtenção de carrapatos	23
3.2	Teste de hemolinfa	26
3.3	Extração de DNA	26
3.4	PCR dos carrapatos	27
3.5	Isolamento de riquétsias de carrapatos	28
3.6	Manutenção em laboratório e definição taxonômica do isolado	29
3.7	Seqüenciamento de DNA	30
3.8	Análise dos Resultados	30
4	RESULTADOS	32
4.1	Coleta de carrapatos	32
4.2	Teste de hemolinfa	33
4.3	PCR dos carrapatos	33
4.4	Isolamento de riquétsias de carrapatos	35
4.5	Manutenção em laboratório e definição taxonômica do isolado	35
5	DISCUSSÃO	37
6	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

A *Rickettsia* spp. é uma bactéria intracelular obrigatória pertencente à família *Rickettsiaceae* e ordem *Rickettsiales* (RAOULT; ROUX, 1997). As espécies deste gênero estão divididas em dois grupos, baseados nos padrões antigênicos, moleculares e ecológicos:

- i. grupo do tifo (GT), composto pelas espécies *Rickettsia prowazekii* e *Rickettsia typhi*, transmitidas por piolhos e pulgas, respectivamente.
- ii grupo da febre maculosa (GFM), o qual está composto por mais de 23 espécies válidas, e a transmissão da grande maioria das espécies do GFM está associada a carrapatos, com exceção da *Rickettsia felis* e *Rickettsia akari* associada a pulgas e ácaros, respectivamente. Outras espécies de riquetsias, tais como, *Rickettsia bellii* e *Rickettsia canadensis* não estão inseridas em nenhum destes dois grupos (YU; WALKER, 2003).

No GFM há pelo menos doze espécies de riquetsias que, comprovadamente, causam infecções no homem (*Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia africae*, *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia australis*, *Rickettsia honei*, *Rickettsia sibirica*, *Rickettsia japonica*, *Rickettsia massiliae*, *Rickettsia aeschlimannii*, *R. akari* e *R. felis*) (RAOULT; ROX, 1997; RAOULT et al., 2002). No entanto, as espécies de riquetsias não patogênicas ou, de patogenicidade desconhecida, podem apresentar um papel fundamental na história natural das espécies patogênicas, pois carrapatos infectados por uma espécie de riquetsia não patogênica para humanos (ex. *Rickettsia montana*, *Rickettsia peacockii*), se tornam incapazes de manter (via transmissão transovariana) a infecção por outra espécie patogênica (ex.: *R. rickettsii*) (BURGDORFER, 1988; MACALUSO et al., 2002). Este fato torna-se de grande importância prática, pois há populações de carrapatos infectadas com riquetsias não patogênicas em taxas, muitas vezes maiores de infecção, em relação as riquetsias patogênicas (PHILIP; CASPER, 1981; LABRUNA et al., 2004c; PINTER; LABRUNA, 2006).

A febre maculosa causada pela espécie *R. rickettsii*, foi primeiramente descrita nos Estados Unidos (EUA), onde a doença recebeu o nome de febre maculosa das montanhas rochosas (FMMR). Neste país, o pesquisador Dr. Howard Taylor Ricketts efetuou o primeiro isolamento de *R. rickettsii* no início do século XX, quando também estabeleceu o papel do carrapato na transmissão da doença (RICKETTS, 1909). Além dos EUA, a *R. rickettsii* ocorre endemicamente no México (febre manchada), Colômbia (febre de Tobia), Costa Rica e Panamá (PATINO et al., 1937; BUSTAMENTE; VARELA, 1947; RODANICHE, 1953; FUENTES, 1986; PHILIP et al., 1978), sendo transmitida, primariamente por carrapatos do gênero *Amblyomma* (MCDADE; NEWHOUSE, 1986). No Brasil, a doença causada por riquetsias do GFM é denominada febre maculosa brasileira (FMB) e a *R. rickettsii* tem sido incriminada como principal agente etiológico. Casos confirmados de infecção por *R. rickettsii* tem sido relatados em determinadas áreas dos quatros estados da região Sudeste (SEXTON et al., 1993; LEMOS et al., 2001; ROZENTAL et al., 2002; GALVÃO et al., 2003). Há também um caso confirmado na Bahia na década de 1970 (PLANK et al., 1979) e, mais recentemente, de 2002 a 2006, foram diagnosticados os primeiros casos de febre maculosa nos estados de Santa Catarina, na região de Blumenau (MADEIRA; WEISBRICH, 2004), Paraná (São José dos Pinhais) e Rio Grande do Sul (região de Serro Grande)¹. Em consequência de algumas peculiaridades clínicas e epidemiológicas, é possível que alguns desses casos registrados fora da região Sudeste possam ter sido causados por outra espécie de riquetsia (LABRUNA, 2006).

Antes do ano de 2002, todos os casos confirmados de febre maculosa nas Américas eram atribuídos a um único agente, *R. rickettsii*. Paradoxalmente, *R. rickettsii* contribuía com a minoria dos isolados de riquetsias do GFM e, historicamente, as outras espécies de riquetsias transmitidas por carrapatos eram descritas como não patogênicas (PADDOCK,

¹ Comunicação pessoal fornecida por MARTINS, E. C. em 17 de março de 2004.

2005). Recentemente, Paddock et al. (2004) relataram o primeiro caso humano de infecção por *R. parkeri* nos EUA e Whitman et al. (2007), a segunda infecção humana por essa espécie de riquetsia, também descrita nos EUA. A *R. parkeri* foi isolada pela primeira vez em 1937, por Ralph Robinson Parker, provenientes de carrapatos da espécie *Amblyomma maculatum* do estado do Texas (PARKER et al., 1939), responsáveis por sintomas em cobaias (*Cavia aperea porcellus*) semelhantes aos da *R. rickettsii* (febre alta, edema testicular e de extremidades severo, podendo apresentar necrose e mortalidade nos animais), porém mais brandos e sem mortalidade (PARKER et al., 1939; LACKMAN et al., 1949). No entanto, somente após mais de 65 anos de sua primeira descrição, confirmou-se a sua patogenicidade aos seres humanos.

A infecção por *R. parkeri* causa uma doença, em seres humanos, com sintomatologia mais branda, associada a linfadenopatia e uma lesão papular típica (“tache noir”) nos locais de fixação do carrapato (CONTI-DIAZ, 2001; PADDOCK et al., 2004; WHITMAN et al., 2007), características esta, descrita em raros casos de riquetsiose por *R. rickettsii*, associada a sintomatologia mais severa e alta letalidade. Neste contexto, relatos de riquetsiose com sintomatologia mais branda e associados à lesão papular típica (“tache noir”) podem representar potenciais casos de riquetsiose por *R. parkeri*. Nos EUA, inúmeros relatos preenchem estes quesitos na literatura médico-científica relatada durante os últimos 80 anos (PADDOCK, 2006) e, possivelmente outros casos por essa e outras riquetsiose já deveriam estar ocorrendo nos EUA (RAOULT; PADDOCK, 2005). Medina-Sanchez et al. (2005), no México, observaram que 16% (36/345) pacientes apresentaram evidências sorológicas de infecção por *R. parkeri*. No continente Sul Americano a *R. parkeri* foi detectada pela primeira vez, através de análises moleculares pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) e sequenciamento em amostras de carrapatos da espécie *Amblyomma triste*. Estes achados são particularmente intrigantes, pois há trabalhos do Uruguai que relatam os primeiros casos humanos por *R. conorii* no continente americano, associados a um quadro febril e uma lesão

popular típica (“tache noire”). Esses relatos se basearam unicamente em resultados sorológicos empregando *R. conorii* como antígeno (CONTI-DÍAZ, et al., 1990; CONTI-DÍAZ, 2001; CONTI- DÍAZ, 2003). No Brasil, Labruna et al. (2004c) detectaram uma *Rickettsia* sp, provisoriamente chamada de amostra COOPERI (= *R. parkeri*) em carrapatos *Amblyomma dubitatum* (= *Amblyomma cooperi*), filogeneticamente muito próxima a *R. parkeri*.

A FMB, causada por *R. rickettsii* é considerada, indubitavelmente, como uma das doenças de maior letalidade no estado de São Paulo. Clinicamente, assim como observado na FMMR, também causada por *R. rickettsii*, na América do Norte, os pacientes apresentam febre alta, cefaléia, mialgia e o aparecimento de manchas na pele como principais sintomas observados, com uma taxa de letalidade de 30% (ANGERAMI et al., 2006). Como a infecção humana por *R. parkeri* tem sido descrita como uma febre maculosa mais branda, sem letalidade, quando comparada a infecção por *R. rickettsii*, é possível que casos de riquetsioses por *R. parkeri* possam estar ocorrendo no estado, uma vez que não há a definição taxonômica da espécie de riquetsia detectada no diagnóstico dos casos humanos de FMB.

Em relação à transmissão da febre maculosa na América do Norte, considera-se que a *R. rickettsii* mantém seu ciclo vital na natureza, entre o carrapato vetor (*Dermacentor andersoni* e *Dermacentor variabilis*) e algumas espécies de pequenos roedores, chamadas de hospedeiros amplificadores (*Microtus pensilvanicus*, *Pitymus pinetorum*, *Peromyscus leucopus* e *Sigmodon hispidus*) (McDADE; NEWHOUSE, 1986; BURGDORFER, 1988). Recentemente, no Arizona, carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* foram incriminados como possível vetor da FMMR em 16 pacientes, os quais relataram contato com os cães que apresentavam alta infestação por *R. sanguineus*, dos quais foram obtidos um isolado de *R. rickettsii* (DEMMA et al., 2005). Embora a bactéria também seja transmitida hereditariamente entre gerações sucessivas de uma população de carrapatos, apenas este

mecanismo não seria suficiente para mantê-la ativa ao longo do tempo, uma vez que há evidências laboratoriais de que *R. rickettsii* é patogênica para o carrapato vetor (NIEBYLSKI et al., 1999). Desta forma, outro mecanismo deve existir para garantir a manutenção na bactéria na natureza. Este mecanismo é o efeito amplificador que alguns animais silvestres desempenham. Nesse caso, o hospedeiro amplificador mantém a bactéria em níveis altos em sua corrente sanguínea por alguns dias ou semanas, o que garante que novos carrapatos não infectados se infectem, amplificando a infecção por *R. rickettsii* na população de carrapatos (BURGDORFER, 1988).

Na América Latina, a *R. rickettsii* foi devidamente caracterizada em duas espécies de *Amblyomma* (*Amblyomma cajennense* e *Amblyomma aureolatum*), em *Haemaphysalis leporipalustris* e *R. sanguineus* (LABRUNA, 2004). No Brasil a *R. rickettsii* é transmitida ao homem e animais, por pelo menos duas espécies de carrapatos brasileiros: *A. cajennense* (DIAS; MARTINS, 1939; GUEDES et al., 2005) e *A. aureolatum* (PINTER; LABRUNA, 2006). A sobrevivência transestadial e a transmissão transovariana da *R. rickettsii* no carrapato *A. cajennense* foi constatada em diversos trabalhos (MONTEIRO; FONSECA, 1932; MONTEIRO et al., 1932; BRUMPT, 1933; PARKER et al., 1933; TRAVASSOS; VALLEJO-FREIRE, 1942). Embora ainda não haja comprovação de qualquer espécie animal, incriminada como hospedeiro amplificador de *R. rickettsii* para *A. cajennense* no Brasil, diferentes trabalhos realizados desde a década de 1930 têm levado à suspeitas das capivaras, gambás e coelhos silvestres (LABRUNA, 2006).

Em relação à transmissão de *R. parkeri*, entretanto, há poucos estudos disponíveis sobre o ciclo natural de transmissão da doença, sendo que muitos aspectos da epidemiologia e história natural precisam ser elucidados (PADDOCK et al., 2004). Carrapatos da espécie *A. maculatum* têm sido encontrados naturalmente infectados nos EUA (PARKER et al., 1939; LACKMAN et al., 1949) e o *Amblyomma americanum* demonstrou a capacidade de infecção

por *R. parkeri* e a manutenção (via transmissão transovarina e sobrevivência transestadial) (GODDARD, 2003). No Uruguai, o *A. triste* é considerado a principal espécie de carrapato que parasita os seres humanos e, também o principal vetor de rickettsiose no país (VENZAL et al., 2003). No Brasil, embora não haja comprovação do papel do carrapato *A. dubitatum* na transmissão de FMB, a detecção de riquetsias do GFM nessa espécie de carrapato tem levado a suspeitar de um possível papel na epidemiologia da febre maculosa em áreas endêmicas.

2 OBJETIVOS

Com o objetivo de obtermos isolados de *Rickettsia* spp. para confirmar as evidências sobre o papel do *A. dubitatum* e do *A. triste* na transmissão de riquetsia do GFM no Brasil e Uruguai, respectivamente, realizou-se os seguintes procedimentos em áreas endêmicas para febre maculosa nesses dois países:

- ✦ A avaliação da presença de riquetsia do GFM em carrapatos da espécie *A. dubitatum* no município de Pedreira, estado de São Paulo;
- ✦ A avaliação da presença de riquetsia do GFM em carrapatos da espécie *A. triste*, em uma área suburbana no sudeste do Uruguai;
- ✦ Busca do isolamento em cultivo de células Vero de bactérias do GFM a partir de carrapatos *A. dubitatum* e *A. triste* naturalmente infectados;
- ✦ Caracterização molecular de isolados provenientes dessas duas espécies de carrapatos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de estudo e obtenção de carrapatos

Durante o período de 2004 a 2006, carrapatos adultos da espécie *A. dubitatum* foram coletados de duas propriedades rurais: Fazenda Monte Nilo (22°44'19''S, 46°55'27''W) e Fazenda Quitandinha, (22°47'03''S, 46°54'10''W) ambas localizadas às margens do rio Jaguari no município de Pedreira, estado de São Paulo (Figura 1), considerada área endêmica para FMB desde 1985, quando surgiram as primeiras suspeitas diagnósticas na região, além de relatos da presença de *A. dubitatum*, naturalmente infectados com riquetsias do GFM (LEMOS et al., 1996; LABRUNA et al., 2004a). Os carrapatos foram capturados utilizando armadilhas de gelo seco (CO₂) (Figuras 2 e 3), segundo Oliveira et al. (2000) e transportados vivos até o Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), onde foram imediatamente incubados a 35°C por 48 horas em estufa B.O.D. antes de serem submetidos ao teste de hemolinfa.

Paralelamente foram processadas amostras de carrapatos adultos identificados como *A. triste* e coletados da vegetação em uma área suburbana de Toledo Chico (34°44'33''S, 56°06'19''W) em Canelones, Sudeste do Uruguai (Figura 4) e enviados ao nosso laboratório para realização do teste de hemolinfa conforme descrito anteriormente.

Fonte: [http://pt.wikipedia.org/wiki/Pedreira_\(S%C3%A3o_Paulo\)](http://pt.wikipedia.org/wiki/Pedreira_(S%C3%A3o_Paulo))

Figura 1- Localização do município de Pedreira, no estado de São Paulo, área endêmica para FMB e local de coleta de carrapatos.

Figura 2- Armadilha de gelo seco montada para captura de carrapatos

Figura 3- Armadilha de gelo seco montada, após 1 hora para captura de carrapatos

Fonte: <http://ca.wikipedia.org/wiki/Uruguai>

Figura 4- Localização do estado de Canelones, no Uruguai, área de ocorrência de riquetsiose naquele país e local de coleta de carrapatos *Amblyomma triste*

3.2 Teste de hemolinfa

Todos os carrapatos adultos foram processados individualmente para a realização do teste de hemolinfa (BURGDORFER, 1970) coradas pelo método de Gimenez (1964) e examinadas ao microscópio óptico no aumento de 1000x. Após a colheita da hemolinfa, os carrapatos, ainda vivos, foram congelados a -80°C para posterior processamento.

3.3 Extração de DNA

Apesar do teste de hemolinfa ser um método de triagem que permite identificar os carrapatos adultos que estejam infectados por organismos morfológicamente compatíveis com riquétsias (BURGDORFER, 1970), optou-se pela remoção das patas, sem que seu corpo fosse descongelado, de todas as amostras de carrapatos colhidos do município de Pedreira e estas patas foram submetidas à extração de DNA e a técnica da PCR, uma vez que Labruna et al. (2004c) detectaram pela PCR, carrapatos dessa mesma espécie, infectados com riquétsias do GFM apresentando hemolinfa com resultados inconclusivas e negativos. Às patas seccionadas e, posteriormente maceradas, com auxílio de micropistilos, de cada carrapato foram adicionados 50 µL de TE (10 mM Tris HCl, 1mM EDTA, pH 8,0), submetidas à fervura (100°C por 20 minutos) e, posteriormente conservados a -20°C, conforme Horta et al. (2005).

3.4 PCR dos carrapatos

O DNA extraído foi submetido a PCR utilizando-se um par de oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) denominados de CS-5 senso (“forward”) e CS-6 anti-senso (“reverse”) que amplifica um fragmento de 147 pares de base (pb) do gene citrato sintase (*gltA*) (Tabela 1) detectado em todas as espécies de *Rickettsia* conforme Labruna et al. (2004c) para a confirmação da infecção por *Rickettsia* spp. e um par de oligonucleotídeos iniciadores *Rr*190.547 senso e *Rr*190.701 anti-senso que amplifica um fragmento de 154 pb do gene *ompA* (Tabela 1), presente apenas em riquetsias do GFM (EREMEEVA et al., 2003). Optou-se por este par de oligonucleotídeos iniciadores, pois o gene *ompA* não está presente na espécie *R. bellii*. Como é sabido de um trabalho prévio (LABRUNA et al., 2004c), a população de *A. dubitatum* desta área endêmica está infectada por *R. bellii* e pela amostra COOPERI ($\approx R. parkeri$), a PCR para o gene *ompA* será uma forma de selecionar apenas os carrapatos infectados por riquetsias do GFM, para serem processados pelo isolamento em cultivo celular. Não é objetivo do presente trabalho isolar *R. bellii* dos carrapatos, uma vez que duas amostras de *R. bellii* já foram isoladas de *A. dubitatum* desta mesma área, sendo que essas duas amostras foram estabelecidas em cultivo de células em laboratório e caracterizadas molecularmente (LABRUNA et al., 2004c). Os protocolos para a PCR foram previamente descritos por Labruna et al. (2004c) para o gene *gltA* e Eremeeva et al. (2003) para o gene *ompA*.

Todas as amostras de carrapatos da espécie *A. triste* provenientes do Uruguai também foram submetidas à extração de DNA e a técnica da PCR para o gene *gltA* conforme descrito acima. Os carrapatos positivos na PCR também foram processados para a tentativa de isolamento em cultivo celular, conforme descrito abaixo.

3.5 Isolamento de riquetsias de carrapatos

Cada carrapato *A. dubitatum* positivo na PCR para o gene *ompA* ou *A. triste* positivo na PCR para o gene *gltA* (conforme descrito no item 3.4), foi descongelado e submetido à técnica de isolamento de riquetsias em cultura de células Vero, conforme descrito por Marrero e Raoult (1989) e modificada por Labruna et al. (2004c). Em suma, cada carrapato positivo foi descongelado, macerado em 300 µl de solução de “brain and heart infusion” (BHI) e processado individualmente pela técnica de “shell vial” para tentativa de isolamento de riquetsias. Um “shell vial” consiste em um tubo cilíndrico, com fundo raso, no qual será formada uma monocamada de células Vero. Dois destes tubos foram utilizados para cada carrapato, sendo que alíquotas de 100 µl de homogenato de carrapato foram inoculadas diretamente em cada tubo. Os tubos inoculados foram imediatamente centrifugados por 1 hora a 600g a 22°C. Após isso, a monocamada de células Vero foi lavada com meio MEM (“Minimum Essential Medium”/Invitrogen®), contendo 5% de soro de bezerro bovino (Hyclone®). Após isso, 1 mL do mesmo meio, foi adicionado de antibióticos, na concentração final de 1% de penicilina, estreptomicina (GIBCO/ Invitrogen Corporation®) e colocado em cada tubo, os quais foram incubados às temperaturas de 28 e 32°C (um tubo para cada temperatura). Após três dias, o meio líquido de cada tubo foi centrifugado e o “pelete” fixado em lâmina de vidro, as lâminas foram coradas pelo método de Gimenez (GIMENEZ, 1964), para visualização de estruturas com morfologia semelhantes as riquetsias no interior das células (LABRUNA et al., 2004c). Quando foi possível observar estruturas compatíveis com riquetsias, as células do tubo foram raspadas com a ponta de uma pipeta e, inoculadas em uma garrafa de 25cm³ contendo uma monocamada de células Vero, para tentativa de estabelecer o isolado em laboratório. Quando negativos, os tubos continuaram incubados na mesma temperatura, e examinados a cada três dias, até que a monocamada fosse naturalmente

destruída. Depois de estabelecido o isolado em células Vero, este foi submetido à extração de DNA utilizando-se o “Tissue Kit[®]” (Quiagen[®]), segundo o protocolo para extração de DNA de células e a PCR.

3.6 Manutenção em laboratório e definição taxonômica do isolado

O isolado de riquetsia foi submetido a passagens seriadas em monocamadas de células Vero em garrafa de 150cm³. Monocamadas que demonstraram nível de infecção próximo de 100% das células (determinado visualmente através de coloração de Gimenez), foram raspadas, e a suspensão de células foi centrifugada. O sedimento de células foi ressuspendido em tampão sucrose-fosfato-glutamato (SPG), pH 7.0, estéril, sendo então congelado a -80°C (LABRUNA et al., 2004c), formando-se amostras de referência para o isolado obtido. Parte deste material foi submetida à extração de DNA pelo “Tissue Kit[®]” (Quiagen[®]) para ser usado na PCR com o objetivo de amplificar fragmentos dos genes *gltA*, *ompA* e *ompB* (Tabela 1) de riquetsias, essencial para uso em classificação taxonômica de riquetsias (FOURNIER et al., 2003). Os fragmentos amplificados pela PCR foram seqüenciados em seqüenciador automático, e as seqüências obtidas analisadas, juntamente com as correspondentes de outras espécies de riquetsias disponíveis no GenBank. As distâncias filogenéticas entre o isolado e as espécies válidas foram analisadas, para verificar se o isolado poderia ser considerado uma espécie nova, ou simplesmente uma nova amostra de alguma espécie válida de riquetsia. Além disso, para uma apropriada descrição de qualquer espécie nova de riquetsia, é imprescindível que se tenha disponível em laboratório, amostras vivas de referência da amostra descrita (FOURNIER et al., 2003).

3.7 Seqüenciamento de DNA

Após a confirmação da positividade da amostra pela PCR pelo gel de agarose corado com brometo de etídio, o material amplificado foi purificado utilizando-se o produto ExoSAP-IT[®] (USB[®] Corporation) conforme instruções do fabricante. Após a purificação, as amostra foram submetidas ao seqüenciamento utilizando o “Kit Big Dye 3.1”, de acordo com as instruções do fabricante (4 µl de DNA purificado – concentração máxima de 100 nG, 1 µl de água de mili Q, 0,75 µl de “Big Dye”, 1 µl de oligonucleotídeos iniciadores específicos senso e antisenso (5 pmoles/µl) e 3,25 de “save money”. Foi utilizado o seqüenciador de DNA modelo ABI “Prism 3100 Genetic Analyser” (Applied Biosystems/Perkin Elemer[®]), segundo manual de instruções (“Automated DNA sequencing”, 1998). As seqüências obtidas foram submetidas ao programa “BLAST analysis” (ALTSCHUL et al., 1990) para determinar similaridades com outras espécies de riquetsias.

3.8 Análise dos Resultados

As seqüências de nucleotídeos obtidas foram analisadas através dos critérios propostos por Fournier et al. (2003), para determinação se o novo isolado de riquetsia é uma espécie nova ou não. Este critério se baseia em similaridades das seqüências de nucleotídeos do isolado com as seqüências correspondentes de amostras conhecidas.

Tabela 1- Par de oligonucleotídeos iniciadores utilizado na amplificação dos genes de *Rickettsia* sp.

Gene	Par de oligonucleotídeos iniciadores	Sequência do oligonucleotídeos (5' → 3')	Referência
<i>gltA</i>	CS-5	GAGAGAAAATTATATATCCAATGTTGAT	LABRUNA et al., 2004c
	CS-6	AGGGTCTTCGTGCATTTCTT	LABRUNA et al., 2004c
	CS-78	GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT	LABRUNA et al., 2004c
	CS-323	GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT	LABRUNA et al., 2004c
	CS-239	GCTCTTCTCATCCTATGGCTATTAT	LABRUNA et al., 2004c
	CS-1069	CAGGGTCTTCGTGCATTTCTT	LABRUNA et al., 2004c
<i>ompA</i>	Rr190.547	CCTGCCGATAATTATACAGGTTTA	EREMEEVA et al., 2003
	Rr190.701	GTTCCGTTAATGGCAGCATCT	REGNERY et al., 1991
	Rr190.70	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA	REGNERY et al., 1991
	Rr190.602	AGTGCAGCATTTCGCTCCCCCT	REGNERY et al., 1991
<i>ompB</i>	120-M59	CCGCAGGGTTGGTAACTGC	ROUX; RAOULT, 2003
	120-807	CCTTTTAGATTACCGCCTAA	ROUX; RAOULT, 2003

4 RESULTADOS

4.1 Coleta de carrapatos

Um total de 841 (367 machos e 474 fêmeas) carrapatos adultos identificados como *A. dubitatum* foram colhidos nas duas áreas selecionadas para realização do trabalho: 815 amostras na Fazenda Monte Nilo e 26 amostras de carrapatos na Fazenda Quitandinha. Um total de 78 amostras de carrapatos (25 machos e 53 fêmeas) identificados como *A. triste* e coletados da vegetação em uma área suburbana no Sudeste do Uruguai foi processada (Tabela 2).

Tabela 2- Total de amostras de carrapatos *Amblyomma dubitatum* e *Amblyomma triste* distribuídas conforme o sexo e local

Origem da População	Local de Colheita	Total de carrapatos	machos (%)	fêmeas (%)
Pedreira, São Paulo	Quitandinha	26	7 (26,92)	19 (73,08)
Pedreira, São Paulo	Monte Nilo	815	360 (44,17)	455 (55,83)
Total		841	367 (43,63)	474 (56,37)
Canelones, Uruguai	Toledo Chico	78	25 (32,05)	53 (67,95)
Total		78	25 (32,05)	53 (67,95)

4.2. Teste de hemolinfa

Dos 841 carrapatos *A. dubitatum* colhidos, em 153 (18,18%) amostras de hemolinfa foram observados organismos morfológicamente compatíveis com riquetsias, 452 foram negativas (53,74%) e 236 (28,06%) amostras de carrapatos foram inconclusivas. Do total de amostras positivas, 71 (46,40%) carrapatos eram machos e 82 (53,59%) fêmeas. Os resultados inconclusivos ocorreram devido a problemas inerentes a técnica, como excesso de corante ou perda da camada de células da hemolinfa fixadas na lâmina. Todas as 78 amostras de carrapatos da espécie *A. triste* provenientes do Uruguai foram negativas no teste de hemolinfa (Tabela 3).

Tabela 3- Resultado das amostras de carrapatos *Amblyomma dubitatum* e *Amblyomma triste* submetidas ao teste de hemolinfa

Origem da População	Local de Colheita	Total de carrapatos	positivos (%)	negativos (%)	inconclusivos (%)
Pedreira, São Paulo	Quitandinha	26	11 (42,30)	15 (57,70)	0
Pedreira, São Paulo	Monte Nilo	815	142 (17,42)	437 (53,61)	236 (28,97)
Total		841	153 (18,18)	452 (53,74)	236 (28,06)
Canelones, Uruguai	Toledo Chico	78	0	78 (100)	0
Total		78	0	78 (100)	0

4.3 PCR dos carrapatos

Dos 841 carrapatos colhidos do Município de Pedreira, um total de 378 (44,94%) amostras foram positivas para o gene *gltA* e, posteriormente, foram testadas para o gene *ompA*, sendo que nenhuma das amostras foi positiva (Tabela 4). Com o objetivo de verificar a

freqüência da infecção de *R. bellii* na população de carrapatos estudada durante o período de desenvolvimento do projeto, uma vez que isso possa interferir na manutenção de outra espécie de riquetsia pelo carrapato, foram selecionadas todas as amostras coletadas na Fazenda Quitandinha e 181 amostras da Fazenda Monte Nilo, totalizando 207, das quais apenas 93 amostras foram positivas para o gene *gltA*, tendo sido seqüenciadas para determinação da espécie de riquetsia. Todas as 93 seqüências obtidas (100 pb para cada carrapato) foram analisadas, juntamente com as correspondentes de outras espécies de riquetsias disponíveis no GenBank, sendo que nenhuma foi classificadas como pertencente a espécies do GFM, porém todas mostraram alta similaridade (>99%) com *R. bellii* (CP000087). O cálculo, com base na distribuição binomial exata, da proporção de carrapatos *A. dubitatum* infectados por *R. bellii* foi de 44,92%.

Das 78 amostras de carrapatos da espécie *A. triste*, provenientes do Uruguai, submetidas a PCR para amplificação de um fragmento do gene *gltA*, duas amostras, denominadas de carrapatos #5 e #35, foram positivas (Tabela 4).

Tabela 4- Resultado das amostras de carrapatos *Amblyomma dubitatum* e *Amblyomma triste* submetidas ao teste da PCR

Origem da População	Local de Colheita	Total de carrapatos	positivos <i>gltA</i> (%)	positivos <i>ompA</i> (%)
Pedreira, São Paulo	Quitandinha	26	11 (42,30)	0
Pedreira, São Paulo	Monte Nilo	815	367 (45,03)	0
Total		841	378 (44,94)	0
Canelones, Uruguai	Toledo Chico	78	2 (2,56)	2 (2,56)
Total		78	2 (2,56)	2 (2,56)

4.4 Isolamento de riquetsias de carrapatos

As duas amostras de carrapatos *A. triste* positivas na PCR foram submetidas à tentativa de isolamento em células Vero, as quais foram inoculadas pela técnica de “shell vial”, tiveram o melhor crescimento quando mantidas a 28°C. O nível de infecção das células foi monitorado através da coloração de Gimenez dos raspados da monocamada de células infectadas. O isolado de riquetsia foi considerado estabelecido em laboratório após pelo menos três passagens através de garrafas de 150cm³ com células Vero e com o nível de infecção alcançando mais do que 90% das células (LABRUNA et al., 2004c).

O estabelecimento do isolado de riquetsia somente foi obtido com sucesso do carrapato #5, sendo este isolado designado de At#5-URG, o qual foi depositado como amostra de referência em nosso laboratório.

4.5 Manutenção em laboratório e definição taxonômica do isolado

Amostras de DNA de células infectadas da terceira passagem do isolado At#5-URG foram testadas para uma bateria de oligonucleotídeos iniciadores objetivando a amplificação de mais três genes de riquetsias: *gltA*, *ompB* e *ompA* (Tabela 1). Foram obtidos os três fragmentos com o tamanho esperado em todas as reações, os quais foram, posteriormente sequenciados como descrito anteriormente. Fragmentos de 1.084, 775 e 491 nucleotídeos dos genes *gltA*, *ompB* e *ompA*, respectivamente, foram obtidos e mostraram 100% de identidade com as seqüências correspondentes disponíveis no GenBank (números de acesso U59732, AF123717, U43802, respectivamente) com a cepa Maculatum de *R. parkeri* dos EUA.

Apesar do insucesso no isolamento de riquétisia do carrapato #35, amostras de DNA deste carrapato e, também do carrapato #5 foram testadas para PCR para o gene *ompA* e o produto esperado (491 pb) foi sequenciado mostrando 100% de identidade com a sequência de *R. parkeri* do GenBank (U43802). Foi possível a identificação de *R. parkeri* em 2.56 % (2/78) dos carrapatos *A. triste* do Uruguai.

5 DISCUSSÃO

Durante o ano de 1990 no Uruguai, foi diagnosticado uma riquetsiose do grupo da febre maculosa em 3 pacientes que apresentaram febre, uma pequena lesão inicial máculo-papular no local da picada do carrapato e, posteriormente linfadenopatia regional. As amostras de soro submetidas a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), utilizando como único antígeno *R. conorii*, foram positivas e, conseqüentemente identificadas como uma infecção por riquetsiose causada por *R. conori* (CONTI-DÍAZ et al., 1990). Durante o período de 1993–1994, um total de 23 pacientes com histórico de picada de carrapatos, algum dos quais apresentaram exantema e uma lesão papular típica (“tache noir”) nos locais de fixação do carrapato, foram identificados em Canelones, Uruguai, locais de coleta dos carrapatos do presente estudo. Estes pacientes apresentaram anticorpos contra *R. conorii*, pela RIFI, utilizando novamente como único antígeno *R. conorii* (CONTI-DÍAZ, 2003). Em função da reação sorológica cruzada entre as riquetsias do GFM (PHILIP et al., 1978), na qual incluem *R. conorii* e *R. parkeri*, a associação da infecção por *R. conorii* nos casos de riquettsioses no Uruguai foi considerada inapropriada e, curiosamente, casos autóctones por *R. conorii* jamais foram identificados no continente americano (PAROLA et al., 1990).

No Uruguai, das três espécies de carrapatos encontradas parasitando seres humanos (*R. sanguineus*, *Amblyomma tigrinum* e *A. triste*), o *A. triste* é, particularmente a espécie mais prevalente no sudeste uruguaio, onde inúmeros casos de riquetsiose foram descritos (CONTI-DÍAZ, et al., 1990; CONTI- DÍAZ, 2001; CONTI- DÍAZ, 2003), sendo considerada a principal espécie de carrapato que parasita os seres humanos e, também o principal vetor de rickettsiose no país (VENZAL et al., 2003). Venzal et al. (2004), detectaram pela primeira vez na América Latina, através de análises moleculares pela PCR e sequenciamento do produto amplificado, 6.5% (6/91) dos carrapatos da espécie *A. triste* coletados no Uruguai, infectados

por *R. parkeri*, no entanto, não foi objetivo do trabalho o isolamento do agente. Das seis amostras de carrapatos infectados (3 machos e 3 fêmeas) coletadas em três humanos e três cães, um dos carrapatos infectados por *R. parkeri* foi coletado sobre uma mulher diagnosticada com sintomatologia de riquetsiose pelo Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la Republica (Uruguai). Apesar de todas as evidências levar nos a crer que os casos de riquetsiose humana no Uruguai serem em consequência da infecção por *R. parkeri*, nenhum isolamento dessa ou de qualquer outra espécie de riquetsia havia sido foi relatado em seres humanos ou mesmo em carrapatos. Neste presente trabalho, o sucesso do primeiro isolamento de *R. parkeri* da América Latina, proveniente do Uruguai, e a não detecção de qualquer outra espécie de riquetsia infectando os carrapatos *A. triste*, aumentam ainda mais as evidências desse agente como responsável pelos casos de riquetsiose naquele país. Outro ponto importante é que populações de *A. maculatum*, associadas como vetores de *R. parkeri* e encontrados naturalmente infectados por esse agente nos EUA, e de *A. triste*, estão estabelecidas em pelo menos outros 12 países da América Latina (GUGLIELMONE et al., 2003), o que possibilita a ocorrência da *R. parkeri* em outros países do continente. Isso implica na necessidade de se desenvolver mais estudos epidemiológicos para se detectar outras espécies de riquetsias que estejam circulando em nosso meio, uma vez que estas podem ser potenciais agentes patogênicos para os seres humanos e os isolados estabelecidos em cultivo celular, serem utilizados na produção de antígenos de origem local para fins diagnósticos e de estudos soro epidemiológicos da região.

No Brasil, onde papel do *A. cajennense* e do *A. aureolatum* na transmissão da *R. rickettsii* está bem estabelecido (DIAS; MARTINS, 1939; GUEDES et al., 2005; PINTER; LABRUNA, 2006), não há qualquer comprovação do papel do carrapato *A. dubitatum* na transmissão de qualquer espécie de riquetsia para humanos e a sua possível participação na epidemiologia da FMB. Lemos et al. (1996) relataram o primeiro isolamento, a partir de um

exemplar dessa espécie de carrapato coletado de capivara, de uma riquetsia do GFM, a partir da Imunofluorescência Direta (IFD) da hemolinfa do carrapato infectado em Pedreira, contudo não houve descrição da espécie de riquetsia encontrada. Embora as capivaras, abundantes em muitas áreas endêmicas para FMB, sejam consideradas hospedeiros primários para todos os estágios parasitários (larva, ninfa e adulto) do carrapato *A. dubitatum*, os estágios de larva e ninfa apresentam menor especificidade parasitária, podendo se alimentar em diversas espécies de hospedeiros em laboratório e em condições naturais (LABRUNA et al., 2004b), inclusive com relatos de parasitismo em seres humanos (FAMADAS et al., 1997; LABRUNA et al., [2007]²). Desta forma, é lógico pensar se esta espécie de carrapato encontra-se infectada por alguma riquetsia patogênica ao homem, ou se seria possível sua participação na transmissão desse agente aos seres humanos. No entanto, não se sabe a frequência com que esse parasitismo possa ocorrer, uma vez que não existe literatura adequada para uma precisa identificação taxonômica de larvas e ninfas das espécies do gênero *Amblyomma* do Brasil, o que dificulta o relato de parasitismo humano por essas fases de vida do carrapato (GUIMARÃES et al., 2001; LABRUNA et al., 2004a).

Labruna et al. (2004c), com objetivo de verificar o papel do *A. dubitatum* no ciclo enzoótico da *R. rickettsii*, avaliaram a infecção por *Rickettsia* spp. em 40 carrapatos coletados no mesmo local de desenvolvimento desse trabalho, tendo encontrado DNA de *R. bellii* em 16 carrapatos (40%), e outros 3 carrapatos (7.5%) positivos para uma riquetsia do GFM, denominada amostra COOPERI (= *R. parkeri*). Embora esses autores obtiveram o isolamento da amostra COOPERI em células Vero, o isolado foi perdido após a terceira passagem. Apesar disso, o fato das análises moleculares iniciais mostrarem que a amostra COOPERI é filogeneticamente próxima de *R. africae*, *R. parkeri* e *R. sibirica* e, como todas essas três

² LABRUNA, M. B.; PACHECO, R. C.; ATALIBA, A. C.; SZABÓ, M. P. J. Human Parasitism by the capybara tick, *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae). **Entomological News**, [2007] (in press).

espécies causam doenças do tipo febre maculosa em humanos em diferentes países, é possível suspeitar que a amostra COOPERI possa também estar causando este tipo de doença no Brasil. É digno de nota que o diagnóstico dos casos humanos de febre maculosa nas áreas endêmicas de São Paulo tem sido realizado através de detecção de títulos de anticorpos anti-*R. rickettsii* pela RIFI ou pelo isolamento de riquétsias de tecidos de doentes em cultura de células, porém sem definição taxonômica da espécie de riquétsia isolada (dados do Laboratório de riquétsias do Instituto Adolpho Lutz, órgão oficial para diagnóstico da FMB em humanos no estado de São Paulo). No primeiro caso, a RIFI não permite a identificação da espécie de riquétsia responsável pela viragem sorológica, uma vez que todas as riquétsias do GFM apresentam alguma reação sorológica cruzada entre si (PHILIP et al., 1978). No segundo caso, o isolamento do agente em cultura de células também impossibilita a identificação da espécie, dada às semelhanças morfológicas entre as espécies de riquétsias (YU; WALKER, 2003). Estrada et al. (2006), objetivando a detecção de riquétsias em carrapatos do gênero *Amblyomma* coletados no município de Campinas, considerado uma região endêmica para FMB no estado de São Paulo, processaram 1.078 exemplares de carrapatos (dos quais 131 eram *A. dubitatum*), tendo observado através da PCR e seqüenciamento somente infecção por *R. bellii* na população de carrapatos estudados.

No presente estudo, não foi possível detectar outra espécie de riquétsia nos carrapatos *A. dubitatum*, exceto *R. bellii* e, embora a amostragem de carrapatos obtida fosse superior à aquela observada por Labruna et al. (2004c), a proporção de carrapatos infectados por *R. bellii* foi semelhante (44,92%). O fato de não ser possível observar qualquer outra espécie de riquétsia do GFM infectado carrapatos *A. dubitatum* leva-nos a inferir, com base na distribuição binomial exata, que se outra riquétsia estivesse circulando na população estudada, a proporção de carrapatos infectados estaria abaixo de 0,003556 (0,3556%).

A *R. bellii*, espécie de patogenicidade desconhecida para os seres humanos, tem sido relatada infectando inúmeras espécies de carrapatos (LABRUNA et al., 2007). Este fato torna-se de grande importância prática, pois o fato de encontrarmos uma proporção alta de carrapatos infectados por *R. bellii*, poderia estar impedindo o estabelecimento de outras espécies de rickettsia (por ex.: cepa COOPERI=*R. parkeri*) na população estudada ou, a manteria em uma proporção muito baixa, o que dificultaria sua detecção na população estudada, pois carrapatos infectados por uma espécie de riquetsia não patogênica para humanos (ex. *R. bellii*), se tornam incapazes de manter (via transmissão transovariana) a infecção por outra espécie patogênica (ex.: *R. rickettsii*, *R. parkeri*) (BURGDORFER, 1988; MACALUSO et al., 2002). A presença de uma riquetsia não patogênica em carrapatos servindo como um fator limitante na distribuição de outra riquetsia patogênica pode ser bem observado no trabalho de Burgdorfer et al. (1981) no Vale Bitterroot, oeste de Montana, EUA, onde a maioria dos casos de febre maculosa ocorria entre os moradores do lado oeste ou entre aqueles que eram picados por carrapatos *D. andersoni* provenientes desse lado do vale, no entanto, muitas pessoas também eram picadas por carrapatos no lado leste, mas poucas adquiriam a doença. Até 80% dos carrapatos *D. andersoni* do lado leste do vale estavam infectados por uma riquetsia do GFM, denominada de “agente do lado leste” e, posteriormente nomeada de *Rickettsia peacockii*, uma riquetsia não patogênica para os seres humanos e mantida via transmissão vertical entre as gerações de carrapatos infectados por essa espécie de riquetsia. Apesar da população de carrapatos *D. andersoni* apresentar infecção por *R. peacockii* em ambos os lados do vale, a prevalência da infecção era maior no lado leste, fato considerado de suma importância como um fator limitante na distribuição limitada *R. rickettsii* na região.

Desde o século XX são estudados os mecanismos de virulência da FMMR e da FMB causadas por *R. rickettsii*, no entanto, nem mesmo com o advento de novas ferramentas

diagnósticas, ainda não foi possível estabelecer a dinâmica dos focos dessa riquetsiose, especialmente seu caráter esporádico, com pequena taxa de infecção entre seus vetores. Outras riquetsioses (por ex.: *R. parkeri*) poderiam apresentar um comportamento epidemiológico semelhante, através da manutenção transovariana e transestadial. No entanto, há poucos estudos disponíveis sobre o ciclo natural de transmissão de *R. parkeri* ou da interferência da infecção pela bactéria no ciclo de vida dos carrapatos, sendo que muitos aspectos da epidemiologia e história natural precisam ser elucidados. Goddard (2003) demonstrou a transmissão transovariana e a sobrevivência transestadial de *R. parkeri* em *A. americanum* (uma das espécies de carrapato mais abundante e agressiva no centro sul dos EUA) por pelo menos duas gerações, além da transmissão para cobaias dessa riquetsiose. No entanto, não há informação disponível que descreva os hospedeiros vertebrados envolvidos como possíveis reservatórios ou amplificadores no ciclo natural de transmissão e a manutenção da infecção no carrapato vetor na natureza.

Apesar da ausência da infecção nos carrapatos de qualquer riquetsia do GFM, a amostra COOPERI (= *R. parkeri*) foi associada com infecção em dois cães residentes em áreas endêmicas para FMB, próximas ao nosso local de estudo, através de análises sorológicas de absorção cruzada com a RIFI (HORTA et al., 2004), o que indica a circulação do agente na região. Utilizando análise comparativa dos títulos de anticorpos específicos em teste sorológico de RIFI frente aos antígenos de *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. felis* e *R. bellii*, Horta (2006) relataram a possível infecção por *R. parkeri* em gambás, eqüinos e outros cães no estado de São Paulo. Pacheco et al. [2007]³, avaliando a infecção por *Rickettsia* spp. através da RIFI em capivaras de diferentes áreas do estado de São Paulo, onde nunca houve relatos de FMB em seres humanos, também observaram evidências sorológicas de infecção por *R.*

³ PACHECO, R. C.; HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; ATALIBA, A. A.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from São Paulo, Brazil: serological evidence for infection by *Rickettsia bellii* and *Rickettsia parkeri*, **Biomédica**, [2007](Submitted).

parkeri em três amostras de soro, provenientes do Município de Valparaíso, interior do estado. Outro fato que indica a possibilidade da circulação de uma outra espécie de riquetsia em nosso meio é o surto de febre maculosa no estado de Santa Catarina durante o período de março de 2003 a maio de 2004, onde os pacientes apresentaram sintomatologia mais branda (febre, cefaléia, mialgia, prostração, linfadenopatia e exantema), quando comparados aos casos de FMB causados por *R. rickettsii*. Não foi registrado nenhum caso letal da doença, mesmo em pacientes não tratados, fato esse não constatado em infecções por *R. rickettsii*, onde observa-se quase 100% de letalidade quando não há a intervenção com antibióticos. Interessantemente, a literatura relata que a linfadenopatia é um achado comum na febre maculosa causada por *R. parkeri*, porém raro na causada por *R. rickettsii* (CONTI-DIAZ, 2003; PADDOCK et al., 2004). Não houve relatos de investigação acarológica na região, impossibilitando a confirmação do possível vetor envolvido na epidemiologia da doença em Santa Catarina (MADERA; WEISBRICH, 2004). Como a confirmação dos 10 casos foi feita a partir da RIFI e não foi relatado o isolamento do agente ou, tão pouco, o diagnóstico molecular, não foi possível determinar a espécie de riquetsia envolvida.

Sendo assim, há a necessidade de desenvolvimento de novos estudos com objetivo de se conhecer o maior número de riquetsias patogênicas ou não aos seres humanos para se definir quais possíveis espécies estariam circulando em nosso meio e, com isso, disponibilizar maiores informações sobre os hospedeiros vertebrados envolvidos como possíveis reservatórios ou amplificadores no ciclo natural de transmissão e a manutenção da infecção no carrapato vetor.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no estudo pode-se concluir que:

- ✚ Foi comprovado por isolamento em cultivo celular e caracterização molecular que a população de *A. triste* de Canelones, área endêmica para febre maculosa no sudeste uruguaio, está infectada com *R. parkeri*, sendo este o possível agente da febre maculosa naquela região.
- ✚ Quase a metade da população de *A. dubitatum* de uma área endêmica para febre maculosa de Pedreira, Brasil, esteve infectada por *R. bellii*, o que possivelmente impossibilitou a infecção por uma segunda espécie de rickettsia em frequências superiores a 0,3556% nesta população de carrapatos.

REFERÊNCIAS

ANGERAMI, R. N.; RESENDE, M. R.; FELTRIN, A. F.; KATZ, G.; NASCIMENTO, E. M.; STUCCHI, R. S.; SILVA, L. J. Brazilian Spotted Fever: A case series from an endemic area in southeastern Brazil - clinical aspects. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 252-254, 2006.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.

BRUMPT, E. Transmission de la fièvre pourprée des Montagnes rocheuses par la tique américaine *Amblyomma cajennense*. **Comptes Rendues des Seances de la Société de Biologie**, v. 144, p. 416-419, 1933.

BURGDORFER, W. Ecological and epidemiological considerations of Rock Mountain spotted fever and scrub typhus. In: WALKER, D. H. **Biology of rickettsial diseases**, Boca Raton: CRC p. 33-50. 1988.

BURGDORFER, W. The hemolymph test. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 19, p. 1010-1014, 1970.

BUSTAMANTE, M. E.; VARELA, G. Distribucion de las rickettsias em Mexico. **Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales**, v. 8, p. 3-14, 1947.

CONTI-DÍAZ, I. A. Rickettsiosis caused by *Rickettsia conorii* in Uruguay. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 990, p. 264-266, 2003.

CONTI-DÍAZ, I. A. Rickettsiosis por *Rickettsia conorii* (fiebre botonosa del Mediterráneo o fiebre de Marsella). Estado actual en Uruguay. **Revista Médica de Uruguay**, v. 17, p. 119-124, 2001.

CONTI-DÍAZ, I. A.; RUBIO, I.; SOMMA-MOREIRA, R. E.; PÉREZ-BORMIDA, G. Rickettsiosis cutáneo-ganglionar por *Rickettsia conorii* en el Uruguay. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 22, n. 5, p. 313-318, 1990.

DEMMA, L. J.; TRAEGER, M. S.; NICHOLSON, W. L.; PADDOCK, C. D.; BLAU, D. M.; EREMEEVA, M. E.; DASCH, G. A.; LEVIN, M. L.; SINGLETON, J. JR.; ZAKI, S. R.; CHEEK, J. E.; SWERDLOW, D. L.; MCQUISTON, J. H. Rock Mountain Spotted Fever from Arizona an Unexpected Tick Vector in Arizona. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 6, p. 587-594, 2005.

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

EREMEEVA, M. E.; BOSSERMAN, E. A.; DEMMA, L. J.; ZAMBRANO, M. L.; BLAU, D. M.; DASCH, G. A. Isolation and identification of *Rickettsia massiliae* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks collected in Arizona. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 5569-5577, 2006.

ESTRADA, D. A.; SCHUMAKER, T. T. S.; SOUZA, C. E.; NETO, E. J. R.; LINHARES, A. X. Detecção de riquetsias em carrapatos do gênero *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) coletados em parque urbano do município de Campinas, SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 68-71, 2006.

FAMADAS, K.; LEMOS, E. R. S.; COURA, J. R.; SERRA-FREIRE, N. M. *Amblyomma cooperi* (Acari: Ixodidae) parasitando humano em área de foco de febre maculosa, São Paulo – Brasil. **Acta Parasitológica Portuguesa**, v. 4, p. 154, 1997.

FOURNIER, P. E.; DUMLER, J. S.; GREUB, G.; ZHANG, J.; WU, Y.; RAOULT, D. Gene Sequence-Based Criteria for Identification of New *Rickettsia* Isolates and Description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp. nov. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 5456-5465, 2003.

FUENTES, L. Ecological study of Rock Mountain spotted fever in Costa Rica. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 35, p. 192-196, 1986.

GALVÃO, M. A.; CALIC, S. B.; CHAMONE, C. B.; MAFRA, C. L.; CESARINO FILHO, G.; OLANO, J. P.; WALKER, D. H. Spotted fever rickettsiosis in Coronel Fabriciano, Minas Gerais State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 479-481, 2003.

GIMEMEZ, D. F. Staining rickettsiae in yolk-sac cultures. **Stain Technology**, v. 39, p. 135-140, 1964

GODDARD, J. Experimental infection of lone star ticks, *Amblyomma americanum* (L.), with *Rickettsia parkeri* and exposure of guinea pigs to the agent. **Journal of Medical Entomology**, v. 40, p. 686–689, 2003.

GUEDES, E.; LEITE, R. C.; PRATA, M. C.; PACHECO, R. C.; WALKER, D. H.; LABRUNA, M. B. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 841-845, 2005.

GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PEÑA, A.; KEIRANS, J. E.; ROBBINS, R. G. **Ticks (Acari: Ixodida) of the neotropical Zoogeographic Region. International Consortium on Ticks and Tick-borne Diseases**. Atalanta Houten, 2003.

GUIMARÃES, J. H.; TUCCI, H. E. C.; BARROS-BATTISTI, D. M. **Ectoparasitos de importância veterinária**. São Paulo: Editora Plêiade, 2001. 213 p.

HORTA, M. C. Estudo **Epidemiológico de *Rickettsia felis* em Áreas Endêmicas e Não-endêmicas para Febre Maculosa Brasileira do Estado de São Paulo**. 2006. 106f. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 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, p. 321-325, 2005.

HORTA, M. C.; LABRUNA, M. B.; SANGIONI, L. A.; VIANNA, M. C.; GENNARI, S. M.; GALVAO, M. A.; MAFRA, C. L.; VIDOTTO, O.; SCHUMAKER, T. T.; WALKER, D. H. Serological evidence for the infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group rickettsia in domestic animals in a Brazilian spotted fever endemic area in the state of São Paulo, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 1, p. 93-7, 2004.

LABRUNA, M. B. Carta Acarológica. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, supp. 1, p. 199-202, 2004.

LABRUNA, M. B. Epidemiologia da febre maculosa no Brasil e nas Américas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ACARALOGIA – SIBAC, 1., 2006, Viçosa, **Anais...** p. 63-78.

LABRUNA, M. B.; BOUYER, D. H.; MCBRIDE, J. W.; CAMARGO, L. M. A.; CAMARGO, E. P.; WALKER, D. H. Molecular evidence for a spotted fever group *Rickettsia* species in the tick *Amblyomma longirostre* in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, p. 533-537, 2004a.

LABRUNA, M. B.; PACHECO, R. C.; RICHTZENHAIN, L. J.; SZABO, M. P. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* from *Haemaphysalis juxtakochi* Ticks in the State of São Paulo, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 869 - 873, 2007.

LABRUNA, M. B.; PINTER, A.; TEIXEIRA, R. H. F. Life-cycle of *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae) using capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) as hosts. **Experimental and Applied Acarology**, v. 32, n. 1-2, p. 79-88, 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, 2004c.

LACKMAN, D. B.; PARKER, R. R.; GERLOFF, R. K. Serological characteristics of a pathogenic rickettsia occurring in *Amblyomma maculatum*. **Public Health Report**, v. 64, p. 1342-1349, 1949.

LEMOES, E. R.; ALVARENGA, F. B.; CINTRA, M. L.; RAMOS, M. C.; PADDOCK, C. D.; FEREBEE, T. L.; ZAKI, S. R.; FERREIRA, F. C.; RAVAGNANI, R. C.; MACHADO, R. D.; GUIMARAES, M. A.; COURA, J. R. Spotted fever in Brazil: a seroepidemiological study and description of clinical cases in an endemic area in the state of São Paulo. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 4, p. 329-334, 2001.

LEMOES, E. R.; MELLES, H. H.; COLOMBO, S.; MACHADO, R. D.; COURA, J. R.; GUIMARAES, M. A.; SANSEVERINO, S. R.; MOURA, A. Primary isolation of spotted fever in the group rickettsiae from *Amblyomma cooperi* collected from *Hydrochaeris hydrochaeris* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 3, p. 273-75, 1996.

MACALUSO, K. R.; SONENSHINE, D. E.; CERAUL, S. M.; AZAD, A. F. Rickettsial infection in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) inhibits transovarial transmission of a second *Rickettsia*. **Journal of Medical Entomology**, v. 39, n. 6, p. 809-813, 2002.

MADEIRA, A.; WEISBRICH, J. Surto de Febre Maculosa no Estado de Santa Catarina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 13.; SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 1., 2004, Ouro preto. **Anais...** p. 364.

MARRERO, M. D.; RAOULT, D. Centrifugation-shell vial technique for rapid detection of Mediterranean spotted fever rickettsia in blood culture. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 40, p. 197-199, 1989.

MONTEIRO, J. L.; FONSECA, F. Typho exanthematico de S. Paulo – Novas experiências sobre transmissão experimental por carrapatos (*Boophilus microplus* e *Amblyomma cajennense*). **Memórias do Instituto Butantã**, v. 7, p. 33-40, 1932.

MONTEIRO, J. L.; FONSECA, F.; PRADO, A. Typho endêmico de São Paulo – VI. Pesquisas sobre a possibilidade da transmissão experimental do vírus por Ixodidae. **Brasil Médico**, v. 46, n. 3, p. 49-52, 1932.

McDADE, J. E.; NEWHOUSE, V. F. Natural history of *Rickettsia rickettsii*. **Annual Review of Microbiology**, v. 40, p. 287-309, 1986.

MEDINA-SANCHEZ, A.; BOUYER, D. H.; ALCANTARA-RODRIGUEZ, V.; MAFRA, C. L.; ZAVALA-CASTRO, J.; WHITWORTH, T.; POPOV, V. L.; FERNANDEZ-SALAS, I.; WALKER, D. H. Detection of a typhus group rickettsia in *Amblyomma* ticks in the state of Nuevo Leon, Mexico. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 1063, p.327-332, 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.

OLIVEIRA, P. R.; BORGES, L. M. F.; LOPES, C. M. L.; LEITE, R. C. Population dynamics of the free-living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) on pastures of Pedro Leopoldo, Minas Gerais state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 92, p. 295-301, 2000.

PADDOCK, C. D. *Rickettsia parkeri* as a cause of disease in human. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 14; SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 2., 2006, Ribeirão Preto, **Anais...** p. 91-92.

PADDOCK, C. D. *Rickettsia parkeri* as a paradigm for multiple causes of tick-borne spotted fever in the western hemisphere. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 1063, p. 315–326, 2005.

PADDOCK, C. D.; SUMMER, J. W.; COMER, J. A.; ZAKI, S. R.; GOLDSMITH, C. S.; GODDARD, J.; McLELLAN, 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.

PARKER, R. R. Observations on an infectious agent from *Amblyomma maculatum*. **Public Health Report**, v. 54, p. 1482-1484, 1939.

PARKER, R. R.; PHILIP, C. B.; JELLISON, W. L. Rocky Mountain spotted fever: potentialities of tick transmission in relation to geographical occurrence in the United States. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 13, p. 341-378, 1933.

PAROLA, P.; PADDOCK, C. D.; RAOULT, D. Tick-born rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, p. 719–756, 2005.

PATINO, L.; AFANADOR, A.; PAUL, J. H. A spotted fever in Tobia, Colombia. Preliminary report. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 17, p. 639-653, 1937.

PHILIP, R. N.; CASPER, E. A. Serotypes of spotted fever group rickettsiae isolated from *Dermacentor andersoni* (Stiles) ticks in Western Montana. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, p. 230-238, 1981.

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. **Journal of Immunology**, v. 121, p. 1961–1968, 1978.

PINTER, A. **Aspectos epidemiológicos da Febre Maculosa em uma área endêmica no 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 Paulo, SP, 2003.

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

PLANK, S. J.; TEIXEIRA, R. S.; MILANESI, M. L. Febre Maculosa em Salvador: descrição de um caso. **Revista Médica da Bahia**, v. 25, p. 330-334, 1979.

RAOULT, D.; FOURNIER, P. E.; ABOUD, P.; CARON, F. First Documented Human *Rickettsia aeschlimannii* Infection. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 7, p. 748-749, 2002.
RAOULT, D.; PADDOCK, C. D. *Rickettsia parkeri* infection and Other Spotted Fevers in the United States. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 6, p. 626-627, 2005.

RAOULT, D.; ROUX, V. Rickettsioses as Paradigms of New or Emerging Infectious Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 4, p. 694-719, 1997.

REGNERY, R. L.; SPRUILL, C. L.; PLIKAYTIS, B. D. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 1576-89, 1991.

RICKETTS, H. T. Some Aspects of Rock Mountain Spotted Fever as Shown by Recent Investigations. **Medical Record**, v. 76, p. 843-855, 1909.

RODANICHE, E. C. Natural infection of the tick *Amblyomma cajennense* with *Rickettsia rickettsii* in Panama. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 2, p. 696-699, 1953.

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 Evolution Microbiology**, v. 50, p. 1449-1455, 2003.

ROZENTAL, T.; BUSTAMANTE, M. C.; AMORIM, M.; SERRA-FREIRE, N. M.; LEMOS, E. R. Evidence of spotted fever group rickettsiae in state of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 3, p. 155-158, 2002.

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.

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

VENZAL, J. M.; GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA PEÑA, A.; CABRERA, P. A.; CASTRO, O. Ticks (Ixodida: Ixodidae) parasitising humans in Uruguay. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 97, n. 7, p. 769-72, 2003.

VENZAL, J. M.; PORTILLO, A.; ESTRADA-PEÑA, A.; CASTRO, O.; CABRERA, P. A.; OTEO, J. A. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma triste* from Uruguay. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 8, p. 1493-1495, 2004.

WHITMAN, T. J.; RICHARDS, A. L.; PADDOCK, C. D.; TAMMINGA, C. L.; SNIEZEK, P. J.; JIANG, J.; BYERS, D. K.; SANDERS, J. W. *Rickettsia parkeri* infection after tick bite, Virginia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 334-336, 2007.

YU, X. J.; WALKER, D. H. The Order Rickettsiales. In: DWORKIN, M.(Ed.) **The Prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiology community** 3rd ed. New York: Springer-Verlag, disponível em: <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125>, 2003. Acesso em: 17/04/04.