UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

TATIANA EVELYN HAYAMA UENO

**Infecção experimental de equinos por *Rickettsia rickettsii* e
avaliação da transmissão para carrapatos
*Amblyomma cajennense***

São Paulo

2014

TATIANA EVELYN HAYAMA UENO

**Infecção experimental de equinos por *Rickettsia rickettsii* e
avaliação da transmissão para carrapatos
*Amblyomma cajennense***

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

De acordo: _____
Orientador

São Paulo

2014

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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.2993
FMVZ

Ueno, Tatiana Evelyn Hayama
Infecção experimental de equinos por *Rickettsia rickettsii* e avaliação da transmissão para carrapatos
Amblyomma cajennense / Tatiana Evelyn Hayama Ueno. -- 2014.
83 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2014.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna.

1. *Rickettsia rickettsii*. 2. Equinos. 3. Carrapatos. 4. *Amblyomma cajennense*. 5. Febre maculosa.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Infecção experimental de equinos por *Rickettsia rickettsii* e avaliação da transmissão para carrapatos *Amblyomma cajennense*", protocolado sob o nº 2101/2010, utilizando 5 (cinco) cavalos, 120 (cento e vinte) cobaias e 10 (dez) coelhos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 16/02/2011.

We certify that the Research "Experimental infection of horses with *Rickettsia rickettsii* and evaluation of transmission to *Amblyomma cajennense* ticks", protocol number 2101/2010, utilizing 5 (five) horses, 120 (one hundred twenty) guinea pigs and 10 (ten) rabbits, under the responsibility Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 02/16/2011.

São Paulo, 17 de fevereiro de 2011

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP - Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
Fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: UENO, Tatiana Evelyn Hayama

Título: Infecção experimental de equinos por *Rickettsia rickettsii* e avaliação da transmissão para carrapatos *Amblyomma cajennense*

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

***A todas as mulheres, para quem o mundo realmente
é mais difícil***

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos pelo apoio. Chegar em casa é descansar.

Ao Prof. Dr. Marcelo Labruna pela oportunidade de cursar o Doutorado, pela transmissão de muitos conhecimentos e por me apresentar o mundo dos carrapatos.

À APTA – Pólo Regional Centro Norte – Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de São José do Rio Preto, pela concessão do afastamento com manutenção dos vencimentos, sem o qual não seria possível realizar a pós-graduação.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias: Aline, Amália, Andréa, Arlei, Chico, Danilo, Diego, Felipe, Fernanda, Gi, Herbert, Igor, João, Jonas, Júlia, Monize, Sol e Thiago.

Aos ex-Residentes Gustavo e Juliana.

Aos alunos “temporários” Edivaldo, Bruno e Lucas pelo auxílio com os cavalos.

Ao funcionário Washington pelo auxílio com os cavalos, pelos milhões de testes com colas e colares e pelo apoio nos momentos de raiva e desespero.

Aos funcionários do VPS Pedrinho, Marcos, Renatinho, Hilda, Sheila, Sueli, Danival, Virgínia e Cristina.

À funcionária Priscilla Melville pelo cultivo bacteriológico de material de cobaia.

Aos docentes (especialmente o Prof. Dr. Wilson Roberto Fernandes), funcionários, Residentes e pós-graduandos da Clínica Médica de Equinos pela disponibilização da baia de equinos, empréstimo de um equino para o experimento e por todo o auxílio durante o experimento em São Paulo.

Ao Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica pela disponibilização de suas instalações e reagentes e às técnicas Samantha, Maria Helena, Maria Luisa e Marli pelo treinamento nos exames hematológicos e realização dos testes bioquímicos.

À equipe do VPS de Pirassununga: Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, funcionários Ni, Seu Antonio, João e Ceíça e pós-graduandos pelos cuidados com os equinos, coletas de sangue e empréstimo de um equino para o trabalho.

Aos Médicos Veterinários e funcionários do Hovet de Pirassununga pelos cuidados e tratamentos dos equinos.

À APTA – Pólo Regional Vale do Paraíba – Pindamonhangaba pelo empréstimo de dois equinos para o trabalho.

Ao Instituto Biológico, especialmente à Pesquisadora Eliana Villalobos, pela realização dos exames de AIE.

A todos os equinos (Bacharel, Malaga, Índia e Cenzinho), cobaias e coelhos que involuntariamente participaram do trabalho.

Ao André, pelo companheirismo e paciência durante todos esses anos.

RESUMO

UENO, T. E. H. **Infecção experimental de equinos por *Rickettsia rickettsii* e avaliação da transmissão para carrapatos *Amblyomma cajennense*.** [Experimental infection of horses with *Rickettsia rickettsii* and evaluation of transmission to *Amblyomma cajennense* ticks]. 2014. 79 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Rickettsia rickettsii é uma bactéria intracelular obrigatória e agente etiológico da febre maculosa brasileira, uma grave enfermidade para humanos. Na América do Sul, o principal vetor para o agente é o carrapato *Amblyomma cajennense*. Alguns animais exercem um papel importante na manutenção da bactéria na natureza, uma vez que a mantêm em níveis altos na corrente sanguínea por alguns dias ou semanas, garantindo que novos carrapatos se infectem. Os equinos são um dos principais hospedeiros para *A. cajennense*, porém sua importância como hospedeiro amplificador de *R. rickettsii* ainda não havia sido estudada. Objetivou-se no presente trabalho detectar, em equinos experimentalmente infectados com *R. rickettsii*, possíveis alterações clínicas, ocorrência e duração de riquetsemia e ocorrência de transmissão da bactéria dos equinos para carrapatos *A. cajennense*, além de observar a curva de anticorpos IgG anti-*R. rickettsii* nestes animais. Para tanto, quatro equinos foram infectados com a amostra Taiaçu de *R. rickettsii*, sendo dois por meio de infestação com carrapatos *A. cajennense* infectados e dois por meio de inoculação intraperitoneal. Durante 30 dias, os animais foram examinados diariamente e amostras de sangue foram coletadas a cada dois dias para realização de hemograma, PCR em tempo real do sangue para detecção de *Rickettsia* e inoculação do sangue em cobaias. Adicionalmente, exames bioquímicos foram realizados a cada seis dias e RIFI para detecção de anticorpos IgG foi realizada até os animais se tornarem soronegativos. Para verificar a capacidade de transmissão para carrapatos, os equinos foram infestados com larvas, ninfas e adultos de *A. cajennense* não infectados. Após serem retirados dos equinos, estes carrapatos foram alimentados em coelhos e/ou testados pela PCR em tempo real e PCR convencional para detecção de *Rickettsia*. Os equinos não apresentaram sinais clínicos nem alterações significativas no hemograma e testes bioquímicos. Todas as amostras de sangue foram negativas na PCR em tempo real e nenhuma cobaia inoculada com sangue dos equinos apresentou sinais clínicos compatíveis com

infecção por *R. rickettsii*, nem soroconversão. Os equinos apresentaram anticorpos detectáveis a partir de 10 ou 12 dias pós-inoculação ou infestação e permaneceram soropositivos por no mínimo 177 dias. Nenhum coelho infestado com carrapatos previamente alimentados nos equinos apresentou sinais clínicos ou soroconversão após 21 dias da infestação. Apenas um carrapato, originário de um equino infectado via carrapatos infectados, foi positivo concomitantemente na PCR em tempo real e PCR convencional. Conclui-se que equinos experimentalmente infectados com uma amostra brasileira de *R. rickettsii* não apresentam alterações clínicas nem bacteremia detectável e transmitem a bactéria para uma quantidade ínfima de carrapatos, porém desenvolvem boa resposta humoral. Pode-se inferir que, em condições naturais, equinos não são importantes como hospedeiros amplificadores para *R. rickettsii*.

Palavras-chave: *Rickettsia rickettsii*. Equinos. Carrapatos. *Amblyomma cajennense*. Febre maculosa.

ABSTRACT

UENO, T. E. H. **Experimental infection of horses with *Rickettsia rickettsii* and evaluation of transmission to ticks *Amblyomma cajennense***. [Infecção experimental de equinos por *Rickettsia rickettsii* e avaliação da transmissão para carrapatos *Amblyomma cajennense*]. 2014. 79 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Rickettsia rickettsii is an obligate intracellular bacterium and the etiological agent of Brazilian spotted fever, a severe illness of humans. In South America, the main vector for the agent is the tick *Amblyomma cajennense*. Some animals play an important role in maintenance of the bacterium in nature, since they develop high levels of bacteremia for a few days or weeks, ensuring that new ticks become infected. Horses are one of the major hosts for *A. cajennense*, but its importance as an amplifier host for *R. rickettsii* had not yet been studied. This study aimed to evaluate possible clinical changes, the occurrence and duration of rickettsemia, and the occurrence of transmission of the bacterium from horses to *A. cajennense* ticks in horses experimentally infected with *R. rickettsii*, in addition to observe the kinetics of anti-*R. rickettsii* IgG antibodies. Therefore, four horses were infected with *R. rickettsii* strain Taiaçu, two by infestation with infected *A. cajennense* ticks and two by intraperitoneal injection. For 30 days, the animals were examined daily and blood samples were collected every two days for hemogram, real-time PCR of whole blood for the detection of *Rickettsia*, and inoculation of guinea pigs with blood. Additionally, biochemical tests were performed every six days and IFA test for detection of IgG antibodies was performed until the animals become seronegative. In order to verify the ability of the horses to transmit the infection to ticks, horses were infested with uninfected *A. cajennense* larvae, nymphs and adults. After being removed from horses, these ticks were fed on rabbits and/or tested by real-time PCR and conventional PCR. The horses showed no clinical signs or significant changes in the blood count and biochemical tests. All blood samples were negative in the real-time PCR and no guinea pig inoculated with the horse blood showed clinical signs consistent with infection by *R. rickettsii*, neither seroconversion. Horses had detectable antibodies from 10 or 12 days post-inoculation or infestation and remained seropositive for at least 177 days. None of the rabbits infested with ticks previously fed on the horses showed clinical signs or seroconversion after 21 days of

infestation. Only one tick fed on a horse infected by infected ticks was positive in the real-time PCR and conventional PCR. The results allows to conclude that horses, experimentally infected with a Brazilian strain of *R. rickettsii*, do not exhibit clinical changes or detectable bacteremia, and transmit the bacterium to a very small amount of ticks, but develop good humoral response. We can infer that horses are not important as amplifiers hosts for *R. rickettsii* under natural conditions.

Keywords: *Rickettsia rickettsii*. Horses. Ticks. *Amblyomma cajennense*. Spotted fever.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
3	OBJETIVOS.....	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	ANIMAIS	29
4.2	AMOSTRA DE <i>R. rickettsii</i>	30
4.3	COLÔNIA DE CARRAPATOS <i>A. cajennense</i>	31
4.3.1	Colônia não infectada	31
4.3.2	Colônia infectada.....	32
4.4	INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE EQUINOS POR <i>R. rickettsii</i>	33
4.5	HEMOGRAMA E BIOQUÍMICA SÉRICA	35
4.6	INOCULAÇÃO DE SANGUE EQUINO EM COBAIAS	36
4.7	AQUISIÇÃO DE <i>R. rickettsii</i> POR CARRAPATOS SUSCETÍVEIS	36
4.8	TESTE DE VIABILIDADE DE <i>R. rickettsii</i>	39
4.8.1	Teste de infectividade de carrapatos infectados.....	39
4.8.2	Teste de infectividade dos inóculos	41
4.9	RIFI.....	41
4.10	EXTRAÇÃO DE DNA.....	42
4.11	PCR.....	43
4.12	SEQUENCIAMENTO	45
5	RESULTADOS.....	47
5.1	EXAME CLÍNICO EQUINOS.....	47
5.2	HEMOGRAMA E BIOQUÍMICA SÉRICA EQUINOS	48
5.3	PCR EM TEMPO REAL SANGUE EQUINOS	50
5.4	INOCULAÇÃO DE SANGUE EQUINO EM COBAIAS	50
5.5	RIFI EQUINOS	50
5.6	AQUISIÇÃO DE <i>R. rickettsii</i> POR CARRAPATOS SUSCETÍVEIS	52
5.6.1	Infestação em coelhos	52
5.6.2	PCR carrapatos.....	53
5.7	TESTE DE VIABILIDADE DE <i>R. rickettsii</i>	54
6	DISCUSSÃO	60

7	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS.....	68

1 INTRODUÇÃO

A bactéria *Rickettsia rickettsii* é o agente etiológico da mais grave riquetsiose do mundo, conhecida como febre maculosa brasileira em nosso país e febre maculosa das Montanhas Rochosas nos Estados Unidos da América (EUA). Ela ocorre apenas no continente americano, abrangendo países das Américas do Norte, Central e do Sul (LABRUNA, 2009; PAROLA et al., 2013). No Brasil, a doença começou a ser relatada nos anos 20 na cidade de São Paulo (PIZA et al., 1931), depois os relatos ampliaram-se para outras cidades do estado de São Paulo e de outros estados (MAGALHÃES, 1952). Desde que a notificação obrigatória foi implantada, em 2001, a região Sudeste concentra a maior parte das notificações (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014a).

As infecções humanas ocorrem principalmente pela picada de carrapatos infectados, que são os vetores do agente (MCDADE; NEWHOUSE, 1986). No Brasil, os carrapatos *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma aureolatum* são os vetores já identificados, porém o primeiro é o responsável pelo maior número de casos (ANGERAMI et al., 2012). Os carrapatos também são considerados reservatórios para *R. rickettsii*, pois perpetuam a bactéria transestadialmente e realizam transmissão transovariana (MCDADE; NEWHOUSE, 1986). Entretanto, alguns fatores parecem diminuir a eficácia dos carrapatos como mantenedores do agente na natureza, como a baixa taxa de transmissão transovariana em algumas espécies (incluindo *A. cajennense*) e a patogenicidade que a bactéria exerce sobre o carrapato, evidenciada pela diminuição da fecundidade ou aumento da mortalidade de carrapatos infectados (BURGDORFER; BRINTON, 1975; NIEBYLSKI; PEACOCK; SCHWAN, 1999; SOARES et al., 2012). Assim, outro mecanismo contribui para garantir que novos carrapatos se infectem, isto é, a alimentação de carrapatos suscetíveis em animais vertebrados infectados que estejam no período de bacteremia, os quais são chamados de hospedeiros amplificadores (MCDADE; NEWHOUSE, 1986; LABRUNA, 2009). A descoberta de quais animais fazem parte do ciclo de manutenção da bactéria, então, torna-se muito importante para a compreensão da epidemiologia da enfermidade e a adoção de medidas de controle.

Nos EUA, pequenos mamíferos selvagens, como ratos, esquilos, lebres e gambás submetidos a infecções experimentais, apresentaram riquetsemia e/ou foram capazes de transmitir a infecção para carrapatos *Dermacentor andersoni* e

Dermacentor variabilis (BURGDORFER; FRIEDHOFF; LANCASTER, 1966; BOZEMAN et al., 1967; LUNDGREN; NICHOLAS; THORPE, 1968; GAGE; BURGDORFER; HOPLA, 1990). No Brasil, infecções experimentais demonstraram que capivaras e gambás exercem a função de hospedeiros amplificadores para carrapatos *A. cajennense*, pois desenvolvem bacteremia em nível suficiente para infectá-los (HORTA et al., 2009; SOUZA et al., 2009).

Equinos são um dos principais hospedeiros de *A. cajennense*, podendo ser parasitados por todos os estágios de vida do carrapato e sofrer infestações com alta carga parasitária (LABRUNA et al., 2002). Em regiões endêmicas para febre maculosa brasileira, é comum o encontro de altas porcentagens de equinos sorologicamente positivos para *R. rickettsii*, o que faz deles bons sentinelas para detecção da circulação da bactéria em uma determinada região (LEMONS et al., 1996; HORTA et al., 2004, 2007; VIANNA et al., 2008). No entanto, não estão disponíveis estudos que avaliem alterações clínicas em equinos infectados com isolados brasileiros e sua capacidade de desenvolver riquetsemia e transmitir a infecção para carrapatos *A. cajennense*.

Antes do advento dos antibióticos, alguns estudos foram feitos visando avaliar a ação preventiva ou curativa de soros hiperimunes coletados de animais ou humanos que haviam sobrevivido à infecção por *R. rickettsii* (HEINEMANN; MOORE, 1911, 1912; PARKER, 1933; MOREIRA; MAGALHÃES, 1934; TRAVASSOS; VALLEJO-FREIRE, 1943). Entre os animais nos quais foi produzido soro por meio de inoculação de antígeno vivo estão os equinos. Nestas infecções, foi observado que alguns equinos desenvolveram apenas febre de curta duração e bacteremia por um dia, porém não foram utilizados carrapatos nestes trabalhos (RICKETTS; GOMEZ, 1908; HEINEMANN; MOORE, 1911, 1912).

2 REVISÃO DA LITERATURA

Bactérias do gênero *Rickettsia* pertencem ao filo Proteobacteria, classe Alphaproteobacteria, ordem Rickettsiales e família Rickettsiaceae (GARRITY et al., 2005). O gênero é constituído por numerosas bactérias encontradas em vertebrados, artrópodes, medusas, sanguessugas, protozoários e plantas, sendo que algumas são patogênicas para seus hospedeiros, enquanto outras são apatogênicas ou têm patogenicidade desconhecida (WEINERT et al., 2009). Classicamente, as espécies de *Rickettsia* que infectam vertebrados são divididas em dois grupos, de acordo com reações sorológicas: grupo da febre maculosa (*R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. conorii*, *R. rhipicephali* e outras, totalizando mais de 20 espécies), tendo como vetores carrapatos em sua maioria, e o grupo tifo, que contém *R. prowazekii*, transmitida por piolhos, e *R. typhi*, transmitida por pulgas. *R. bellii* e *R. canadensis* não pertenceriam a nenhum dos dois grupos (RAOULT; ROUX, 1997). Com a descoberta de novas riquetsias e o uso de ferramentas moleculares, outras classificações têm sido propostas. Weinert et al. (2009), utilizando análise filogenética multigênica, obtiveram cinco grupos: grupo da febre maculosa (mesmas espécies da classificação tradicional), grupo tifo (*R. typhi* e *R. prowazekii*), grupo transicional (*R. akari*, *R. felis* e outras), grupo canadensis (*R. canadensis* e outras) e grupo bellii (*R. bellii* e outras).

Riquetsias são bactérias intracelulares obrigatórias que multiplicam-se no citoplasma de células eucarióticas de seus hospedeiros e, no caso do grupo da febre maculosa, podem ser encontradas também no núcleo da célula. São cocobacilos pequenos, com aproximadamente 0,3 x 1 µm e Gram negativos. A parede celular é constituída por lipopolissacarídeos com estrutura similar à de outras bactérias Gram negativas. Podem ser coradas por Giemsa e, quando coradas por Gimenez, retêm a fucsina básica (CHEN; SEXTON, 2008). O genoma é formado por um único cromossomo pequeno, circular e altamente conservado. Como conseguem retirar nutrientes do citoplasma da célula hospedeira, ao longo de sua evolução perderam genes que codificam enzimas para o metabolismo de açúcar, síntese de lipídios, aminoácidos e nucleotídeos (WALKER, 2007; CHEN; SEXTON, 2008). Possuem duas principais proteínas de superfície, OmpA, que está presente apenas no grupo da febre maculosa e OmpB, presente em todas as riquetsias. Estas e outras proteínas aderem-se a receptores específicos na membrana da célula hospedeira,

desencadeando uma série de eventos que leva à fagocitose da bactéria. Uma vez dentro do citoplasma, a riquetsia secreta enzimas que rompem a membrana fagossomal, deixando-a livre no citoplasma. A multiplicação é lenta e ocorre por fissão binária. A disseminação célula-a-célula no grupo da febre maculosa ocorre por um mecanismo que induz a célula hospedeira a polimerizar actina, que por sua vez será usada pelas riquetsias para deslocarem-se em direção ao núcleo ou células vizinhas (WALKER, 2007; CHEN; SEXTON, 2008).

Nos carrapatos, *R. rickettsii* multiplica-se em todos os tecidos (MCDADÉ; NEWHOUSE, 1986). Já nos vertebrados, esta bactéria tem preferência por células endoteliais de vasos sanguíneos pequenos e médios, onde multiplica-se e provoca vasculite, que é o mecanismo de base para a maioria das alterações clínicas e laboratoriais. Como consequência, quadros hemorrágicos e edematosos são comumente vistos em humanos e animais infectados (SAMMONS et al., 1976; CHEN; SEXTON, 2008). O principal efeito patofisiológico provocado por esta bactéria é o aumento da permeabilidade vascular, causada por ruptura da junção entre células endoteliais, formação de lacunas entre as células, formação de fibras de estresse e mudança do formato poligonal das células endoteliais para fusiforme. O mecanismo da lesão endotelial, entretanto, ainda não está completamente compreendido, e pode estar relacionado com liberação de espécies reativas de oxigênio, citocinas e ação de células T citotóxicas (WALKER, 2007).

Dentro do gênero, *R. rickettsii* é a espécie mais patogênica e agente etiológico da febre maculosa das Montanhas Rochosas nos Estados Unidos (PAROLA et al., 2013). A doença recebeu esse nome porque os primeiros casos foram detectados na região das Montanhas Rochosas, mas no Brasil, a enfermidade recebe o nome de febre maculosa brasileira - FMB (LABRUNA, 2009).

O primeiro relato escrito da doença em humanos foi feito em 1896 por Wood, com dados fornecidos por oito médicos que acompanharam casos em Idaho, no noroeste dos EUA (WOOD, 1896¹ apud WOLBACH, 1919), enquanto o primeiro relato em uma revista científica foi feita em 1899 por Maxey, que descreveu casos ocorridos no mesmo estado americano (MAXEY, 1899² apud RICKETTS, 1909). Há

¹ WOOD, W. W. **Spotted fever as reported from Idaho**. Report of the surgeon-general of the army to the Secretary of War, 1896.

² MAXEY, E. E. Some observations on the so-called spotted fever of Idaho. **Medical Sentinel**, v. 7, n. 10, Oct. 1899.

evidências, porém, de que a doença já ocorria em índios da região antes da chegada dos colonizadores (WOLBACH, 1919). De 1906 a 1909, Ricketts (1909) realizou uma série de experimentos que esclareceram vários pontos sobre a etiologia e epidemiologia da enfermidade que até hoje são válidos. Entre outras descobertas, ele observou que: o agente não passava por um filtro Berkefeld, ou seja, tinha tamanho suficiente para ser visualizado em microscópio óptico, o que ficou comprovado com a sua visualização no sangue de pacientes e animais infectados e em tecidos de carrapatos; o agente não se multiplicava em meios de cultivo tradicionais para bactérias; cobaias e macacos eram suscetíveis à infecção e apresentavam sinais clínicos, tornando-os modelos animais para isolamentos e infecções experimentais; os vetores eram carrapatos, que mantinham o agente por perpetuação transtadiária e transmissão transovariana; apesar do carrapato ser importante, o ciclo de transmissão dependia também de animais selvagens que seriam fontes de infecção para os carrapatos, como esquilos e marmotas; a infecção em humanos era acidental e desnecessária para a manutenção do agente no ambiente.

Mais tarde, Wolbach (1919) realizou vários estudos que esclareceram aspectos da patogenia da enfermidade. O autor observou que o agente da febre maculosa das Montanhas Rochosas era intracelular e multiplicava-se nas células endoteliais, ocasionando lesão do endotélio com consequente formação de trombos e necrose. Concluiu-se tratar de uma nova forma de microrganismo e nomeou-o *Dermacentroxenus rickettsi*. Em 1916, Rocha Lima nomeou o agente do tifo epidêmico de *Rickettsia prowazeki* em homenagem aos pesquisadores Ricketts e Prowazek, que haviam estudado a doença (ROCHA LIMA, 1916³ apud WOLBACH, 1919). Em 1922, Brumpt sugeriu que o agente da febre maculosa das Montanhas Rochosas fosse inserido no mesmo gênero do agente do tifo epidêmico e propôs nomeá-lo *Rickettsia rickettsi* (BRUMPT, 1922⁴ apud BENGTON, 1947).

No Brasil, a doença foi primeiramente descrita no meio científico por Piza (1931), que relatou casos ocorridos em 1929 na cidade de São Paulo, SP, denominando a enfermidade de tifo exantemático de São Paulo, porém há evidências de que a enfermidade já ocorria antes (MAGALHÃES, 1952). Depois,

³ ROCHA-LIMA, H. da. Zur Aetologie des Fleckfiebers. **Berliner Klinische Wochenschrift**, v. 53, n. 21, p. 567-569, Jan. 1916.

⁴ BRUMPT, E. **Précis de parasitologie**. 3. ed. Paris: Masson et cie. 1216 p.1922.

casos foram relatados em Minas Gerais, onde a enfermidade foi chamada de tifo exantemático de Minas Gerais (MOREIRA; MAGALHÃES, 1934), Rio de Janeiro (TOSTES; BRETZ, 1941), Goiás (MAGALHÃES, 1956), Bahia (MAGALHÃES, 1957) e Espírito Santo (SEXTON et al., 1993). Posteriormente, foram notificados casos em outros estados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014a). Com o isolamento do agente em São Paulo e Minas Gerais, foi possível a realização de vários estudos em animais que demonstraram a ocorrência de imunidade cruzada entre o microrganismo brasileiro e o da febre maculosa das Montanhas Rochosas, suspeitando-se de que se tratava da mesma riquetsia ou de que elas eram muito semelhantes (MONTEIRO, 1933-1934b,c; PARKER, 1933; TRAVASSOS; DIAS, 1939). Mais tarde, por meio de imunofluorescência, foram testadas reações cruzadas entre o antígeno brasileiro e anti-soros contra diversas riquetsias isoladas no mundo, chegando-se à conclusão de que o agente brasileiro era mesmo *R. rickettsii* (PHILIP et al., 1978). Libanio (1937) sugeriu que no Brasil a doença fosse chamada de febre maculosa brasileira.

Até o momento, *R. rickettsii* foi encontrada apenas na América, sendo detectada nos Estados Unidos (RICKETTS, 1909), Canadá (PAROLA et al., 2013), México (ORTIZ MARIOTTE; BUSTAMANTE; VARELA, 1944), Costa Rica (FUENTES, 1979), Panamá (RODANICHE; RODANICHE, 1950), Colômbia (PATINO; AFANADOR; PAUL, 1937), Argentina (RIPOLL et al., 1999) e Brasil (MONTEIRO, 1931).

A partir de 2001, a doença passou a ser de notificação obrigatória no Brasil. De 1997 a 2014, foram notificados casos em 16 estados brasileiros de todas as regiões (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014a), porém não é possível afirmar que todos os casos estão relacionados à *R. rickettsii*, uma vez que o diagnóstico é baseado em teste sorológico, o qual apresenta reação cruzada entre as espécies do gênero *Rickettsia* (PAROLA et al., 2013). A região Sudeste, especialmente o Estado de São Paulo, é responsável pelo maior número de casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014a). Geralmente os casos ocorrem de forma esporádica e isolada, porém há relatos de pacientes que viviam na mesma casa ou em casas vizinhas (DIAS; MARTINS, 1939).

Nos EUA, os vetores para esta bactéria são os carrapatos *Dermacentor andersoni*, *Dermacentor variabilis* e *Rhipicephalus sanguineus*; no Canadá, *D. andersoni*; no México, *R. sanguineus* e *A. cajennense*; no Panamá, Colômbia, Argentina e Brasil, *A. cajennense* (LABRUNA et al., 2011b; PAROLA et al., 2013).

No Brasil, *A. aureolatum* também é um vetor, porém até agora foi identificado como tal apenas na região metropolitana de São Paulo (LABRUNA, 2009). *R. rickettsii* já foi encontrada também em outros carrapatos, que necessitam ser melhor estudados para comprovar seu papel como vetores, como é o caso de *Amblyomma americanum* nos EUA, *Amblyomma imitator* no México, *Dermacentor nitens* no Panamá, *Haemaphysalis leporispalustris* na Costa Rica e *R. sanguineus* no Brasil (PAROLA et al., 2013).

No Brasil, *R. rickettsii* já foi isolada de *A. cajennense* de MG (MOREIRA; MAGALHÃES, 1935, 1936; DIAS; MARTINS, 1937; DIAS; MARTINS; RIBEIRO, 1937) e de SP (KRAWCZAK et al., 2014). Adicionalmente, esta bactéria também foi detectada por métodos moleculares em *A. cajennense* de MG (GUEDES et al., 2005, 2011).

A maior parte dos locais de ocorrência de FMB no Estado de São Paulo coincide com regiões de ocorrência de *A. cajennense*, podendo-se inferir que este carrapato é o principal responsável pelos casos no estado (SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2011).

O carrapato *A. cajennense* está presente apenas no continente americano e distribui-se do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina (entre as latitudes 27°N e 29°S), porém está ausente no Uruguai e parte do sul do Brasil, onde temperaturas mais baixas poderiam dificultar a sua sobrevivência (ESTRADA-PEÑA; GUGLIELMONE; MANGOLD, 2004). No Brasil, é encontrado preferencialmente em locais com temperaturas médias de 18 a 26°C (ESTRADA-PEÑA; GUGLIELMONE; MANGOLD, 2004), no bioma Cerrado em todas as suas fisionomias e em pastagens artificiais (LABRUNA et al., 2001; VERONEZ et al., 2010).

É um carrapato trioxeno com baixa especificidade para hospedeiros, principalmente os estágios de larva e ninfa, que podem parasitar grande diversidade de animais (ARAGÃO, 1936). Apesar disso, o carrapato parece ter predileção por alguns animais, como equinos, capivaras, antas e eventualmente suídeos silvestres, que são considerados os hospedeiros primários para todos os estágios de vida parasitária (LABRUNA et al., 2001; VERONEZ et al., 2010). Equinos podem ser encontrados naturalmente infestados por mais de 10000 carrapatos (LABRUNA et al., 2002). Presença de pastos com plantas invasoras, manejo sanitário e zootécnico insatisfatório, equinos criados em sistema extensivo e região com altitude menor que 400 m são fatores associados com o maior parasitismo por *A.*

cajennense em equinos (LABRUNA et al., 2001; PIRES et al., 2013). Outros animais que podem ser parasitados por este carrapato são: bovinos, cães, gatos, ovinos, caprinos, suínos, canídeos e felídeos selvagens, procionídeos, roedores, cervídeos, marsupiais, edentatas, lagomorfos domésticos e selvagens, morcegos, primatas, aves e répteis (ARAGÃO, 1936; ESTRADA-PEÑA; GUGLIELMONE; MANGOLD, 2004). Adicionalmente, é uma das espécies de carrapatos que mais infestam humanos no Brasil, podendo atacar o homem em massa (ARAGÃO, 1936; GUGLIELMONE et al., 2006).

Em seu ciclo de vida, este carrapato faz uma geração por ano na região Sudeste do Brasil, sendo que larvas predominam no outono/inverno, ninfas no inverno/primavera e adultos na primavera/verão (LABRUNA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2003). Esta sincronização dos estágios de vida é regulada por uma diapausa comportamental das larvas que, mesmo que tenham eclodido antes, “aguardam” até abril ou maio para iniciarem a busca por hospedeiros, subindo ao topo da vegetação. No Sudeste do país, mudanças no fotoperíodo e na temperatura entre o primeiro e segundo semestres são os fatores que controlam este comportamento (LABRUNA et al., 2002; CABRERA; LABRUNA, 2009). O período de maior ocorrência de casos de FMB coincide com o período de predominância de ninfas, mas as causas para esta constatação ainda são desconhecidas (DIAS; MARTINS, 1939; ANGERAMI et al., 2012). Soares et al. (2012) verificaram que ninfas e adultos têm maior capacidade de transmitir *R. rickettsii* do que larvas.

Recentemente, trabalhos têm mostrado que populações de *A. cajennense* originárias de diferentes regiões geográficas possuem também diferenças morfológicas e genéticas e ocupam nichos ecológicos distintos. Além disso, foi observado que estas populações apresentam incompatibilidade reprodutiva quando cruzadas entre si, gerando ovos não fertilizados (LABRUNA et al., 2011a; MASTROPAOLO et al., 2011). Beati et al. (2013), realizando estudo filogenético, verificaram que as populações são divididas em seis grupos geneticamente diferentes. O complexo *A. cajennense* foi então redescrito, sugerindo-se que os grupos pertenceriam às espécies *A. cajennense* sensu stricto, *A. interandinum*, *A. mixtum*, *A. patinoi*, *A. tonelliae* e *A. sculptum*, sendo que a última corresponde à espécie presente na região Sudeste do Brasil (NAVA et al., 2014). Não há dados disponíveis a respeito de possíveis diferenças na competência vetorial para *R. rickettsii* entre diferentes populações.

Os carrapatos são os reservatórios naturais para *R. rickettsii*, uma vez que podem manter a bactéria através de sucessivas gerações por perpetuação transtadial e transmissão transovariana (MCDADE; NEWHOUSE, 1986). Ambas as situações foram comprovadas em *A. cajennense* em vários trabalhos (MONTEIRO; FONSECA; PRADO, 1932; MONTEIRO; FONSECA, 1932; MONTEIRO, 1933-1934a, MAGALHÃES, 1952; SOARES et al., 2012). Este mecanismo, entretanto, não é suficiente para a manutenção da bactéria na natureza indefinidamente, já que alguns fatores diminuem sua eficácia, como a baixa taxa de transmissão transovariana observada em alguns carrapatos. Em *A. cajennense*, a transmissão transovariana ocorre em menos de 50% das fêmeas e, quando ocorre, a taxa de infecção filial varia de 10% a no máximo 80% (SOARES et al., 2012). Além disso, há evidências de que *R. rickettsii* é patogênica para o vetor, já que carrapatos *A. cajennense* infectados apresentam menor capacidade reprodutiva (SOARES et al., 2012) e carrapatos *D. andersoni* e *D. variabilis* apresentam menor sobrevivência (BURGDORFER; BRINTON, 1975; NIEBYLSKI; PEACOCK; SCHWAN, 1999). Estes fatores são corroborados pela prevalência frequentemente baixa de carrapatos *A. cajennense* naturalmente infectados, não chegando a 2%, mesmo em regiões endêmicas para febre maculosa (GUEDES et al., 2005; SANGIONI et al., 2005; PACHECO et al., 2009). Outra característica que contribui para a baixa prevalência em *A. cajennense* é que esta espécie é parcialmente refratária à infecção, pois apenas parte dos carrapatos que se alimentam em cobaias riquetsêmicas adquire o agente, ao contrário de *A. aureolatum*, no qual a taxa de infecção é próxima de 100% (LABRUNA et al., 2008; SOARES et al., 2012).

Portanto, para que a bactéria mantenha a circulação em uma determinada região, é necessário que haja a presença de hospedeiros vertebrados que apresentem um nível de bacteremia suficiente para infectar novos carrapatos suscetíveis (MCDADE; NEWHOUSE, 1986; LABRUNA, 2009).

Vários pesquisadores procuraram identificar quais animais participam do ciclo de manutenção de *R. rickettsii* na natureza. Para tanto, utilizaram como indicadores a detecção direta da bactéria ou detecção de anticorpos em animais naturalmente infectados, além de infecções experimentais para observar a suscetibilidade de determinadas espécies e sua capacidade de infectar carrapatos.

Nos EUA, riquetsias do grupo da febre maculosa, identificadas pelos autores como *R. rickettsii*, foram isoladas de órgãos e/ou sangue de diversos pequenos

mamíferos naturalmente infectados: rato-do-campo *Microtus pennsylvanicus*, rato-do-algodão *Sigmodon hispidus*, camundongo-de-patas-brancas *Peromyscus* spp, rato-do-pinheiro *Microtus pinetorum*, esquilos *Citellus lateralis tescorum* e *Eutamias amoenus*, tapiti-da-Flórida *Sylvilagus floridanus*, lebre-sapato-de-neve *Lepus americanus* e gambá *Didelphis virginiana* (GOULD; MIESSE, 1954; SHIRAI et al., 1961; BURGDORFER et al., 1962; BOZEMAN et al., 1967).

As primeiras inoculações em animais selvagens foram realizadas por Ricketts (1909), que observou que esquilos e marmotas podiam adquirir a infecção de carrapatos infectados e transmiti-la a outros carrapatos. Lundgren e Thorpe (1966) realizaram infecções experimentais em várias espécies de ratos e esquilos selvagens dos EUA dos gêneros *Peromyscus*, *Dipodomys*, *Thomomys*, *Onychomys*, *Neotoma*, *Microtus*, *Reithrodontomys*, *Eutamias*, *Spermophilus* e *Ammospermophilus* e observaram bacteremias a partir do 1º dia pós-inoculação, com duração variando de 3 a 11 dias e persistência da riquetsia nos órgãos até no máximo 21 dias pós-inoculação. A maioria dos animais teve sinais clínicos moderados. Anticorpos foram detectados até 6 meses pós-inoculação no rato-da-montanha (*Microtus montanus nanus*) e pelo menos até 11 meses no rato-da-madeira-do-deserto (*Neotoma lepida lepida*). Outro trabalho experimental demonstrou que o rato-do-algodão *Sigmodon hispidus* apresentou riquetsemia apenas no 1º dia pós-inoculação, apesar de a bactéria ser encontrada nos órgãos do 1º ao 19º dia. Os anticorpos perduraram por no mínimo 10 meses (SHIRAI et al., 1967). Já Gage, Burgdorfer e Hopla (1990) observaram, na mesma espécie de roedor, bacteremia durando de 2 a 6 dias pós-inoculação, sendo que, quando larvas de *D. variabilis* eram alimentadas neste rato, infectavam-se em taxas variando de 0,9% a 64% dependendo do dia em que caíam (apenas as que caíram até o 9º dia pós-inoculação foram positivas para *R. rickettsii*). Nos dois trabalhos, os ratos-do-algodão tiveram infecções inaparentes. Burgdorfer, Friedhoff e Lancaster (1966) infectaram esquilo-terrestre-da-Columbia (*Citellus columbianus columbianus*), esquilo-terrestre-de-capa-dourada (*Citellus lateralis tescorum*), camundongo-das-pradarias (*Microtus* spp) e lebre-sapato-de-neve (*Lepus americanus*) via infestação com carrapatos *D. andersoni* infectados. Ao mesmo tempo, nestes animais também foram colocadas larvas de *D. andersoni* suscetíveis, as quais apresentaram taxas de infecção de 95,2%, 86,6%, 84% e 18% nas respectivas espécies animais (considerando-se apenas o período de pico de riquetsemia), evidenciando a

importância das três primeiras como fontes de infecção para os carrapatos. Como nos demais trabalhos, estes animais apresentaram alterações clínicas moderadas. Em outro experimento com lagomorfos inoculados, o tapiti *Sylvilagus audubonni arizonae* apresentou ricketsemia intermitente do 6º ao 30º dia pós-inoculação, maior que a observada em lebres *Lepus californicus*, que apresentaram bacteremia do 1º ao 6º dia (LUNDGREN; NICHOLAS; THORPE, 1968).

Lundgren, Thorpe e Haskell (1966) inocularam algumas espécies de aves com *R. rickettsii*, e observaram que galinhas apresentaram bacteremia do 6º ao 10º dia pós-inoculação, pombos domésticos do 2º ao 14º e faisões (*Phasianus colchicus*) do 4º ao 16º, enquanto corvos (*Corvus corax*), gralhas (*Pica pica*), gaviões quiriquirei (*Falco sparverius*), gaviões de cauda vermelha (*Buteo jamaicensis*) e tartaranhões azulados (*Circus cyaneus*) não apresentaram bacteremia ou esta foi detectada apenas em um dia. Nenhuma ave apresentou sinais clínicos e anticorpos persistiram em pombos até 6 meses pós-inoculação.

No Brasil, *R. rickettsii* foi isolada do sangue de um gambá *Didelphis aurita* de MG (MOREIRA; MAGALHÃES, 1935), do cérebro de gambás *D. aurita* e *D. albiventris* de SP (TRAVASSOS, 1937), do cérebro de uma preá (*Cavia aperea*) e de um coelho-do-mato (*Sylvilagus brasiliensis*) de MG (MOREIRA; MAGALHÃES, 1937) e do sangue de um cão de MG (MAGALHÃES, 1952). Já foram tentados isolamentos de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*), cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*), teiús (*Tupinambis teguixin*), tatus galinha (*Dasypus novemcinctus*), lagartos (*Anolis punctatus*), caxinguelês (*Sciurus pyrrhonotus*), camundongos (*Mus musculus*) e ratos (*Rattus norvegicus* e *Rattus rattus*), sem sucesso (MOREIRA; MAGALHÃES, 1935; TRAVASSOS; VALLEJO, 1942).

Por enquanto, capivaras e gambás foram os únicos animais em que comprovou-se, por infecções experimentais, o papel de hospedeiros amplificadores de *R. rickettsii* para carrapatos *A. cajennense* no Brasil (HORTA et al., 2009; SOUZA et al., 2009). Travassos e Vallejo (1942a,b) foram os primeiros a infectarem capivaras e verificarem sua capacidade de transmitir o agente para carrapatos *A. cajennense* suscetíveis. Os animais apresentaram bacteremia do 5º até pelo menos o 11º dia pós-inoculação e riquetsias nos órgãos até pelo menos 15 dias pós-inoculação. Em outro trabalho, capivaras mantiveram ricketsemia contínua do 6º ao 18º dia pós-inoculação, foram capazes de transmitir a bactéria para 20 a 35% dos carrapatos e apresentarem sorologia positiva até pelo menos 4 meses pós-infecção,

porém não mostraram sinais clínicos (SOUZA et al., 2009). Moreira e Magalhães (1935) inocularam gambás *Didelphis marsupialis* com órgãos de cobaias infectadas e, apesar de não verificarem sinais clínicos nos animais, conseguiram recuperar a bactéria dos órgãos. Horta et al. (2009), por meio de infecção experimental de gambás *Didelphis aurita*, demonstraram que eles podem se comportar como hospedeiros amplificadores, porém de forma menos efetiva que as capivaras, já que apresentaram ricketsemia intermitente de 2 a 30 dias pós-infecção e somente 5 a 20% dos carrapatos que se alimentaram nos gambás infectaram-se. Os animais não apresentaram sinais clínicos e com 6 meses pós-infecção ainda eram soropositivos.

Infecção experimental de cães mostrou que eles são suscetíveis à *R. rickettsii* e apresentam sinais clínicos, alterações hematológicas, ricketsemia com duração de 3 a 13 dias e anticorpos que perduram por pelo menos 6 meses pós-inoculação (PIRANDA et al., 2008). Estes cães foram capazes de transmitir a bactéria para carrapatos *R. sanguineus* em níveis que variaram de acordo com o estágio do carrapato e via de inoculação. Cães inoculados via intraperitoneal foram capazes de transmitir a bactéria para 15,2% das larvas, 37,9% das ninfas e 100% dos adultos, enquanto aqueles inoculados via infestação por carrapatos *Amblyomma aureolaum* infectados transmitiram o agente para 7,1% das larvas, 35,8% das ninfas e 100% dos adultos (PIRANDA et al., 2011).

Outros animais já foram infectados experimentalmente, como cachorro-dormido, gato maracajá, quati, paca, cutia, caxinguelê, *Rattus norvegicus*, *Rattus rattus*, morcegos, pombo doméstico, carneiro e gato doméstico, dos quais a bactéria foi isolada a partir do sangue ou órgãos após alguns dias, porém a transmissão para carrapatos não foi avaliada (MONTEIRO, 1931; MOREIRA; MAGALHÃES, 1935; MAGALHÃES, 1952). Por outro lado, não se conseguiu a recuperação da bactéria em alguns animais inoculados, como furão, tatu e galinha (MONTEIRO, 1931; MAGALHÃES, 1952).

Em equinos, levantamentos sorológicos no Brasil encontraram altas porcentagens de equinos positivos para *R. rickettsii* em regiões endêmicas, com valores comumente superiores aos observados para cães e humanos (quadro 1); já em regiões não endêmicas, as frequências de equinos positivos são usualmente menores (quadro 2). Devido a esta boa resposta humoral, o equino pode ser utilizado como sentinela para o microrganismo, denunciando a circulação da bactéria em regiões onde o carrapato *A. cajennense* seja o vetor (HORTA et al., 2004).

Quadro 1 - Ocorrência de anticorpos anti-*R. rickettsii* em equinos de localidades com notificação de FMB

Município	Nº animais positivos/ nº animais testados	Fonte:
Pedreira, SP	7/9 (77,8%)	LEMOS et al. (1996)
Pedreira, SP	17/22 (77,3%)	HORTA et al. (2004)
Pedreira, SP Mogi das Cruzes, SP Piracicaba, SP São Paulo, SP	18/20 (90%) 2/5 (40%) 17/20 (85%) 7/19 (36,8%)	HORTA et al. (2007)
Caratinga, MG	3/18 (16,7%)	CARDOSO et al. (2006)
Itabira, MG	11/11 (100%)	VIANNA et al. (2008)
Pindo d'Água, MG Santa Cruz do Escalvado, MG	16/42 (38,1%) 10/66 (15,2%)	MILAGRES et al. (2010)
Juiz de Fora, MG	16/39 (41%)	PACHECO et al. (2011)
Colatina, Ecoporanga, Nova Venécia, Santa Leopoldina, São Mateus e Vila Valério, ES	7/27 (25,9%)	SPOLIDORIO et al. (2010)
São José dos Pinhais, PR	7/75 (9,3%)	FREITAS et al. (2010)

Quadro 2 - Ocorrência de anticorpos anti-*R. rickettsii* em equinos de localidades onde não havia notificação de FMB até o momento em que os trabalhos foram realizados

Local	Nº animais positivos/ nº animais testados	Fonte:
Porto Feliz, Cotia e Pirassununga, SP	0/47	SANGIONI et al. (2005)
Pirassununga, SP	4/21 (19%)	HORTA et al. (2007)
Almirante Tamandaré, PR	6/71 (8,5%)	BATISTA et al. (2010)
Londrina, PR	15/273 (5,5%)	TAMEKUNI et al. (2010)
Londrina, PR	10/26 (38,5%)	TOLEDO et al. (2011)
Douradina, Umuarama e Arapongas, PR	15/284 (5,3%)	OTOMURA et al. (2010)

Não há relatos de doença causada por *R. rickettsii* em equinos naturalmente infectados, nem isolamentos a partir do sangue ou órgãos destes animais. Inoculações experimentais de equinos por diversas vias (intravenosa, subcutânea, intraperitoneal) com sangue ou órgãos infectados de diferentes origens (cobaia, macaco, humano) demonstraram que hipertermia foi a única alteração clínica desenvolvida, ainda assim em apenas parte dos animais. Naqueles que apresentaram febre, ela teve início a partir do 3º ou 4º DPI e duração de 2 a 4 dias, com picos de 39,7°C a 40,9°C (RICKETTS, 1907; HEINEMANN; MOORE, 1911, 1912). O sangue de alguns equinos foi coletado durante os dias de febre e inoculado

em cobaias, mostrando-se infectivo apenas no dia em que a temperatura alcançou o valor máximo. Os autores concluíram que a concentração de riquetsias no sangue dos equinos era muito baixa, e que uma quantidade suficiente para infectar cobaias estava presente apenas no dia do pico da febre (HEINEMANN; MOORE, 1911, 1912). Animais reinoculados não apresentaram febre após a segunda inoculação, mostrando que haviam adquirido imunidade (RICKETTS, 1907; HEINEMANN; MOORE, 1911, 1912). Estes estudos também buscaram testar se o soro de equinos recuperados de uma infecção poderia ter efeito preventivo ou curativo em cobaias infectadas. Observou-se que o soro dos equinos tinha efeito apenas se administrado nos primeiros dias da infecção e que, neste período, conferia praticamente o mesmo grau de proteção que o soro de cobaias convalescentes. A eficácia era aumentada se o soro fosse aplicado em maior quantidade, se fosse concentrado e se o equino doador fosse inoculado duas vezes (RICKETTS; GOMEZ, 1908; HEINEMANN; MOORE, 1911, 1912). Estes soros chegaram a ser utilizados em pacientes humanos, porém os resultados não foram conclusivos (HEINEMANN; MOORE, 1911, 1912). Nestes trabalhos, não foi testada a inoculação dos equinos via infestação de carrapatos infectados, nem foi verificada a possibilidade de carrapatos suscetíveis adquirirem a bactéria dos equinos. Assim, o papel do equino como hospedeiro amplificador do agente ainda não está esclarecido.

Além da suscetibilidade ao agente e capacidade de infectar carrapatos, deve-se levar em conta um conjunto de informações epidemiológicas para que um animal seja considerado um hospedeiro amplificador eficiente para *R. rickettsii*. Assim, o animal deve atender aos seguintes requisitos (LABRUNA, 2009):

- ser abundante na área endêmica para *R. rickettsii*;
- ser hospedeiro primário para o carrapato vetor;
- ser suscetível à infecção por *R. rickettsii*;
- desenvolver ricketsemia em um nível e duração suficientes para infectar o carrapato vetor que se alimentar nele;
- ser prolífico, para que ocorra continuamente introdução de filhotes suscetíveis (animais que nunca entraram em contato com a bactéria) na região

A sintomatologia da febre maculosa das Montanhas Rochosas e da FMB é semelhante, porém no Brasil a doença humana parece ser mais severa e a

letalidade, maior (ANGERAMI et al, 2006). Antes do desenvolvimento dos antibióticos, a letalidade era de aproximadamente 80% em São Paulo e Minas Gerais (DIAS; MARTINS, 1939). Nos últimos 5 anos, a letalidade no Estado de São Paulo variou de 40% a 55% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014b). Comparando-se, porém, uma região na Grande São Paulo onde o carrapato *A. aureolatum* é o vetor, com uma região no interior do estado onde *A. cajennense* é o vetor, observa-se que a letalidade é maior na primeira (ANGERAMI et al., 2012). Causas para estas diferenças regionais ainda são desconhecidas (ANGERAMI et al., 2012).

Em humanos, os sinais clínicos mais comuns são: febre, mialgia, hemorragias, dor de cabeça, exantema, icterícia, alterações do sistema nervoso central, vômito, dor abdominal, dificuldade respiratória e insuficiência renal aguda. As alterações hematológicas e bioquímicas mais frequentemente encontradas são trombocitopenia e aumento das enzimas hepáticas alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase (ANGERAMI et al, 2006).

Entre os animais em que foram observadas alterações clínicas por meio de infecções experimentais estão o cão (KEENAN et al., 1977; PIRANDA et al., 2008), primatas (RICKETTS, 1909; SAMMONS et al., 1976), coelho doméstico (WOLBACH, 1919; MOREIRA; MAGALHÃES, 1935; MAGALHÃES, 1952), cobaia (RICKETTS, 1909; MAGALHÃES, 1952; MOE et al., 1976), preás (TRAVASSOS; VALLEJO, 1942a) e ratos *Microtus montanus nanus* (LUNDGREN; THORPE, 1966), *Microtus pennsylvanicus* (GAGE; BURGDORFER; HOPLA, 1990) e *Microtus pinetorum* (EREMEEVA et al., 2003).

Cães são menos suscetíveis em relação a primatas, podendo frequentemente desenvolver sinais moderados e evoluir para a cura espontânea. Apesar disso, ambos podem apresentar anorexia, febre, letargia, emagrecimento, desidratação, aumento de linfonodos, hiperemia, petéquias e equimoses em mucosas e pele, saco escrotal com hiperemia, edema, petéquias, máculas, necrose ou úlceras, epidídimo e prepúcio edemaciados, secreção ocular, congestão de esclera, conjuntivite, hemorragias oculares, uveíte, opacidade de córnea, quemose, secreção nasal, tosse, epistaxe, broncopneumonia, oligúria ou anúria, constipação, melena, convulsão, inclinação de cabeça, coma, pulso acelerado, hipotermia, cianose e choque (SAMMONS et al., 1976; KEENAN et al., 1977; PIRANDA et al., 2008). As alterações hematológicas e bioquímicas encontradas incluem diminuição da contagem de hemácias, concentração de hemoglobina e volume globular,

trombocitopenia, leucopenia no início da enfermidade evoluindo para leucocitose com desvio à esquerda, neutrofilia, linfopenia, eosinopenia, monocitose, granulação tóxica em neutrófilos, aumento de enzimas hepáticas (fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase), aumento de bilirrubinas, colesterol, ureia e creatinina e queda da proteína total (SAMMONS et al., 1976; KEENAN et al., 1977; PIRANDA et al., 2008).

Cobaias são o modelo animal preferencial para *R. rickettsii*, pois são muito suscetíveis, apresentam alta letalidade e manifestam alterações clínicas características, como febre, necrose de escroto, coxins e ponta de orelha, hiperemia e hemorragia cutâneas, lesões oculares, trombocitopenia e congestão esplênica (RICKETTS, 1909; MAGALHÃES, 1952; MOE et al., 1976). Coelhos domésticos apresentam menor letalidade quando comparados às cobaias, mas também podem ser utilizados como modelo animal, uma vez que demonstram os mesmos sinais clínicos (WOLBACH, 1919; MOREIRA; MAGALHÃES, 1935; MAGALHÃES, 1952).

3 OBJETIVOS

Considerando-se a falta de dados a respeito da suscetibilidade de equinos à infecção por *R. rickettsii* e sua competência como hospedeiros amplificadores do agente para carrapatos *A. cajennense*, objetiva-se no presente trabalho:

- detectar possíveis alterações clínicas em equinos experimentalmente infectados com *R. rickettsii*;
- verificar a ocorrência e duração da riquetsemia nestes animais;
- observar a curva de anticorpos IgG anti-*R. rickettsii* nestes animais;
- detectar a ocorrência de transmissão da bactéria dos equinos para carrapatos *A. cajennense*

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados quatro equinos adultos para o experimento, sendo dois machos e duas fêmeas, com idades entre 15 e 25 anos, provenientes dos municípios paulistas de Pindamonhangaba, Pirassununga e São Paulo (quadro 3). Os equinos foram selecionados preferencialmente em regiões onde nunca houve notificação de febre maculosa brasileira para minimizar a chance de encontrar animais que tenham tido contato anterior com a bactéria e estivessem previamente imunizados. Dentre os municípios de origem dos animais, apenas São Paulo já registrou casos de febre maculosa em humanos. O equino 2 era mantido ora em São Paulo, ora em Pirassununga, sendo este último município o local em que o animal se encontrava quando foi selecionado para o experimento. Os demais equinos nunca haviam saído de seus municípios de origem.

Quadro 3 - Equinos utilizados e distribuição nos grupos experimentais

Equino	Instituição de procedência	Município de Procedência	Sexo	Raça	Grupo experimental	Via de inoculação
1	APTA ^a	Pindamonhangaba, SP	Macho	Mestiço	G1	infestação com carrapatos
2	FMVZ-USP ^b	Pirassununga e São Paulo, SP	Fêmea	Mestiço	G1	infestação com carrapatos
3	APTA	Pindamonhangaba, SP	Fêmea	Mestiço	G2	intraperitoneal
4	FMVZ-USP	Pirassununga, SP	Macho	Mestiço	G2	intraperitoneal

^a APTA - Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios

^b FMVZ-USP - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Fonte: UENO (2014)

Os animais foram transportados para o Hospital Veterinário (HOVET) da FMVZ – USP, onde permaneceram confinados em baia individual com cama de serragem até completarem 30 dias de experimento (período de infestação com carrapatos), recebendo água à vontade, feno e ração.

Antes do início do experimento, ao menos duas amostras de soro de cada equino, colhidas com intervalo de 15 dias, foram submetidas à reação de

imunofluorescência indireta (RIFI) frente aos antígenos de *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyommii*, *R. rhipicephali*, *R. felis* e *R. bellii*. O experimento foi iniciado apenas depois que se constatou que todas as amostras eram negativas para todos os antígenos.

Na fase pré-experimento, os animais também foram banhados com produto carrapaticida à base de deltametrina a 0,025 mg/ml para eliminar carrapatos adquiridos em seus locais de origem, sendo respeitado um intervalo de tempo mínimo até o início do experimento, correspondente ao período residual indicado na bula. Adicionalmente, foram realizados exame clínico, hemograma, bioquímica sérica e contagem de OPG (ovos por grama de fezes) para verificação da higidez dos equinos.

Devido à disponibilidade de apenas uma baia, o trabalho foi realizado com um equino por vez, sendo que um equino só entrava na baia para o início do experimento quando o animal anterior já havia sido retirado.

Após 30 dias de experimento (ao término das infestações), os equinos foram banhados novamente com carrapaticida para eliminar qualquer carrapato que porventura ainda estivesse fixado aos animais e, em seguida, foram transportados para o campus da USP em Pirassununga, onde foram mantidos em piquetes coletivos recebendo água à vontade, ração, feno e silagem. Os animais permaneceram no local até o fim do experimento para coletas periódicas de sangue visando o acompanhamento sorológico. Neste campus, os animais entraram em contato com carrapatos do local e, para assegurar que não havia circulação de *R. rickettsii* entre estes carrapatos, outros equinos que estavam sendo mantidos nos mesmos piquetes há pelo menos um ano foram submetidos à RIFI para *R. rickettsii* e demonstraram soronegatividade, inferindo-se que a circulação da bactéria não estava ocorrendo na população de carrapatos do local.

Para a prova biológica, foram adquiridas cobaias albinas (*Cavia porcellus*) de um criadouro comercial com peso aproximado entre 400 e 600 g, as quais foram alojadas em caixas plásticas individuais com água à vontade, ração e capim verde.

Os coelhos domésticos (*Oryctolagus cuniculus*) utilizados no trabalho eram animais albinos da raça Nova Zelândia pesando entre 1,8 e 2,2 kg e provenientes de criador comercial. Durante o experimento, permaneceram em gaiolas individuais recebendo água à vontade e ração própria para a espécie.

4.2 AMOSTRA DE *R. rickettsii*

A amostra de *R. rickettsii* utilizada no experimento foi a amostra Taiaçu, isolada originalmente de carrapato *Amblyomma aureolatum* de Mogi das Cruzes, SP (PINTER; LABRUNA, 2006). Esta amostra está sendo mantida no Laboratório de Doenças Parasitárias da FMVZ – USP através de duas linhagens, uma por meio de passagens consecutivas em cobaias e outra em cultivo celular (células Vero). A linhagem mantida em cobaias, sem qualquer passagem prévia em cultivo celular, por ser a que provavelmente melhor conserve a virulência da bactéria, foi a utilizada nas infecções experimentais. Ricketts (1909) conseguiu manter uma amostra de *R. rickettsii* dos EUA por mais de 200 passagens em cobaias sem perda da virulência. A linhagem mantida em cultivo celular, por sua vez, foi utilizada como antígeno para a RIFI.

Para o preparo do inóculo (utilizado tanto nos equinos e cobaias do experimento, quanto para passagens em novas cobaias), cobaias previamente infectadas com *R. rickettsii* foram anestesiadas e sacrificadas em câmara de gás carbônico no segundo ou terceiro dia de febre e, em seguida, alíquotas de baço, fígado, pulmão e cérebro foram coletadas e armazenadas em criotubos a -80°C até a utilização. No momento das inoculações experimentais, alíquotas de cada órgão eram descongeladas à temperatura ambiente, misturadas, maceradas com cadinho e pistilo estéreis e diluídas em caldo BHI (brain heart infusion). O macerado (inóculo) era então imediatamente injetado por via intraperitoneal nos equinos ou cobaias (volume de 18 ml e 3 ml, respectivamente).

4.3. COLÔNIA DE CARRAPATOS *A. cajennense*

Em fevereiro de 2011, carrapatos adultos de *A. cajennense* (geração F₀) foram coletados por meio de arraste de flanela no município de Pedreira, SP, região endêmica para febre maculosa. Este local foi escolhido para garantir que a população de carrapatos utilizada no experimento fosse suscetível à *R. rickettsii*. A partir dos indivíduos coletados, foram formadas as colônias não infectada e infectada em laboratório.

4.3.1 Colônia não infectada

Os carrapatos foram sequencialmente alimentados em coelhos e mantidos em estufas BOD a 25°C com aproximadamente 85% de umidade, até serem obtidos larvas, ninfas e adultos. Foram utilizadas as gerações F₁, F₂ e F₃ no experimento. Para garantir que a colônia não estivesse naturalmente infectada, todos os coelhos utilizados para a alimentação dos carrapatos foram testados pela RIFI para a presença de anticorpos contra seis riquetsias (*R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyommii*, *R. rhipicephali*, *R. bellii* e *R. felis*) antes e após 21 dias da infestação. Além disso, as fêmeas F₁ e F₂, após oviposição, foram submetidas à PCR (reação em cadeia pela polimerase) em tempo real para o gene citrato sintase (*gltA*) de *Rickettsia* para comprovação de ausência de infecção. Um dos coelhos utilizados veio a óbito 13 dias após a infestação sem apresentar sinais clínicos compatíveis com febre maculosa. À necropsia, foi observada obstrução gástrica por tricobezoar e a PCR em tempo real do fígado, baço e pulmão mostrou-se negativa para *Rickettsia*, assim como a RIFI para as seis riquetsias do soro coletado no dia do óbito, evidenciando que os carrapatos não estavam infectados. Todos os demais coelhos não apresentaram qualquer sinal clínico e foram negativos na RIFI. Todas as quenóginas também foram negativas na PCR em tempo real.

4.3.2 Colônia infectada

Para a formação da colônia infectada, três cobaias (cobaias 1, 2 e 3) foram inoculadas por via intraperitoneal com macerado de órgãos contendo *R. rickettsii* e, no mesmo dia, larvas F₁ não infectadas de *A. cajennense* foram colocadas dentro de câmaras de infestação fixadas ao dorso das cobaias para alimentarem-se. A temperatura retal das cobaias foi aferida diariamente. As larvas ingurgitadas foram recolhidas diariamente, acondicionadas em recipientes diferentes de acordo com a data da queda e colocadas em estufa BOD para realização de muda para ninfas. Das ninfas resultantes das mudas, 60 foram testadas individualmente pela PCR em tempo real para detecção de *Rickettsia*, verificando-se taxas de infecção variando de zero a 40% de acordo com o dia da queda, com média de 8,3% (tabela 1).

Tabela 1 - PCR em tempo real para *Rickettsia* spp em ninfas de *A. cajennense* infectadas experimentalmente na fase de larva, de acordo com o dia de desprendimento das larvas de três cobaias infectadas

Nº cobaia	Nº ninfas positivas/nº ninfas testadas				Total
	4º DPI*	5º DPI	6º DPI	7º DPI	
Cobaia 1	1/5 (20%)	1/5 (20%)	0/5	0/5	2/20 (10%)
Cobaia 2	2/5 (40%)	1/5 (20%)	0/5	0/5	3/20 (15%)
Cobaia 3	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20
Total	3/15 (20%)	2/15 (13,3%)	0/5	0/5	5/60 (8,3%)

*DPI: dia pós-inoculação da cobaia

Fonte: UENO (2014)

Na sequência, três novas cobaias (cobaias 4, 5 e 6) foram inoculadas intraperitonealmente com macerado de órgãos contendo *R. rickettsii* e infestadas no mesmo dia com ninfas correspondentes às larvas que haviam caído no 4º e 5º DPI (dia pós-inoculação) das primeiras cobaias. O segundo grupo de cobaias, do mesmo modo que o primeiro, teve as temperaturas retais aferidas diariamente. As ninfas ingurgitadas foram recolhidas e colocadas em estufa BOD para realização de muda, acondicionadas em recipientes diferentes de acordo com a cobaia em que se alimentaram e o dia de queda. Foram descartadas as ninfas cuja queda ocorreu antes do primeiro dia de febre das cobaias. Os carrapatos que se alimentaram na cobaia 4 também foram descartados, pois este animal veio a óbito sem apresentar febre. Após a muda, uma amostra de 49 adultos (testados individualmente) foi submetida à PCR em tempo real para detecção de *Rickettsia*, resultando em porcentagens de infecção que variaram de 20% a 100% de acordo com a data de queda e 89,8% na média (tabela 2). Para as infecções experimentais, foram utilizados apenas os carrapatos adultos originários de recipientes com 100% de positividade.

Tabela 2 - PCR em tempo real para detecção de *Rickettsia* spp em adultos de *A. cajennense* infectados experimentalmente nas fases de larva e ninfa, de acordo com o dia de desprendimento das ninfas após inoculação de duas cobaias

Nº cobaia	Nº adultos positivos/nº adultos testados						Total
	4º DPI*	5º DPI	6º DPI	7º DPI	8º DPI	9º DPI	
Cobaia 5		4/5 (80%)	5/5 (100%)	4/4 (100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)	23/24 (95,8%)
Cobaia 6	1/5 (20%)	5/5 (100%)	8/8 (100%)	7/7 (100%)			21/25 (84%)
Total	1/5 (20%)	9/10 (90%)	13/13 (100%)	11/11 (100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)	44/49 (89,8%)

*DPI: dia pós-inoculação da cobaia

Fonte: UENO (2014)

Das seis cobaias, cinco apresentaram febre com início variando entre 3 e 6 DPI e duração de 1 a 4 dias, seguida por um período de temperatura normal ou

hipotermia. Uma cobaia apresentou hipotermia durante todo o período de avaliação. As seis cobaias vieram a óbito 4 a 10 DPI. As cobaias 4, 5 e 6 foram necropsiadas para coleta de alíquotas de fígado, baço e pulmão, as quais foram testadas pela PCR em tempo real direcionada para o gene citrato sintase de *Rickettsia*, que revelou positividade em todas as amostras.

4.4. INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE EQUINOS POR *R. rickettsii*

Os quatro equinos foram divididos em dois grupos experimentais (G1 e G2) com dois animais cada (quadro 3).

No grupo 1, duas câmaras de infestação de carrapatos foram fixadas em cada equino (figuras 2 e 3). As câmaras foram confeccionadas em tecido de algodão e coladas à pele tricotomizada do animal na região paravertebral dorsal (uma câmara de cada lado da coluna vertebral). No dia 0 do experimento, 60 carrapatos adultos (30 machos e 30 fêmeas) da colônia infectada de *A. cajennense* foram colocados em uma das câmaras. A câmara de infestação era aberta diariamente para coleta de fêmeas ingurgitadas que haviam desprendido-se naturalmente. Em média, 24 dias após os carrapatos terem sido colocados, todos os machos e eventualmente fêmeas que não haviam ingurgitado foram retirados da pele dos animais.

No grupo 2, em cada equino apenas uma câmara de infestação foi fixada (somente em um lado do corpo do animal). No dia 0 do experimento, cada equino foi inoculado por via intraperitoneal com 18 ml do inóculo de *R. rickettsii*. Antes da inoculação, a região abdominal dos animais foi tricotomizada e submetida à rigorosa antisepsia com iodo povidine e álcool 70% para evitar o desenvolvimento de peritonite.

Em ambos os grupos, após a infestação ou inoculação os animais foram examinados diariamente durante 30 dias, quando os seguintes parâmetros foram avaliados: estado de consciência do animal, condição corporal, ingestão de água e alimento, frequências respiratória e cardíaca, temperatura retal, turgor de pele, pulso, coloração das mucosas, tempo de perfusão capilar e aumento de linfonodos (RADOSTITS; MAYHEW; HOUSTON, 2000). O intervalo considerado normal para a temperatura retal foi de 37°C a 39°C (SPEIRS; WRIGLEY, 1997), para a frequência respiratória 8 a 16 movimentos/minuto e para a frequência cardíaca 28 a 46 batimentos/minuto (RADOSTITS; MAYHEW; HOUSTON, 2000).

Durante o mesmo período, amostras de sangue foram coletadas dos equinos por punção da veia jugular, utilizando-se sistema Vacutainer®, a cada 2 dias, começando pelo dia 0 (total de 16 amostras por equino). Para cada dia de coleta, as alíquotas de sangue foram assim distribuídas: sangue total em tubo com EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) para hemograma e detecção de *Rickettsia* por PCR em tempo real; sangue total em tubo com heparina para inoculação em cobaias; sangue em tubo com ativador de coágulo para separação de soro e pesquisa de anticorpos anti-*R. rickettsii* pela RIFI. Testes bioquímicos foram realizados com os soros a cada 6 dias.

Após os 30 dias de experimento, o sangue continuou a ser coletado a cada 7 dias até 128 DPI (dias pós-infestação ou pós-inoculação), e depois em intervalos de 7 a 42 dias para acompanhamento da curva de anticorpos dos animais, até que eles se tornassem negativos.

No equino 4, foi feita tentativa de punção do linfonodo pré-crural guiada por ultrassonografia no 10º DPI, visando a pesquisa de *R. rickettsii*, porém não houve sucesso na coleta devido à dificuldade de contenção do animal e fixação do linfonodo.

4.5 HEMOGRAMA E BIOQUÍMICA SÉRICA

O hemograma foi realizado manualmente segundo Feldman, Zinkl e Jain (2000) para a obtenção dos seguintes valores: número de hemácias/ μ l, hematócrito, concentração de hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), número de leucócitos totais/ μ l, número diferencial de leucócitos/ μ l e número de plaquetas/ μ l. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaço sanguíneo corado por Rosenfeld e examinado em microscópio óptico com aumento de 1000x. Os resultados foram comparados com os valores de referência de Feldman, Zinkl e Jain (2000) para hematimetria e Jain (1993) para leucometria e plaquetometria.

Os testes bioquímicos foram realizados no Laboratório Clínico da FMVZ-USP utilizando-se kits comerciais (DiaSys Diagnostic Systems, Holzheim, Alemanha; BioSystems S. A., Barcelona, Espanha; Randox Laboratories Ltd., Crumlin, Irlanda do Norte), segundo recomendações dos fabricantes. As leituras foram feitas no

analisador automático Labmax 240® (Labtest Diagnóstica S. A., Lagoa Santa, Brasil). Foram quantificadas as concentrações séricas dos seguintes elementos, que podem indicar possíveis alterações na função renal ou hepática: ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), gama glutamil transferase (GGT), bilirrubina direta, bilirrubina indireta, bilirrubina total, proteína total e albumina. As concentrações encontradas foram comparadas com os valores de referência de Kaneko, Harvey e Bruss (1997) e Meyer e Harvey (2004).

4.6 INOCULAÇÃO DE SANGUE EQUINO EM COBAIAS

Imediatamente após cada coleta de sangue dos equinos, duas cobaias foram inoculadas por via intraperitoneal com 500 µl de sangue heparinizado cada uma, totalizando 32 cobaias por equino, sendo que duas foram inoculadas no dia 0, antes das inoculações/infestações e serviram como controle. Diariamente, as cobaias foram examinadas para observação de sinais clínicos e aferição da temperatura retal. O animal era considerado febril quando a temperatura ultrapassasse 40°C (HILLYER; QUESENBERRY, 1997). Após 21 dias da inoculação, as cobaias foram anestesiadas com quetamina e xilazina para coleta de sangue por punção cardíaca. Os soros destes animais foram então submetidos à RIFI para *R. rickettsii* para verificação de soroconversão. Se algum animal viesse a óbito antes dos 21 dias, este era necropsiado e porções de baço, fígado, pulmão e cérebro eram coletadas e armazenadas a -20°C para posterior realização de PCR em tempo real para detecção de *Rickettsia* spp. Se fosse possível a coleta de sangue cardíaco após o óbito, a RIFI para seis antígenos de *Rickettsia* também era realizada. Foram utilizadas cobaias para a prova biológica porque elas são consideradas os melhores modelos animais para *R. rickettsii* (MONTEIRO, 1931; MAGALHÃES, 1952).

4.7 AQUISIÇÃO DE *R. rickettsii* POR CARRAPATOS SUSCETÍVEIS

Para verificar se carrapatos suscetíveis poderiam adquirir a bactéria dos equinos infectados, os animais do grupo 1, no 2º DPI, foram infestados na segunda câmara com aproximadamente 1000 larvas, 200 ninfas e 20 adultos (10 fêmeas e 10 machos) de carrapatos *A. cajennense* não infectados. Esta infestação, na mesma câmara e com a mesma quantidade de carrapatos, foi repetida nos dias 7, 12, 17 e

22 pós-infecção, totalizando cinco infestações com carrapatos não infectados por animal.

No grupo 2, os equinos foram infestados no dia 0 com aproximadamente 1000 larvas, 200 ninfas e 20 adultos (10 fêmeas e 10 machos) de carrapatos *A. cajennense* não infectados. Esta infestação foi repetida nos dias 5, 10, 15 e 20 pós-inoculação na mesma câmara, totalizando cinco infestações com carrapatos não infectados por animal. Neste grupo, os carrapatos foram colocados no mesmo dia da inoculação porque já foi observado em cobaias, capivaras e cães que o período de incubação ou a bacteremia iniciavam-se mais precocemente quando a via de infecção era intraperitoneal, comparada com a infecção via carrapatos (MONTEIRO, 1933-1934a; PIRANDA et al., 2008; SOUZA et al., 2009).

Nos dois grupos, a câmara de infestação que recebeu os carrapatos não infectados foi aberta diariamente para recolhimento de larvas, ninfas e fêmeas ingurgitadas, as quais foram colocadas em estufa BOD a 25°C com aproximadamente 85% de umidade relativa para realização de muda para ninfas, muda para adultos e oviposição, respectivamente. Após 30 dias da infecção, todos os machos e outros estádios que ainda estivessem fixados eram retirados da pele dos equinos e armazenados a -20°C até que fossem testados pela PCR em tempo real para detecção de *Rickettsia*. As fêmeas, ao término da oviposição, também foram congeladas para serem submetidas à PCR em tempo real posteriormente. Para verificar a ocorrência de transmissão transestadial, a viabilidade de *R. rickettsii* nos carrapatos possivelmente infectados e a capacidade destes carrapatos em transmitir a infecção para outro animal, ninfas e adultos resultantes das mudas foram alimentados em coelhos (dois coelhos para cada equino), sendo que o primeiro recebeu os carrapatos que haviam se desprendido do equino até o 15º DPI, e o segundo, os que haviam se soltado ou sido retirados do 16º ao 30º DPI. Os carrapatos foram colocados dentro de câmaras de infestação de algodão coladas ao dorso dos coelhos. Apenas para o equino 1, uma parte das ninfas e adultos foi separada para realização de PCR em tempo real, enquanto outra parte foi colocada nos coelhos. Para os demais equinos, devido ao baixo número de carrapatos recuperados, todas as ninfas e adultos foram depositados nos coelhos. Os procedimentos realizados com os carrapatos não infectados alimentados nos equinos estão descritos na figura 1.

Os coelhos tiveram a temperatura retal aferida diariamente durante 21 dias e seus soros foram submetidos à RIFI para seis riquetsias antes e após 21 dias da infestação para verificação de soroconversão. A temperatura máxima considerada normal foi de 40°C (HILLYER; QUESENBERRY, 1997). As câmaras de infestação foram inspecionadas diariamente para recuperação de ninfas e fêmeas ingurgitadas. Machos eram retirados apenas quando todas as fêmeas tivessem se desprendido. Se porventura alguma fêmea não tivesse ingurgitado até 15 dias após a infestação, ela era retirada juntamente com os machos nesta data. Após a coleta, os machos e eventuais fêmeas não ingurgitadas foram congelados a -20°C para posteriormente serem testados pela PCR em tempo real, enquanto ninfas e fêmeas ingurgitadas foram incubadas em estufa para realizarem muda e oviposição, respectivamente. Os adultos resultantes da muda das ninfas, assim como as fêmeas ao término da oviposição, foram armazenados a -20°C para serem testados posteriormente pela PCR em tempo real para detecção de *Rickettsia*.

Caso algum carrapato demonstrasse positividade na PCR em tempo real (tanto os que se alimentaram apenas nos equinos, quanto aqueles que se alimentaram nos equinos e coelhos), este era submetido à PCR convencional para o gene *ompA* e, se fosse novamente positivo, era submetido à PCR convencional para o gene citrato sintase. Procedia-se então ao sequenciamento de ambos os genes e comparação com sequências depositadas no GenBank para confirmação da espécie de *Rickettsia*.

Figura 1 - Procedimentos realizados com carrapatos não infectados alimentados nos equinos infectados para verificação da aquisição de *R. rickettsii* por carrapatos suscetíveis

Fonte: UENO (2014)

4.8 TESTE DE VIABILIDADE DE *R. rickettsii*

4.8.1 Teste de infectividade de carrapatos infectados

Para confirmação da presença e viabilidade de riquetsias na colônia de carrapatos infectados, para cada equino do grupo 1 infestado com carrapatos infectados, um coelho foi infestado concomitantemente com 5 casais de carrapatos desta colônia. Para esta prova, foram utilizados coelhos ao invés de cobaias porque carrapatos adultos de *A. cajennense* não se alimentam adequadamente em cobaias (SOARES, 2011). Como são suscetíveis à *R. rickettsii* e apresentam os mesmos sinais clínicos que cobaias, coelhos também podem ser utilizados como modelo biológico (WOLBACH, 1919; MOREIRA; MAGALHÃES, 1935; MAGALHÃES, 1952).

Os coelhos foram examinados diariamente quanto à presença de sinais clínicos e foram submetidos à RIFI para seis riquetsias antes e após 21 dias da

infestação para verificação de soroconversão. Se houvesse óbito neste período, o animal era necropsiado e porções de baço, fígado e pulmão eram submetidos à extração de DNA e à PCR em tempo real para comprovação da presença de *Rickettsia* spp. Após a infestação, os carrapatos alimentados nos coelhos também foram submetidos à PCR em tempo real para detecção do agente.

Para verificar a presença e viabilidade de *R. rickettsii* nos carrapatos infectados que efetivamente foram utilizados nos equinos do grupo 1, fêmeas ingurgitadas recuperadas dos equinos foram colocadas em estufa BOD a 25°C para realizarem oviposição. Ao término da oviposição, foram submetidas ao teste da hemolinfa (BURGDORFER, 1970) e em seguida armazenadas a -80°C. Machos e fêmeas não ingurgitadas foram submetidos ao teste da hemolinfa logo após serem retirados dos equinos e também congelados a -80°C. As lâminas de hemolinfa foram coradas pelo método de Gimenez (GIMENEZ, 1964) e lidas em microscópio óptico sob aumento de 1000x.

Entre os carrapatos que apresentaram formas compatíveis com *Rickettsia* no teste de hemolinfa, seis (três de cada equino) foram selecionados para isolamento da bactéria pela técnica de “shell vial”, técnica descrita por Marrero e Raoult (1989) para isolamento de *Rickettsia* em cultivo celular a partir de sangue humano e adaptada por Labruna et al. (2004) para isolamento a partir de carrapatos. Os mesmos carrapatos também foram utilizados para isolamento em cobaias. Para tanto, os carrapatos foram retirados do freezer a -80°C, lavados com álcool iodado e água mQ e macerados individualmente em microtubos tipo eppendorf contendo 1 ml de meio BHI. De cada macerado, 500 µl foram adicionados em dois tubos “shell vial” contendo uma monocamada de células Vero (250 µl por tubo), e 500 µl foram inoculados por via intraperitoneal em uma cobaia. O material restante do macerado (partes do carrapato) foi submetido à PCR em tempo real direcionado para o gene *gltA* e, caso fosse positivo, era submetido à PCR convencional para os genes *gltA* e *ompA* e sequenciamento.

Os tubos shell vial foram acompanhados a cada três dias por meio da visualização em microscópio óptico de lâminas com conteúdo das garrafas coradas pelo método de Gimenez. Quando houvesse visualização de formas compatíveis com *Rickettsia* e no mínimo 80% das células estivessem infectadas, as células eram transferidas para garrafas de cultivo de 25 cm² contendo uma monocamada de células Vero. As garrafas foram acompanhadas a cada três dias e, quando

apresentassem no mínimo 80% de células infectadas, os cultivos eram submetidos à extração de DNA e PCR em tempo real para o gene *gltA*. Se a reação fosse positiva, as amostras eram testadas pela PCR convencional para os genes *gltA* e *ompA* e os fragmentos amplificados sequenciados para confirmação de isolamento de *R. rickettsii*. As células infectadas também foram fixadas em lâmina de vidro e submetidas à RIFI frente a um soro de cobaia sabidamente positivo para *R. rickettsii* na diluição 1:64.

As cobaias inoculadas com o macerado de carrapato foram examinadas diariamente durante 21 dias e, se apresentassem hipertermia neste período, eram sacrificadas no terceiro dia de febre para realização de necropsia e coleta de amostras de fígado, baço, pulmão e cérebro. Sangue total com anticoagulante também era coletado por punção cardíaca no mesmo dia. O sangue e os órgãos foram submetidos à PCR em tempo real para detecção de *Rickettsia* spp. Caso fossem positivos, eram submetidos à PCR convencional para os genes *gltA* e *ompA* e posterior sequenciamento e comparação com sequências depositadas no GenBank para determinação da espécie de *Rickettsia*. Se as cobaias não apresentassem febre, após 21 dias da inoculação era realizada RIFI para *R. rickettsii*.

Para determinar a porcentagem de infecção entre os carrapatos infectados utilizados nos equinos, todos os demais carrapatos conservados a -80°C que não foram utilizados no isolamento foram descongelados e submetidos à PCR em tempo real para detecção de *Rickettsia*. Aqueles que se mostrassem negativos, eram submetidos à PCR convencional direcionada para a subunidade 16S do ribossomo mitocondrial de carrapatos para confirmação da presença de DNA na amostra, conforme realizado por Soares et al. (2012).

4.8.2 Teste de infectividade dos inóculos

No grupo 2 (equinos inoculados com órgãos de cobaias infectadas), o mesmo macerado de órgãos preparado para os equinos foi inoculado em cobaias por via intraperitoneal (2 a 3 ml/cobaia). Três cobaias foram utilizadas como controle do inóculo do equino 3, e duas como controle do inóculo do equino 4. As cobaias correspondentes ao equino 3 foram inoculadas imediatamente após o equino. Das cobaias relativas ao equino 4, uma foi inoculada antes do equino, e outra após.

Devido à necessidade de assepsia rigorosa e à dificuldade de localização do espaço peritoneal em equinos, despendia-se um tempo de 30 a 40 minutos entre o término do preparo do macerado e a efetiva inoculação nos equinos. Assim, as cobaias foram inoculadas em tempos diferentes para observar se havia diferença de virulência entre o inóculo imediatamente após o preparo e após vários minutos.

As cobaias foram examinadas diariamente até 21 dias pós-inoculação, quando foi realizada a RIFI para observação de soroconversão. Se o animal viesse a óbito dentro deste período, os órgãos eram submetidos à extração de DNA e PCR em tempo real para detecção de *Rickettsia* spp, e o soro era submetido à RIFI se fosse possível a coleta de sangue após o óbito.

4.9 RIFI

A reação de imunofluorescência indireta foi realizada segundo Philip et al. (1976), utilizando-se lâminas contendo como antígeno bactérias inteiras de *R. rickettsii* amostra Taiaçu, *R. parkeri* amostra At24, *R. amblyommii* amostra Ac37, *R. rhipicephali* amostra HJ#5 e *R. bellii* amostra Mogi, cultivadas em células Vero, e de *R. felis* amostra Pedreira, cultivada em célula de mosquito C6/36. Como anticorpo secundário, foi utilizado conjugado comercial anti-IgG equina, anti-IgG de cobaia ou anti-IgG de coelho (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA).

Os soros dos equinos foram submetidos à RIFI para os seis antígenos antes da infecção e, após a infecção, foram testados inicialmente apenas para *R. rickettsii*. Depois, alguns dias ao longo da infecção foram selecionados para serem testados frente aos demais antígenos, visando observar possíveis reações cruzadas e comparar os títulos obtidos para cada antígeno. Os pontos selecionados foram: dia 0, primeiro dia de soropositividade do animal, dia em que o título alcançou o pico para *R. rickettsii*, algum dia na fase de queda do título e último dia em que o animal foi detectado positivo (apenas nos equinos acompanhados até se tornarem soronegativos).

Todos os coelhos utilizados no trabalho foram testados frente aos seis antígenos, antes e após 21 dias da infestação ou após óbito.

As cobaias não foram testadas sorologicamente antes das inoculações ou infestações devido ao risco de óbito provocado pela coleta de sangue por punção cardíaca. RIFI para *R. rickettsii* foi realizada nestes animais após 21 dias das

inoculações ou após óbito e, caso o resultado fosse positivo, o soro era testado para os demais antígenos.

Os soros foram testados inicialmente na diluição 1:64 e, se apresentassem positividade, eram diluídos sucessivamente na base 2 e testados novamente para a determinação do título final.

Soros controles positivo e negativo de equino, cobaia ou coelho foram adicionados em cada lâmina.

A leitura foi feita em microscópio de fluorescência (Olympus BX53, Tóquio, Japão) com aumento de 400x.

4.10 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA do sangue total dos equinos e cobaias e dos órgãos de coelhos e cobaias que vieram a óbito foi realizada utilizando-se o kit comercial DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com instruções do fabricante.

A extração de DNA dos carrapatos foi realizada individualmente para cada carrapato, segundo protocolo de Sangioni et al. (2005), utilizando-se solução de isotiocianato de guanidina-fenol. Os macerados de carrapatos e os cultivos celulares com isolados de *R. rickettsii* relacionados ao teste de viabilidade da bactéria foram extraídos da mesma forma.

Para cada 11 amostras, um controle negativo, que recebeu todos os reagentes com exceção da amostra, foi adicionado.

As amostras de DNA extraído foram armazenadas a -20°C até o seu processamento.

4.11 PCR

A PCR em tempo real, empregada para detecção de *Rickettsia* spp em sangue, órgãos, carrapatos e cultivo celular, foi realizada segundo Labruna et al. (2004) baseada no sistema TaqMan®. Foram utilizados um par de oligonucleotídeos iniciadores (primers), CS5 e CS6, direcionados para o gene citrato sintase (*gltA*) e uma sonda interna fluorogênica 5' 6-FAM d(CATTGTGCCATCCAGCCTACGGT) BHQ-1 3', posicionada 76 pares de bases após o iniciador senso e 3 pares de bases

antes do iniciador anti-senso. Cada reação foi preparada para um volume total de 25 µl, contendo tampão 1x, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM deoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs), 0,6 pmol/µl de cada primer, 0,03 U/µl de DNA polimerase, 0,1 pmol/µl de sonda, 11,6 µl de água mQ e 2,5 µl de DNA. As reações foram realizadas no aparelho 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) sob as seguintes condições: 50°C por 2 minutos, depois 95°C por 10 min, em seguida 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min.

Em cada corrida foram adicionados um controle positivo (DNA de *R. parkeri* amostra NOD) e três controles negativos (um controle de extração, um controle contendo todos os reagentes da PCR e água mQ no lugar da amostra e outro contendo apenas os reagentes da PCR).

A PCR em tempo real é um teste bastante sensível, capaz de detectar 1 cópia de DNA de *R. rickettsii* (LABRUNA et al., 2004). Como esta prova detecta todas as espécies do gênero *Rickettsia*, ela foi utilizada como triagem e, caso alguma amostra apresentasse positividade, era submetida à PCR convencional direcionada para o gene *ompA*, que detecta riquetsias do grupo da febre maculosa. Esta reação, por sua vez, foi realizada segundo Regnery, Spruill e Plikaytis (1991) e Roux, Fournier e Raoult (1996), utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores 190.70 e 190.701. Os reagentes foram calculados para um volume final de 25 µl, que continha: tampão 1x, 2 mM MgCl₂, 0,25 mM de cada dNTP, 0,6 pmol/µl de cada primer, 0,03 U/µl de DNA polimerase, 10,85 µl de água mQ e 2,5 µl de DNA. As reações foram processadas em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany), com as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 40 s, pareamento a 58°C por 30 s e extensão a 65°C por 45 s, com extensão final a 72°C por 10 min. Controles positivo e negativo foram adicionados em cada corrida da mesma maneira já descrita para PCR em tempo real.

As amostras foram consideradas positivas apenas quando se revelassem positivas simultaneamente na PCR em tempo real para o gene *gltA* e na PCR convencional para o gene *ompA*.

Para a confirmação da espécie de *Rickettsia* nas amostras positivas, os produtos de PCR para os genes *gltA* e *ompA* foram sequenciados. Como o fragmento amplificado na PCR em tempo real para o gene *gltA* é muito pequeno

(147 pares de bases), o sequenciamento deste gene foi realizado a partir de uma PCR convencional, que gera um fragmento de 401 pares de bases.

A PCR convencional para o gene *gltA* foi realizada conforme Labruna et al. (2004), utilizando-se os iniciadores CS78 e CS323 e adicionando-se em cada reação, para um volume total de 25 µl: tampão 1,6x, 1,5 mM MgCl₂, 0,125 mM de cada dNTP, 0,5 pmol/µl de cada primer, 0,03 U/µl de DNA polimerase, 12,6 µl de água mQ e 2,5 µl de DNA. As condições da reação foram as seguintes: desnaturação inicial de 95°C por 5 min, em seguida 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s, pareamento a 50°C por 30 s e extensão a 72°C por 30 s, com extensão final a 72°C por 7 min.

Carrapatos negativos na PCR em tempo real foram submetidos à PCR convencional para a subunidade 16S do ribossomo mitocondrial de carrapatos, que amplifica DNA de todos os carrapatos. Se o resultado fosse positivo, considerava-se que o DNA na amostra estava presente e íntegro e que, portanto, o resultado da PCR em tempo real era válido. Se o resultado fosse negativo, considerava-se que a extração de DNA não tinha sido eficaz e a amostra era retirada do cálculo final. Para esta PCR, foram utilizados os iniciadores 16S+1 e 16S-1 segundo Black e Piesman (1994). Em cada reação foram adicionados os seguintes reagentes: tampão 1x, 2 mM MgCl₂, 0,25 mM de cada dNTP, 0,6 pmol/µl de cada primer, 0,03 U/µl de DNA polimerase, 10,85 µl de água mQ e 2,5 µl de DNA, totalizando um volume de 25 µl. O termociclador foi programado para uma temperatura inicial de 94°C por 3 min, seguida por 10 ciclos de 94°C por 30 s, 48°C por 30 s e 72°C por 40 s, depois 15 ciclos de 94°C por 30 s, 50°C por 30 s e 72°C por 40 s, e por último 10 ciclos de 94°C por 30 s, 55°C por 30 s e 72°C por 40 s, com extensão final a 72°C por 7 min.

Todos os oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão listados no quadro 4.

Quadro 4 - Oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) utilizados para amplificação de DNA de *Rickettsia* spp e carrapato

Gene	Par de “primer”	Sequência (5' → 3')	Tamanho do fragmento amplificado	Referência
<i>gltA</i>	CS5 CS6	GAGAGAAAATTATATCCAAATGTTGAT AGGGTCTTCGTGCATTTCTT	147 pb*	LABRUNA et al., 2004
<i>gltA</i>	CS78 CS323	GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT	401 pb	LABRUNA et al., 2004
<i>ompA</i>	190.70 190.701	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA GTTCCGTTAATGGCAGCATCT	632 bp	REGNERY; SPRUILL; PLIKAYTIS, 1991 ROUX; FOURNIER; RAOULT, 1996
16S rDNA	16S+1 16S-1	CTGCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGTGG CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT	460 pb	BLACK; PIESMAN, 1994

*pb: pares de bases

Fonte: UENO (2014)

Os produtos das PCR convencionais foram analisados em eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Os géis foram corados com SYBR® Safe (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA) no momento do preparo e visualizados sob luz ultravioleta no fotodocumentador Alphamager® (ProteinSimple, Santa Clara, Califórnia, EUA).

4.12 SEQUENCIAMENTO

Os fragmentos de DNA amplificado dos genes *gltA* e *ompA* foram purificados utilizando-se o produto ExoSAP® (Affymetrix, Santa Clara, Califórnia, EUA), de acordo com instruções do fabricante.

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando-se o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), conforme instruções do fabricante. Cada reação foi preparada para um volume final de 10 µl, contendo 2 µl de tampão “Save Money”, 1 µl de primer, 1 µl de dNTP + ddNTP – dideoxinucleotídeos trifosfatados (BigDye), 1 µl de água mQ e 5 µl de DNA purificado. O DNA foi precipitado com isopropanol e etanol e sequenciado pelo método Sanger no aparelho ABI 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA).

As sequências foram analisadas quanto à qualidade no programa Phred (Embrapa, Brasília, Brasil) e editadas no programa BioEdit (Biosciences, Carlsbad, Califórnia, EUA). Em seguida, foram alinhadas no programa BLAST (US National

Library of Medicine, Bethesda, Maryland, EUA) para comparação com sequências depositadas no GenBank.

Figura 2 - Equino do grupo 1 com câmara de infestação colada no lado direito do corpo e colar cervical - São Paulo - 2012

Fonte: UENO (2014)

Figura 3 - Equino do grupo 1 com câmara de infestação colada no lado esquerdo do corpo e colar cervical - São Paulo - 2012

Fonte: UENO (2014)

5. RESULTADOS

5.1 EXAME CLÍNICO EQUINOS

Todos os equinos apresentaram frequências respiratórias ligeiramente acima do valor de referência durante praticamente todos os 30 dias de avaliação, inclusive no dia 0, em exame realizado antes da infestação ou inoculação, podendo-se depreender que estas eram as frequências normais para os animais. A frequência cardíaca mostrou-se acima da referência apenas no 3º DPI no equino 1 e nos dias 5, 25 e 29 pós-infecção no equino 2, o que pode ser atribuído a um eventual estado de agitação dos animais no momento do exame.

Quanto à temperatura retal (gráfico 1), apesar de nenhum animal ter demonstrado valores acima do valor de referência, o equino 1 apresentou temperatura acima de 38°C no 3º e 4º DPI e o equino 4, no 3º DPI, representando um aumento de 0,7°C em relação às temperaturas observadas no dia 0 para estes equinos. Já o equino 2 apresentou temperatura acima de 38°C nos dias 5, 6 e 7 pós-infecção, representando um aumento de 1,2°C em relação à temperatura do dia 0. O equino 3 apresentou diferença no máximo de 0,5°C entre a temperatura aferida no dia 0 e a maior temperatura observada após a inoculação.

Não houve alterações para os demais parâmetros observados.

O equino 3 apresentou diarreia profusa com 350 DPI, evoluindo para emagrecimento progressivo e emaciação, sendo que após duas semanas não conseguiu mais levantar-se e foi eutanasiado (não foi realizada necropsia). Pode-se afirmar que este fato não está relacionado à inoculação, pois a febre maculosa caracteriza-se por uma doença aguda sem desenvolvimento de cronicidade ou estado de latência, enquanto o animal apresentou o problema quase um ano após a inoculação, e os sinais clínicos não eram compatíveis com febre maculosa.

Gráfico 1 - Temperatura retal de equinos infectados experimentalmente com *R. rickettsii*, durante 30 dias de acompanhamento - São Paulo - 2011-2013

Fonte: UENO (2014)

5.2 HEMOGRAMA E BIOQUÍMICA SÉRICA EQUINOS

A contagem de hemácias teve valores discretamente mais baixos que os de referência no 2º DPI no equino 1, no 4º DPI no equino 4 e nos dias 0, 4, 10, 14, 24 e 26 pós-infecção no equino 2 (gráfico 2). Como os valores foram no máximo 7% inferiores à referência, e o equino 2 apresentou diminuição já no dia 0, estes dados provavelmente não têm significado clínico. O equino 3 apresentou CHCM tanto acima quanto abaixo dos valores de referência ao longo do período de exame, porém as diferenças em relação à referência foram ínfimas. Os demais parâmetros hematimétricos mostraram-se dentro da referência em todos os animais.

As contagens de leucócitos totais ficaram dentro dos limites de referência para todos os equinos (gráfico 3), no entanto houve uma discreta tendência de aumento a partir do 18º DPI. O equino 1 apresentou aumento de 32% a 48% na contagem de leucócitos entre os dias 18 e 22 pós-infecção em relação ao observado no dia 0, o equino 2 apresentou aumento de mais de 30% no 6º, 18º, 20º e 30º DPI e o equino 4 apresentou aumento de 30% no 18º DPI e de 40% no 26º DPI. Apenas o equino 3 apresentou um aumento máximo de 12% no 22º DPI.

As contagens de linfócitos foram discretamente inferiores ao limite de referência em quase todos os dias de coleta de sangue do equino 1, inclusive no dia 0.

A contagem de plaquetas mostrou-se normal para todos os equinos (gráfico 4).

A dosagem de ureia apresentou-se levemente acima da referência nos dias 0, 18 e 24 da infecção para o equino 2, enquanto valores pouco abaixo da referência foram obtidos no dia 24 pós-infecção do equino 3 e nos dias 0, 6, 12, 18 e 24 do equino 4. Os equinos 2 e 3 apresentaram concentrações de creatinina abaixo da referência em dias esparsos ao longo do período de avaliação, inclusive no dia 0.

As concentrações de AST e GGT estavam dentro ou abaixo da referência em todos os equinos. As dosagens de bilirrubinas também situavam-se dentro dos parâmetros normais.

As dosagens de proteína total estavam normais para todos os animais, e a concentração de albumina encontrava-se discretamente acima da referência no 18º e 30º DPI do equino 2.

Gráfico 2 - Contagem de eritrócitos em equinos infectados experimentalmente com *R. rickettsii*, durante 30 dias de acompanhamento - São Paulo - 2011-2013

Região hachurada representa o intervalo de referência

Fonte: UENO (2014)

Gráfico 3 - Contagem de leucócitos em equinos infectados experimentalmente com *R. rickettsii*, durante 30 dias de acompanhamento - São Paulo - 2011-2013

Região hachurada representa o intervalo de referência

Fonte: UENO (2014)

Gráfico 4 - Contagem de plaquetas em equinos infectados experimentalmente com *R. rickettsii*, durante 30 dias de acompanhamento - São Paulo - 2011-2013

Região hachurada representa o intervalo de referência

Fonte: UENO (2014)

5.3 PCR EM TEMPO REAL SANGUE EQUINO

Todas as amostras de sangue total dos quatro equinos foram negativas na PCR em tempo real.

5.4 INOCULAÇÃO DE SANGUE EQUINO EM COBAIAS

Nenhuma cobaia inoculada com sangue total dos equinos apresentou hipertermia.

Apenas uma cobaia, inoculada com sangue correspondente ao 28º DPI do equino 4, veio a óbito 17 dias após a inoculação. Após 8 dias da inoculação do sangue, o animal demonstrou anorexia, adipsia, diarreia, emagrecimento progressivo, desidratação e morte no 17º DPI. À necropsia, foi observada congestão de pulmão, coração, fígado, baço e intestino delgado. Fígado e intestino delgado foram encaminhados para cultivo bacteriano, resultando em isolamento de *Edwardsiella tarda* do fígado, e *Klebsiella pneumoniae* e *Citrobacter freundii* do intestino delgado. A PCR em tempo real para *Rickettsia* foi negativa para fígado, baço, pulmão e cérebro. A RIFI, realizada excepcionalmente para os seis antígenos de *Rickettsia* a partir do sangue cardíaco coletado após o óbito, revelou-se também negativa. Pode-se concluir, portanto, que a cobaia não estava infectada por *R. rickettsii* e sua morte decorreu provavelmente de infecção por outro(s) gênero(s) de bactérias.

Todas as demais cobaias sobreviveram durante os 21 dias de observação sem apresentar qualquer alteração clínica e, ao final do período, demonstraram soronegatividade na RIFI para *R. rickettsii* à diluição 1:64 do soro.

5.5 RIFI EQUINOS

Todos os equinos apresentaram soronegatividade para as seis riquetsias testadas antes das inoculações e desenvolveram anticorpos contra *R. rickettsii* detectáveis após a infecção. As curvas de anticorpos para os quatro equinos estão demonstradas no gráfico 5. Anticorpos foram detectados a partir do 10º DPI (equino 3) ou 12º DPI (equinos 1, 2 e 4). Os títulos atingiram o pico com 18 a 24 DPI e iniciaram a queda com 20 a 72 DPI. Os títulos máximos foram 512 para o equino 4, 2048 para o equino 1 e 8192 para os equinos 2 e 3. Os equinos 1 e 4 foram soropositivos até 177 DPI e 254 DPI, respectivamente. Para os equinos 2 e 3 não foi possível determinar o tempo máximo de persistência dos anticorpos. O equino 2 foi positivo até 611 DPI com título 512, quando a pesquisa foi encerrada. O equino 3 foi positivo com título 256 até 366 DPI, última data de coleta antes de o animal necessitar ser eutanasiado.

Gráfico 5 - Títulos de anticorpos (RIFI ≥ 64) em equinos infectados experimentalmente com *R. rickettsii* - São Paulo - 2011-2014

Tabela 3 - Títulos de anticorpos contra seis antígenos de *Rickettsia* em equinos infectados experimentalmente - São Paulo - 2011-2014

Nº equino	Dia pós-infecção	Antígeno					
		<i>R. rickettsii</i>	<i>R. parkeri</i>	<i>R. amblyommii</i>	<i>R. rhipicephali</i>	<i>R. felis</i>	<i>R. bellii</i>
1	0	NR*	NR	NR	NR	NR	NR
1	12	64	64	64	NR	NR	NR
1	18	2048	2048	512	512	128	1024
1	86	128	128	128	128	NR	128
1	177	64	64	64	NR	NR	NR
2	0	NR	NR	NR	NR	NR	NR
2	12	512	256	256	256	NR	512
2	20	8192	4096	4096	2048	1024	8192
2	611	512	512	512	512	512	512
3	0	NR	NR	NR	NR	NR	NR
3	10	256	256	256	128	128	128
3	20	8192	4096	2048	2048	8192	1024
3	366	256	256	256	128	256	128
4	0	NR	NR	NR	NR	NR	NR
4	12	64	64	64	64	64	64
4	24	512	512	256	256	512	512
4	100	128	128	64	64	128	64
4	254	64	64	64	64	64	64

*NR: não reagente

Fonte: UENO (2014)

5.6 AQUISIÇÃO DE *R. rickettsii* POR CARRAPATOS SUSCETÍVEIS

5.6.1 Infestação em coelhos

O coelho infestado com carrapatos previamente alimentados na primeira quinzena de experimento do equino 1 apresentou temperatura acima de 40°C no 10° e 11° dias pós-infestação. O outro coelho, infestado com carrapatos que haviam sido recolhidos do equino 1 na segunda quinzena de experimento, não mostrou hipertermia em nenhum dia.

O coelho infestado com carrapatos alimentados anteriormente na primeira quinzena de infecção do equino 3 apresentou hipertermia nos dias 0, 7 e 9 da infestação, enquanto o segundo coelho (infestado com carrapatos recuperados do equino 3 na segunda quinzena de infecção) mostrou hipertermia no 7º, 9º e 11º dias pós-infestação.

Não foi observada hipertermia nos coelhos infestados com carrapatos dos equinos 2 e 4.

Nenhum coelho apresentou soros reagentes na RIFI antes e após 21 dias da infestação, inclusive aqueles que apresentaram temperatura acima de 40°C.

5.6.2 PCR carrapatos

Dos carrapatos suscetíveis alimentados nos equinos para verificar a transmissão de *R. rickettsii* para estes carrapatos, foram testados pela PCR em tempo real para o gene *gltA* um total de 378 carrapatos do G1 e 447 carrapatos do G2. Destes, 16 (4,2%) foram positivos no G1 e 4 (0,9%) foram positivos no G2. Entretanto, apenas um carrapato foi positivo também na PCR convencional para o gene *ompA* (0,3% dos carrapatos do G1). Este carrapato foi alimentado no equino 1 na fase de larva, recuperado no 7º DPI e testado pela PCR em tempo real após a muda para ninfa. A amostra foi submetida ao sequenciamento de DNA dos genes *ompA* e *gltA*, mas não foi obtido sucesso, provavelmente porque não apresentava uma concentração de DNA suficiente para o sequenciamento, evidenciada por bandas fracamente coradas na eletroforese e por um valor de C_t alto na PCR em tempo real (35). Esta ninfa não foi alimentada em coelho para testar a viabilidade da bactéria ou a capacidade de transmissão do carrapato.

Dos carrapatos positivos apenas na PCR em tempo real, aqueles pertencentes ao G1 eram todos originários do equino 1 e não foram alimentados em coelhos posteriormente. Aqueles pertencentes ao G2 eram originários dos equinos 3 e 4 e foram alimentados em coelhos, que não apresentaram soroconversão (item 5.6.1). Apenas carrapatos alimentados no equino 2 não apresentaram nenhum indivíduo positivo na PCR em tempo real. Este equino demonstrou intensa reação de hipersensibilidade às infestações, sendo que nenhuma larva ingurgitada foi recuperada.

Todos os carrapatos negativos na PCR em tempo real foram submetidos à PCR convencional para o gene 16S rDNA mitocondrial de carrapatos, na qual 19 ninfas e 1 fêmea foram negativas e excluídas do cálculo final. A tabela 4 mostra os resultados das PCRs dos carrapatos desconsiderando-se aqueles excluídos.

Tabela 4 - Detecção de *Rickettsia* spp por PCR em tempo real do gene *gltA* e PCR convencional do gene *ompA* em carrapatos suscetíveis alimentados em equinos experimentalmente infectados - São Paulo - 2011-2014

Grupo experimental	Nº equino	Estádio do carrapato quando foi alimentado no equino	Estádio do carrapato quando foi testado (nº carrapatos positivos*/nº carrapatos testados)		
			ninfa	fêmea	macho
G1	equino 1	larva	1/89 (1,1%)		
		ninfa		0/94 (0)	0/45 (0)
		fêmea		0/39 (0)	
		macho			0/12 (0)
G1	equino 2	larva			
		ninfa		0/56 (0)	0/14 (0)
		fêmea		0/15 (0)	
		macho			0/14 (0)
G2	equino 3	larva		0/6 (0)	0/1 (0)
		ninfa		0/72 (0)	0/108 (0)
		fêmea		0/15 (0)	
		macho			0/6 (0)
G2	equino 4	larva		0/106 (0)	0/72 (0)
		ninfa		0/39 (0)	
		fêmea		0/15 (0)	
		macho			0/7 (0)
		Total	1/89 (1,1%)	0/457 (0)	0/279 (0)

*Foram consideradas positivas apenas amostras simultaneamente positivas para a PCR em tempo real direcionada para o gene *gltA* e para a PCR convencional direcionada para o gene *ompA*

Fonte: UENO (2014)

5.7 TESTE DE VIABILIDADE DE *R. rickettsii*

O coelho infestado simultaneamente ao equino 1 com adultos da colônia infectada demonstrou febre, apatia, necrose de orelhas e escroto, recuperando-se espontaneamente após algumas semanas (figura 4). Apresentou título na RIFI de 32768 para *R. rickettsii* após 21 dias da infestação.

O coelho infestado simultaneamente ao equino 2 mostrou febre, apatia e veio a óbito com 12 dias pós-infestação. O soro coletado no dia do óbito mostrou título de 512 para *R. rickettsii*. Amostras de baço, fígado e pulmão revelaram-se também positivas na PCR em tempo real.

Os dois coelhos apresentaram soronegatividade para as seis riquetsias testadas antes das infestações. Os resultados para os coelhos estão expressos na tabela 5.

Todos os carrapatos alimentados nos coelhos foram positivos na PCR em tempo real para *Rickettsia*.

Dos seis carrapatos utilizados para a infecção dos equinos 1 e 2 e selecionados para isolamento, *R. rickettsii* foi isolada de cinco deles em cultivo celular, e de quatro deles também em cobaias (tabela 6). Todos os cultivos celulares apresentaram formas compatíveis com *Rickettsia* em raspados corados e visualizados ao microscópio, RIFI positiva quando testados contra um soro de cobaia inoculada com *R. rickettsii* (figura 5) e PCR em tempo real positiva. Quatro cultivos foram sequenciados, resultando em 100% de identidade com *R. rickettsii* para os genes *gltA* e *ompA*.

Das seis cobaias inoculadas com o macerado respectivo de cada carrapato, quatro apresentaram febre e foram sacrificadas, mostrando-se positivas na PCR em tempo real dos órgãos (tabela 7). O sequenciamento dos genes *gltA* e *ompA* do fígado ou baço das cobaias revelou 100% de identidade com *R. rickettsii* para ambos os genes (tabela 6). As duas cobaias que não apresentaram febre foram positivas na RIFI após 21 dias da inoculação.

A PCR em tempo real do macerado dos carrapatos foi positiva para as seis amostras, e o sequenciamento realizado em quatro delas mostrou 100% de identidade com *R. rickettsii* nos dois genes pesquisados (tabela 6).

Considerando-se os carrapatos selecionados para isolamento somados aos demais que foram utilizados para infectar os equinos do G1, a proporção de carrapatos positivos na PCR em tempo real foi de 100% para o equino 1 e 97% para o equino 2 (tabela 8). O único carrapato negativo foi positivo na PCR para o gene 16S rDNA mitocondrial de carrapatos, comprovando a presença de DNA íntegro.

Em relação ao teste de infectividade do inóculo, as três cobaias inoculadas logo após o equino 3 apresentaram sinais compatíveis com riquetsiose: febre, apatia, necrose de bolsa escrotal e necrose de orelha (figura 4). Uma veio a óbito após 13 dias e outra após 10 dias, enquanto a terceira sobreviveu. Os órgãos das duas cobaias que vieram a óbito foram positivos na PCR em tempo real. Foi coletado soro de uma das cobaias no 10º DPI (dia do óbito), que mostrou título de 2048 na RIFI para *R. rickettsii*. A cobaia que sobreviveu apresentou título de 16384 21 dias após a inoculação.

As duas cobaias utilizadas como controle do inóculo do equino 4 apresentaram febre e necrose de bolsa escrotal, mas não vieram a óbito. A cobaia inoculada antes do equino (imediatamente após o macerado ser preparado) iniciou a febre no 5º DPI, e a cobaia inoculada após o equino apresentou febre a partir do 4º

DPI. Os títulos de anticorpos para *R. rickettsii*, 21 dias após a inoculação, foram 32768 e 16384, respectivamente. Os resultados do teste de infectividade dos inóculos estão expressos na tabela 5.

Tabela 5 - Teste de infectividade da colônia de carrapatos *A. cajennense* infectada com *R. rickettsii* e de teste de infectividade dos inóculos em coelhos e cobaias - São Paulo - 2011-2013

Animal	Via de infecção	Equino correspondente	Febre	Necrose de escroto ou orelhas	Óbito	PCR tempo real de órgãos	RIFI
Coelho 1	infestação com 10 carrapatos da colônia infectada	equino 1 (G1)	sim	sim	não	...	<i>R. rickettsii</i> : 32768 <i>R. parkeri</i> : 16384 <i>R. amblyommi</i> : 16384 <i>R. rhipicephali</i> : 16384 <i>R. felis</i> : 1024 <i>R. bellii</i> : 16384
Coelho 2	infestação com 10 carrapatos da colônia infectada	equino 2 (G1)	sim	não	sim	fígado: + baço: + pulmão: +	<i>R. rickettsii</i> : 512 <i>R. parkeri</i> : 512 <i>R. amblyommi</i> : 512 <i>R. rhipicephali</i> : 512 <i>R. felis</i> : 512 <i>R. bellii</i> : 512
Cobaia 1	inoculação IP* com macerado de órgãos (após equino 3)	equino 3 (G2)	sim	sim	não	...	<i>R. rickettsii</i> : 16384 <i>R. parkeri</i> : 4096 <i>R. amblyommi</i> : 16384 <i>R. rhipicephali</i> : 8192 <i>R. felis</i> : 512 <i>R. bellii</i> : 16384
Cobaia 2	inoculação IP com macerado de órgãos (após equino 3)	equino 3 (G2)	sim	sim	sim	fígado: + baço: + pulmão: +	
Cobaia 3	inoculação IP com macerado de órgãos (após equino 3)	equino 3 (G2)	sim	sim	sim	fígado: + baço: + pulmão: +	<i>R. rickettsii</i> : 2048 <i>R. parkeri</i> : 512 <i>R. amblyommi</i> : 2048 <i>R. rhipicephali</i> : 256 <i>R. felis</i> : 128 <i>R. bellii</i> : 256
Cobaia 4	inoculação IP com macerado de órgãos (antes do equino 4)	equino 4 (G2)	sim	sim	não	...	<i>R. rickettsii</i> : 32768 <i>R. parkeri</i> : 16384 <i>R. amblyommi</i> : 16384 <i>R. rhipicephali</i> : 8192 <i>R. felis</i> : 2048 <i>R. bellii</i> : 32768
Cobaia 5	inoculação IP com macerado de órgãos (após equino 4)	equino 4 (G2)	sim	sim	não	...	<i>R. rickettsii</i> : 16384 <i>R. parkeri</i> : 16384 <i>R. amblyommi</i> : 16384 <i>R. rhipicephali</i> : 16384 <i>R. felis</i> : 128 <i>R. bellii</i> : 16384

*IP = intraperitoneal
Fonte: UENO (2014)

Tabela 6 - Presença e viabilidade de *R. rickettsii* em carrapatos *A. cajennense* infectados utilizados anteriormente para a infecção dos equinos do grupo 1- São Paulo - 2013-2014

Nº carrapato	Estádio	Equino infestado	Hemolinfa	PCR tempo real carrapato	Isolamento em cultivo celular ^a	Febre em cobaia inoculada ^b	Sequenciamento genes <i>gltA</i> e <i>ompA</i>
1	fêmea	equino 1	+	+	+	-	carrapato: 100% <i>R. rickettsii</i> cultivo celular: 100% <i>R. rickettsii</i>
2	macho	equino 1	+	+	+	+	baço cobaia: 100% <i>R. rickettsii</i>
3	macho	equino 1	+	+	+	+	carrapato: 100% <i>R. rickettsii</i> cultivo celular: 100% <i>R. rickettsii</i> baço cobaia: 100% <i>R. rickettsii</i>
4	fêmea	equino 2	+	+	-	-	...
5	macho	equino 2	+	+	+	+	carrapato: 100% <i>R. rickettsii</i> cultivo celular: 100% <i>R. rickettsii</i> fígado cobaia: 100% <i>R. rickettsii</i>
6	macho	equino 2	+	+	+	+	carrapato: 100% <i>R. rickettsii</i> cultivo celular: 100% <i>R. rickettsii</i> fígado cobaia: 100% <i>R. rickettsii</i>

^a Cultivos foram considerados positivos quando apresentassem formas compatíveis com *Rickettsia* em lâminas coradas por Gimenez, RIFI positiva frente a um soro de cobaia inoculada com *R. rickettsii* e PCR em tempo real positiva

^b Resultados das inoculações em cobaias estão detalhados na tabela 7

Fonte: UENO (2014)

Tabela 7 - Cobaia inoculadas com macerado de carrapatos *A. cajennense* infectados utilizados anteriormente para a infecção dos equinos do grupo 1- São Paulo - 2013-2014

Nº cobaia	Nº carrapato	Equino infestado	Febre	Óbito (sacrifício)	PCR tempo real órgãos	RIFI
cobaia 6	1	equino 1	não	não	...	<i>R. rickettsii</i> : 8192 <i>R. parkeri</i> : 1024 <i>R. amblyommi</i> : 4096 <i>R. rhipicephali</i> : 1024 <i>R. felis</i> : 128 <i>R. bellii</i> : 8192
cobaia 7	2	equino 1	sim	sim (6º DPI ^a)	sangue: - fígado: + baço: + pulmão: + cérebro: +	<i>R. rickettsii</i> : NR ^b <i>R. parkeri</i> : NR <i>R. amblyommi</i> : NR <i>R. rhipicephali</i> : NR <i>R. felis</i> : NR <i>R. bellii</i> : NR
cobaia 8	3	equino 1	sim	sim (5º DPI)	sangue: + fígado: - baço: + pulmão: + cérebro: +	<i>R. rickettsii</i> : 256 <i>R. parkeri</i> : 64 <i>R. amblyommi</i> : 256 <i>R. rhipicephali</i> : 128 <i>R. felis</i> : 256 <i>R. bellii</i> : 256
cobaia 9	4	equino 2	não	não	...	<i>R. rickettsii</i> : NR <i>R. parkeri</i> : NR <i>R. amblyommi</i> : NR <i>R. rhipicephali</i> : NR <i>R. felis</i> : NR <i>R. bellii</i> : NR
cobaia 10	5	equino 2	sim	sim (6º DPI)	sangue: - fígado: + baço: + pulmão: + cérebro: +	...
cobaia 11	6	equino 2	sim	sim (4º DPI)	sangue: - fígado: + baço: + pulmão: + cérebro: +	...

^aDPI: dia pós-infecção

^bNR: não reagente

Fonte: UENO (2014)

Tabela 8 - PCR em tempo real para *Rickettsia* spp em carrapatos infectados utilizados anteriormente para a infecção dos equinos do grupo 1- São Paulo - 2011-2014

Equino infestado	Estádio do carrapato	Nº carrapatos positivos/nº carrapatos testados	
equino 1	fêmea	20/20	(100%)
equino 1	macho	6/6	(100%)
equino 2	fêmea	21/22	(95,5%)
equino 2	macho	13/13	(100%)
Total		60/61	(98,4%)

Fonte: UENO (2014)

Figura 4 - A: Necrose de orelhas em coelho infestado concomitantemente ao equino 1 com carrapatos *A. cajennense* da colônia infectada com *R. rickettsii* (teste de infectividade da colônia infectada); B: Necrose de bolsa escrotal em cobaia inoculada com *R. rickettsii* concomitantemente ao equino 3 (teste de infectividade do inóculo) - São Paulo - 2011-2013

Fonte: UENO (2014)

Figura 5 - C: Lâmina de cultivo celular positivo para *R. rickettsii*, corada com Gimenez (aumento de 1000x) - isolamento a partir de carrapato *A. cajennense* infectado utilizado para a infecção de um equino do G1; D: RIFI positiva do mesmo isolado frente a um soro de cobaia inoculada com *R. rickettsii* (aumento de 400x) - São Paulo - 2013-2014

Fonte: UENO (2014)

6 DISCUSSÃO

Os equinos apresentaram alguns parâmetros clínicos e laboratoriais discretamente divergentes dos valores de referência que provavelmente não têm significado clínico, já que estavam presentes antes e após as inoculações/infestações ou em dias esparsos ao longo do período de avaliação. Outros parâmetros, como temperatura retal e contagem de leucócitos, não apresentaram valores fora dos limites de referência, porém houve discreto aumento da temperatura a partir do 3º DPI, perdurando por no máximo três dias, e leve aumento dos leucócitos a partir do 18º DPI. Assim, pode-se considerar que os animais praticamente não apresentaram alterações clínicas, ou apresentaram alterações muito pequenas. Ricketts (1907) e Heinemann e Moore (1911, 1912), ao contrário, relataram hipertermia acima de 39°C em equinos infectados com amostras americanas, mas exames hematológicos e bioquímicos não foram realizados. Com exceção de poucas espécies, como cobaias, coelhos, macacos, cães, preás e alguns ratos selvagens (TRAVASSOS; VALLEJO, 1942a; MAGALHÃES, 1952; LUNDGREN; THORPE, 1966. MOE et al., 1976; SAMMONS et al., 1976; KEENAN et al., 1977; GAGE; BURGDORFER; HOPLA, 1990; EREMEEVA et al., 2003), a maior parte dos animais apresenta infecções inaparentes, inclusive aqueles reconhecidos como hospedeiros amplificadores competentes. Entre os animais que se mostraram assintomáticos em infecções experimentais estão capivaras (SOUZA et al., 2009), gambás (HORTA et al., 2009), quatis, furão, gato maracajá, cutia, pombos (MAGALHÃES, 1952), gatos, ovinos, galinhas, *Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* (MONTEIRO, 1931), bovinos (RICKETTS, 1907), algumas espécies de aves selvagens (LUNDGREN; THORPE; HASKELL, 1966), algumas espécies de ratos selvagens (SHIRAI et al., 1967), esquilos e lebres (BURGDORFER; FRIEDHOFF; LANCASTER, 1966). Capivaras podem apresentar diminuição de valores hematimétricos (SOUZA et al., 2009).

Os equinos não apresentaram riquetsemia detectável, verificada tanto pela PCR em tempo real do sangue, quanto pela inoculação do sangue em cobaias. A quantidade de bactérias livres no sangue normalmente é pequena, pois a maior parte delas encontra-se dentro das células endoteliais, o que dificulta a detecção no sangue (SOUZA et al., 2009). No entanto, a inoculação em cobaias é um método sensível, pois cobaias são muito suscetíveis à *R. rickettsii* e, mesmo quando

recebem baixa dose infectante, insuficiente para induzir sinais clínicos, desenvolvem resposta de anticorpos, o que não ocorreu no trabalho. A inoculação em cobaias mostrou-se mais sensível que a PCR em tempo real para a detecção de ricketsemia em gambás e capivaras (HORTA et al., 2009; SOUZA et al., 2009). Assim, o resultado negativo pode ser atribuído a um nível muito baixo de bacteremia que o equino provavelmente desenvolve. Heinemann e Moore (1911, 1912) verificaram que o sangue de equinos foi infectivo para cobaias apenas no dia correspondente ao pico de febre, ou seja, a temperatura parece acompanhar o estado de bacteremia. Nestes trabalhos, os autores inocularam cobaias com o sangue durante todos os dias de elevação da temperatura dos equinos, enquanto no presente trabalho o sangue foi inoculado em dias alternados, mas a temperatura foi aferida diariamente e não foi constatado aumento significativo em nenhum dia, o que significa que mesmo que o sangue tivesse sido testado em cobaias todos os dias, provavelmente o resultado continuaria sendo negativo. Diferenças em relação à ocorrência de febre e bacteremia entre os estudos poderiam ser atribuídas a eventuais diferenças de virulência entre amostras e doses infectantes. De qualquer forma, mesmo nos equinos infectados com amostras americanas a febre ocorreu apenas em alguns animais e, nestes, a bacteremia foi detectada somente em um dia, indicando que equinos são parcialmente resistentes à infecção (HEINEMANN; MOORE, 1911, 1912), contrastando com períodos de bacteremia de 7 a 13 dias observados em capivaras (SOUZA et al., 2009). Apesar da transmissão da bactéria de equinos para carrapatos não ter sido testada nos trabalhos citados acima, pode-se supor pelos resultados que os equinos não seriam fontes de infecção importantes para carrapatos.

Todos os equinos soroconverteram após a inoculação ou infestação, demonstrando que, apesar de não apresentarem alterações clínicas, são capazes de desenvolver resposta imune humoral, o que já foi constatado em diversos trabalhos que encontraram equinos sorologicamente positivos em condições naturais de regiões endêmicas para febre maculosa (LEMOS et al., 1996; HORTA et al., 2004, 2007; VIANNA et al., 2008). Essa capacidade habilita-os a serem utilizados como animais sentinelas para detecção da circulação de *R. rickettsii* em uma determinada região, desde que nesta região haja a presença de carrapatos *A. cajennense*. A utilização de equinos em estudos soroepidemiológicos apresenta a vantagem da facilidade de contenção dos animais e de coleta de sangue em

comparação com animais silvestres que também são considerados sentinelas, como capivaras.

Os anticorpos nos equinos foram detectados a partir do 10º DPI. Em cães e gambás infectados experimentalmente, anticorpos foram detectados já no 4º DPI (PIRANDA et al., 2008; HORTA et al., 2009). Em cães, gambás e capivaras foi observado que animais infectados por via intraperitoneal tendiam a desenvolver anticorpos mais precocemente e alcançar títulos maiores do que aqueles infectados por infestação com carrapatos infectados (PIRANDA et al., 2008; HORTA et al., 2009; SOUZA et al., 2009), o que não foi observado para os equinos. O título máximo visto nos equinos foi 8192, alcançado tanto por um equino inoculado via intraperitoneal, quanto por um infectado via carrapatos. Cães, gambás e capivaras parecem alcançar títulos maiores, como 65536 e 131072 (PIRANDA et al., 2008; HORTA et al., 2009; SOUZA et al., 2009), e mesmo as cobaias utilizadas para os testes de infectividade do presente trabalho atingiram título de 65536. Não se sabe se há uma relação entre o título máximo alcançado e o nível de suscetibilidade do hospedeiro à *R. rickettsii*. A duração mínima dos anticorpos foi de quase 6 meses, observada para o equino 1, até o máximo de 1 ano e 8 meses, observada para o equino 2, quando a coleta de sangue foi cessada (ambos os equinos foram infectados via carrapatos). Longa persistência de anticorpos foi demonstrada em outras espécies, como cães, gambás, pombos e ratos *Microtus nanus nanus*, que tiveram anticorpos até pelo menos 6 meses (LUNDGREN; THORPE, 1966; LUNDGREN; THORPE; HASKELL, 1966; PIRANDA et al., 2008; HORTA et al., 2009), rato *Sigmodon hispidus*, que manteve anticorpos até pelo menos 10 meses (SHIRAI et al., 1967) e rato *Neotoma lepida lepida*, que manteve anticorpos por ao menos 11 meses (LUNDGREN; THORPE, 1966). Cães inoculados duas vezes mantiveram anticorpos por pelo menos 2 anos e 10 meses (BREITSCHWERDT et al., 1990). Quando um animal é utilizado como sentinela, o tempo de persistência dos anticorpos deve ser levado em consideração juntamente com o tempo em que o animal vive na região estudada, para que animais que se infectaram em outro local e ainda estejam soropositivos não sejam considerados erroneamente como tendo sido infectados na região de interesse.

A persistência de anticorpos parece estar relacionada com a duração da imunidade à reinfecção. Cães pré-imunizados e desafiados com *R. conorii* quando ainda encontravam-se soropositivos não apresentaram sinais clínicos nem aumento

de anticorpos após o desafio. Por outro lado, os que foram reinoculados quando já encontravam-se soronegativos apresentaram sinais clínicos e aumento de anticorpos após a segunda inoculação (LEVIN et al., 2014). Os equinos foram selecionados preferencialmente em locais em que ainda não houve notificação de febre maculosa brasileira para diminuir o risco de utilização de animais imunes. Como todos foram soronegativos antes do experimento e apresentaram considerável aumento dos títulos após a infecção, pode-se supor que estes animais encontravam-se suscetíveis antes do início do experimento.

Antes do advento dos antibióticos, a utilização de soro hiperimune de equinos como prevenção ou tratamento da febre maculosa das Montanhas Rochosas foi estudada. Em cobaias infectadas, soros de equinos convalescentes foram capazes de evitar óbitos e mostraram que o nível de proteção conferido pode ser o mesmo que o de soros hiperimunes de cobaias (RICKETTS; GOMEZ, 1908; HEINEMANN; MOORE, 1911, 1912). Entretanto, sua utilização em infecções naturais, principalmente em pacientes humanos, parece ser limitada devido ao efeito protetor ser observado apenas se o soro for aplicado nos primeiros três dias da infecção (antes do aparecimento de sintomas), além da possibilidade de desenvolvimento de reações de hipersensibilidade (RICKETTS; GOMEZ, 1908; HEINEMANN; MOORE, 1912).

Os títulos para *R. rickettsii* foram maiores ou iguais aos títulos encontrados para os outros antígenos. Uma vez que reações cruzadas entre as espécies de *Rickettsia* são esperadas, o critério sorológico para determinar qual espécie foi a provável responsável pela infecção do animal (antígeno homólogo) é o encontro de título para uma determinada riquetsia no mínimo quatro vezes superior em relação a todas as outras riquetsias testadas (PHILIP et al., 1978; PIRANDA et al., 2008). No caso das titulações realizadas para os equinos, nenhum soro testado obedeceu a este critério; alguns soros apresentaram título para *R. rickettsii* quatro vezes superior em relação a alguns antígenos, mas não em relação a outros. Isto significa que a determinação do antígeno homólogo infectante em equinos naturalmente infectados provavelmente deve ocorrer em raras ocasiões.

O teste de aquisição de *R. rickettsii* por carrapatos suscetíveis alimentados em equinos infectados revelou que apenas uma ninfa alimentada no estágio de larva em um equino do G1 (infectado via carrapatos) foi positiva simultaneamente na PCR em tempo real para o gene *gltA* e na PCR convencional para o gene *ompA*. Apesar

da concentração de DNA desta amostra não ter sido quantificada, o valor alto para o C_t na PCR em tempo real e as bandas fracamente coradas nas PCRs convencionais para os genes *ompA* e *gltA* indicam que provavelmente a concentração de DNA inicial era muito baixa, o que pode ter impedido a eficácia do sequenciamento. Como a PCR para o gene *ompA* amplifica todas as riquetsias do grupo da febre maculosa, sem o sequenciamento não foi possível confirmar se o carrapato continha DNA de *R. rickettsii*. Este carrapato não foi alimentado ou inoculado em outro animal, por isso não é possível saber se a bactéria estava viável ou se o carrapato estava apto a transmitir o agente para o próximo hospedeiro. Entretanto, a baixa concentração de DNA pode indicar que o carrapato continha uma pequena quantidade de bactérias que seria insuficiente para ser transmitida, ou mesmo que a infecção não havia sido completamente estabelecida no artrópode. Horta et al. (2009) observaram que carrapatos alimentados em gambás infectados e que apresentaram positividade na PCR em tempo real para *Rickettsia* spp com alto valor de C_t não induziram soroconversão em coelhos parasitados por eles. No presente trabalho outros 19 carrapatos (4% do G1 e 0,9% do G2) foram positivos apenas na PCR em tempo real, mas negativos na PCR convencional para *ompA*. Uma vez que a PCR em tempo real possui maior sensibilidade que a PCR convencional, este resultado poderia ser atribuído a uma baixa concentração de bactérias e, conseqüentemente, baixa concentração de DNA de *Rickettsia* nos carrapatos, que seria detectada somente pela técnica mais sensível. Isso é corroborado pelo fato de que todas as amostras positivas apresentaram um valor de C_t acima de 31. Se este for o caso, é possível que a infecção não tenha tido sucesso nestes carrapatos, já que coelhos infestados com carrapatos positivos do G2 não soroconverteram. Apenas carrapatos alimentados no equino 2 não apresentaram nenhum indivíduo positivo na PCR em tempo real, talvez porque neste equino houve uma intensa reação de hipersensibilidade às infestações, com presença de prurido e secreção serosa, o que pode ter interferido no processo de alimentação dos carrapatos e na viabilidade da bactéria no sítio de fixação.

Todos os coelhos infestados com carrapatos alimentados no estágio anterior nos equinos não soroconverteram, confirmando que os carrapatos não estavam infectados ou não eram capazes de transmitir a infecção para os coelhos. Alguns coelhos apresentaram temperatura acima de 40°C em determinados dias após a infestação, porém este fato não parece ter significado clínico, uma vez que um dos

animais demonstrou temperatura acima do valor de referência antes mesmo da infestação.

Os resultados mostram que os equinos têm baixa competência para transmitir a infecção para carrapatos suscetíveis e, ainda que DNA de *Rickettsia* tenha sido detectado em poucos carrapatos, a infecção não parece ter sido instaurada com sucesso nestes artrópodes. Pode-se considerar que equinos provavelmente não sejam importantes no ciclo de manutenção de *R. rickettsii* na natureza.

Outro fator que contribui para a pequena participação dos equinos na manutenção da bactéria é a baixa prolificidade desta espécie, que possui um longo período de gestação (11 meses), primeiro parto após os três anos e apenas um produto por prenhez (CAMPOS et al., 2007). Uma vez que a infecção por *R. rickettsii* provoca um curto período de bacteremia nos hospedeiros amplificadores (quando eles representam uma fonte de infecção para carrapatos) e que após este período o hospedeiro adquire imunidade de longa duração, uma das condições para que um animal seja considerado hospedeiro amplificador eficiente para a bactéria é que ele seja altamente prolífico, para que haja reposição constante de indivíduos suscetíveis numa determinada região (MCDADE; NEWHOUSE, 1986; LABRUNA, 2009). Como equinos têm baixos índices de fertilidade, a única forma de animais suscetíveis estarem sempre presentes seria a introdução constante de animais de outro local para uma determinada região.

Apesar de equinos provavelmente contribuírem pouco para a infecção de carrapatos suscetíveis em condições naturais, devido ao fato de serem hospedeiros primários para *A. cajennense* e suportarem alta carga parasitária, podem contribuir para a manutenção ou aumento da população de carrapatos, dependendo da densidade de equinos presentes em um local. Labruna et al. (2001) demonstraram que a infestação em humanos estava associada ao nível de infestação em equinos no estado de São Paulo. Assim, o aumento do número de carrapatos poderia aumentar o risco para FMB, desde que em uma região estejam presentes, além dos equinos, também hospedeiros amplificadores competentes, como capivaras ou gambás.

A dose infectante inoculada nos equinos dos dois grupos não foi calculada, porém os testes de infectividade dos carrapatos infectados e inóculos de *R. rickettsii* por meio de infestações em coelhos, inoculações em cobaias e isolamentos em cultivo celular demonstraram que tanto os carrapatos quanto os macerados de

órgãos continham bactérias viáveis e patogênicas para coelhos e cobaias. Os carrapatos infectados utilizados para a infecção dos equinos 1 e 2 (grupo 1) tinham taxas de infecção de, respectivamente, 100% e 97%. Levando-se em conta que foram colocados 60 carrapatos em cada equino deste grupo e que os carrapatos permaneceram nos animais por até 24 dias, pode-se inferir que os equinos receberam quantidades consideráveis de bactérias.

Neste trabalho, foram utilizados poucos equinos devido à dificuldade em adquirir e manter estes animais. Outros trabalhos com maior número de animais e, de preferência, utilizando-se potros recém-nascidos, que têm maior chance de nunca terem tido contato com riquetsias, são necessários para melhor esclarecer o papel dos equinos no ciclo de manutenção de *R. rickettsii*. Quando o trabalho foi iniciado, não havia um isolado disponível de *R. rickettsii* obtido a partir de carrapato *A. cajennense* naturalmente infectado, por isso foi utilizado o isolado obtido de *A. aureolatum*. Hoje, uma amostra originária de *A. cajennense* do município de Itu em SP está disponível (KRAWCZAK et al., 2014), e repetições do trabalho com esta nova amostra são necessárias para verificar possível diversidade no curso da infecção entre amostras adaptadas a espécies de carrapatos diferentes. Adicionalmente, a importância do mecanismo de transmissão de um carrapato a outro através da coalimentação deve ser avaliada, sendo que o equino poderia ser um bom modelo animal para este tipo de estudo, pois não demonstra bacteremia ou ela ocorre em baixo nível. O mecanismo de imunidade contra a bactéria e a relação parasita-hospedeiro em equinos, em comparação com humanos ou animais altamente sensíveis ao agente, também é uma questão a ser estudada para esclarecer as razões pelas quais uma espécie apresenta resistência ao agente, enquanto outra apresenta sinais clínicos graves ou bacteremia por alguns dias.

7 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitem concluir que os equinos se infectam por *R. rickettsii*, pois efetuam soroconversão e permanecem soropositivos para IgG por muitos meses. Porém não sofrem alterações clínicas e não se comportam como hospedeiros amplificadores para carrapatos *A. cajennense*, pois não desenvolvem bacteremia detectável e não são capazes de infectar carrapatos *A. cajennense* a ponto destes manterem a infecção para o próximo estágio evolutivo, e com isso, transmitirem-na a um hospedeiro suscetível.

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 the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 252-254, Oct. 2006.
- ANGERAMI, R. N.; CÂMARA, M.; PACOLA, M. R.; REZENDE, R. C.; DUARTE, R. M.; NASCIMENTO, E. M.; COLOMBO, S.; SANTOS, F. C.; LEITE, R. M.; KATZ, G.; SILVA, L. J. Features of Brazilian spotted fever in two different endemic areas in Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 3, n. 5-6, p. 346-348, Dec. 2012.
- ARAGÃO, H. B. Ixodidas brasileiros e de alguns paizes limitrophes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 31, n. 4, p. 759-843, out. 1936.
- BATISTA, F. G.; DA SILVA, D. M.; GREEN, K. T.; TEZZA, L. B. L.; VASCONCELOS, S. P.; CARVALHO, S. G. S.; SILVEIRA, I.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M. B.; FORTES, F. S.; MOLENTO, M. B. Serological survey of *Rickettsia* sp. in horses and dogs in an non-endemic area in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 4, p. 205-209, out.-dez. 2010.
- BEATI, L.; NAVA, S.; BURKMAN, E. J.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; GUGLIELMONE, A. A.; CÁCERES, A. G.; GUZMÁN-CORNEJO, C. M.; LEÓN, R.; DURDEN, L. A.; FACCINI, J. L. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, n. 267, Dec. 2013.
- BENGTSON, I. A. Classification of the Rickettsiae of Rocky Mountain spotted fever and of endemic (murine) typhus. **Journal of Bacteriology**, v. 53, n. 3, p. 325-327, Mar. 1947.
- BLACK, W. C.; PIESMAN, J. Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 21, p. 10034-10038, Oct. 1994.
- BOZEMAN, F. M.; SHIRAI, A.; HUMPHRIES, J. W.; FULLER, H. S. Ecology of Rocky Mountain spotted fever. II: natural infection of wild mammals and birds in Virginia and Maryland. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 16, n. 1, p. 48-59, Jan. 1967.
- BREITSCHWERDT, E. B.; LEVY, M. G.; DAVIDSON, M. G.; WALKER, D. H.; BURGDORFER, W.; CURTIS, B. C.; BABINEAU, C. A. Kinetics of IgM and IgG responses to experimental and naturally acquired *Rickettsia rickettsii* infection in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, n. 8, p. 1312-1316, Aug. 1990.

BURGDORFER, W. Hemolymph test. A technique for detection of rickettsiae in ticks. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 19, n. 6, p. 1010-1014, Nov. 1970.

BURGDORFER, W.; NEWHOUSE, V. F.; PICKENS, E. G.; LACKMAN, D. B. Ecology of Rocky Mountain spotted fever in western Montana. I: isolation of *Rickettsia rickettsii* from wild mammals. **American Journal of Hygiene**, v. 76, p. 293-301, Nov. 1962.

BURGDORFER, W.; FRIEDHOFF, K. T.; LANCASTER JR., J. L. Natural history of tick-borne spotted fever in the USA: susceptibility of small mammals to virulent *Rickettsia rickettsii*. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 35, n. 2, p. 149-153, 1966.

BURGDORFER, W.; BRINTON, L. P. Mechanisms of transovarial infection of spotted fever Rickettsiae in ticks. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 266, p. 61-72, Nov. 1975.

CABRERA, R. R.; LABRUNA, M. B. Influence of photoperiod and temperature on the larval behavioral diapause of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n. 6, p.1303-1309, Nov. 2009.

CAMPOS, V. A. L.; MCMANUS, C.; FUCK, B. H.; SILVA, L. F. A.; LOUVANDINI, H.; DIAS, L. T.; TEIXEIRA, R. A. Influência de fatores genéticos e ambientais sobre características reprodutivas do rebanho equino do Exército Brasileiro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 1, p. 16-22, jan.-fev. 2007.

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. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 3, p. 495-501, mar. 2006.

CHEN, L. F.; SEXTON, D. What's new in Rock Mountain spotted fever? **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 22, n. 3, p. 415-432, Sept. 2008.

DIAS, E.; MARTINS, A. V. Aspectos do typho exanthematico em Minas Geraes. **Brasil Medico**, v. 51, n. 14, p. 431-441, abr. 1937.

DIAS, E.; MARTINS, A. V. Spotted fever in Brazil: a summary. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 19, n.2, p.103-108, Mar. 1939.

DIAS, E.; MARTINS, A. V.; RIBEIRO, D. J. Typho exanthematico no oeste de Minas Geraes. **Brasil Medico**, v. 51, n. 24, p. 651-655, jun. 1937.

EREMEEVA ME, LIANG Z, PADDOCK C, ZAKI S, VANDENBERGH JG, DASCH GA, SILVERMAN DJ. *Rickettsia rickettsii* infection in the pine vole, *Microtus pinetorum*: kinetics of infection and quantitation of antioxidant enzyme gene expression by RT-PCR. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 990, p. 468-73, June 2003.

ESTRADA-PENÑA, A.; GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J. The distribution and ecological 'preferences' of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae), an ectoparasite of humans and other mammals in the Americas. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 98, n. 3, p. 283-292, Apr. 2004.

FELDMAN, B. V.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 1344 p.

FREITAS, M. C.; GRYCAJUK, M.; MOLENTO, M. B.; BONACIN, J.; LABRUNA, M. B.; PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; DECONTO, I.; BIONDO, A. W. Brazilian spotted fever in cart horses in a non-endemic area in Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 130-131, Apr.-June 2010.

FUENTES, L. G. Primer caso de fiebre de las Montañas Rocosas en Costa Rica, América Central. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 21, n. 4, p. 167-172, Oct.-Dec. 1979.

GAGE, K. L.; BURGDORFER, W.; HOPLA, C. E. Hispid cotton rats (*Sigmodon hispidus*) as a source for infecting immature *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) with *Rickettsia rickettsii*. **Journal of Medical Entomology**, v. 27, n. 4, p. 615-619, July 1990.

GARRITY, G. M.; BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. (Eds.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2. ed. East Lansing: Springer, 2005. 304 p.

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

GOULD, D. J.; MIESSE, M. L. Recovery of a *Rickettsia* of the spotted fever group from *Microtus pennsylvanicus* from Virginia. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 85, n. 4, p. 558-61, Apr. 1954.

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, Dec. 2005.

GUEDES, E.; LEITE, R. C.; PACHECO, R. C.; SILVEIRA, I.; LABRUNA, M. B. Rickettsia species infecting *Amblyomma* ticks from an area endemic for Brazilian spotted fever in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 4, p. 308-311, out.-dez. 2011.

GUGLIELMONE, A. A.; BEATI, L.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; NAVA, S.; VENZAL, J. M.; MANGOLD, A. J.; SZABÓ, M. P.; MARTINS, J. R.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; ESTRADA-PENÑA, A. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Experimental and Applied Acarology**, v. 40, n. 2, p. 83-100, Nov. 2006.

- HEINEMANN, P. G.; MOORE, J. J. The production and concentration of a serum for Rocky Mountain spotted fever: preliminary note. **The Journal of the American Medical Association**, v. 57, n. 3, p. 198, July 1911.
- HEINEMANN, P. G.; MOORE, J. J. Experimental therapy of Rocky Mountain spotted fever: the preventive and curative action of a serum for spotted fever, and the inefficiency of sodium cacodylate as a curative agent for this disease in guinea pigs. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n. 3, p. 294-304, May 1912.
- HILLYER, E. V.; QUESENBERRY, K. E. **Ferrets, rabbits, and rodents: clinical medicine and surgery**. 1. ed. Philadelphia: WB Saunders. 432 p. 1997.
- HORTA, M. C.; LABRUNA, M. B.; SANGIONI, L. A.; VIANNA, M. C.; GENNARI, S. M.; GALVÃO, M. A.; MAFRA, C. L.; VIDOTTO, O.; SCHUMAKER, T. T.; 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, July 2004.
- HORTA, M. C.; LABRUNA, M. B.; PINTER, A.; LINARDI, P. M.; SCHUMAKER, T. T. *Rickettsia* infection in five areas of the state of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 793-801, Nov. 2007.
- HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; CASAGRANDE, R. A.; SAITO, T. B.; ROSA, S. C.; OGRZEWSKA, M.; MATUSHIMA, E. R.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of opossums *Didelphis aurita* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 1, p. 109-118, Feb. 2009.
- JAIN, N. C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417 p.
- KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 932 p.
- KEENAN, K. P.; BUHLES, W. C. JR.; HUXSOLL, D. L.; WILLIAMS, R. G.; HILDEBRANDT, P. K. Studies on the pathogenesis of *Rickettsia rickettsii* in the dog: clinical and clinicopathologic changes of experimental infection. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, n. 6, p. 851-856, June 1977.
- KRAWCZAK, F. S.; NIERI-BASTOS, F. A.; NUNES, F. P.; SOARES, J. F.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in *Amblyomma cajennense* ticks and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in a Brazilian spotted fever-endemic area. **Parasites & Vectors**, v. 7, Jan. 2014.
- LABRUNA, M. B. Ecology of *Rickettsia* in South America. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1166, p. 156-166, May 2009.

LABRUNA, M. B. Rickettsiosis in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. **Revista MVZ Córdoba**, v. 16, n. 2, p. 2435-2457, May-Aug. 2011.

LABRUNA, M. B.; KERBER, C. E.; FERREIRA, F.; FACCINI, J. L. H.; WAAL, D. T. D.; GENNARI, S. M. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 97, n. 1, p. 1-14, May 2001.

LABRUNA, M. B.; KASAI, N.; FERREIRA, F.; FACCINI, J. L. H.; GENNARI, S. M. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 105, n. 1, p. 65-77, Apr. 2002.

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, Jan. 2004.

LABRUNA, M. B.; OGRZEWALSKA, M.; MARTINS, T. F.; PINTER, A.; HORTA, M. C. Comparative susceptibility of larval stages of *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma cajennense*, and *Rhipicephalus sanguineus* to infection by *Rickettsia rickettsii*. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 6, p. 1156-1159, Nov. 2008.

LABRUNA, M. B.; SOARES, J. F.; MARTINS, T. F.; SOARES, H. S.; CABRERA, R. R. Cross-mating experiments with geographically different populations of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 54, n. 1, p. 41-49, May 2011a.

LABRUNA, M. B.; MATTAR, S. V.; NAVA, S.; BERMUDEZ, S.; VENZAL, J. M.; DOLZ, G.; ABARCA, K.; ROMERO, L.; SOUSA, R. de; OTEO, J.; ZAVALA-CASTRO, J. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. **Revista MVZ Córdoba**, v. 16, n. 2, p. 2435-2457, mayo-agosto 2011b.

LEMO, E. R.; MACHADO, R. D.; COURA, J. R.; GUIMARÃES, M. A.; 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. 38, n. 6, p. 427-430, Nov.-Dec. 1996.

LEVIN, M. L.; ZEMTSOVA, G. E.; MONTGOMERY, M.; KILLMASTER, L. F. Effects of homologous and heterologous immunization on the reservoir competence of domestic dogs for *Rickettsia conorii* (*israelensis*). **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 5, n. 1, p. 33-40, Feb. 2014.

LIBANIO, S. Typho exantematico de Minas Geraes. **Brasil Medico**, n. 51, p. 1259-1263, dez. 1937.

LUNDGREN, D. L.; THORPE, B. D. Infectious diseases in wild animals in Utah. Experimental infection of rodents with *Rickettsia rickettsii*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 15, n. 5, p. 799-806, Sept. 1966.

LUNDGREN, D. L.; THORPE, B. D.; HASKELL, C. D. Infectious diseases in wild animals in Utah. VI: experimental infection of birds with *Rickettsia rickettsii*. **Journal of Bacteriology**, v. 91, n. 3, p. 963-966, Mar. 1966.

LUNDGREN, D. L.; NICHOLS, P. S.; THORPE, B. D. Experimental infection of lagomorphs with *Rickettsia rickettsii*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 17, n. 2, p. 213-218, Mar. 1968.

MAGALHÃES, O. **Contribuição ao conhecimento das doenças do grupo tifo exantemático**. Monografias do Instituto Oswaldo Cruz, n. 6. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1952. 968 p.

MAGALHÃES, O. Contribuição para o conhecimento das doenças do grupo tifo exantemático no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 54, n. 1, p. 279-308, maio 1956.

MAGALHÃES, O. Contribuição para o conhecimento das doenças do grupo “Tifo Exantemático” no Brasil (Tifo Exantemático Neotrópico). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 55, n. 2, p. 191-208, dez. 1957.

MARRERO, M.; 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, n. 2, p. 197-199, Feb. 1989.

MASTROPAOLO, M.; NAVA, S.; GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J. Biological differences between two allopatric populations of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in Argentina. **Experimental and Applied Acarology**, v. 53, n. 4, p. 371-375, Apr. 2011.

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

MEYER, D. J.; HARVEY, J. W. **Veterinary laboratory medicine: interpretation and diagnosis**. 3. ed. St. Louis: WB Saunders, 2004. 351 p.

MILAGRES, B. S.; PADILHA, A. F.; BARCELOS, R. M.; GOMES, G. G.; MONTANDON, C. E.; PENA, D. C. H.; NIERI BASTOS, F. A.; SILVEIRA, I.; PACHECO, R.; LABRUNA, M. B.; BOUYER, D. H.; FREITAS, R. N.; WALKER, D. H.; MAFRA, C. L.; GALVÃO, M. A. M. *Rickettsia* in synanthropic and domestic animals and their hosts from two areas of low endemicity for Brazilian spotted fever in the Eastern region of Minas Gerais, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 6, p. 1305-1307, Dec. 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. **Casos confirmados de febre maculosa. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1997 a 2014**. Ministério da Saúde, 2014. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/26/anexo-FebreMaculosa.pdf>. Acesso em: 27 maio 2014a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. **Óbitos de febre maculosa. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990-2014.**

Ministério da Saúde, 2014. Disponível em:

<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/26/anexo-2->

FebreMaculosa.pdf Acesso em: 27 maio 2014b.

MOE, J. B.; MOSHER, D. F.; KENYON, R. H.; WHITE, J. D.; STOOKEY, J. L.; BAGLEY, L. R.; FINE, D. P. Functional and morphologic changes during experimental Rocky Mountain spotted fever in guineapigs. **Laboratory investigation**, v. 35, n. 3, p. 235-245, Sept. 1976.

MONTEIRO, J. L. Estudos sobre o typho exanthematico de São Paulo. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 6, p. 3-134, 1931.

MONTEIRO, J. L. Comportamento experimental do virus do “typho exanthematico” de S. Paulo após passagem pelo carrapato (*Amblyomma cajennense*). **Memórias do Instituto Butantan**, v. 8, p. 23-39, 1933-1934a.

MONTEIRO, J. L. O “typho exanthematico de S. Paulo” e suas relações com a febre maculosa das Montanhas Rochosas, à luz das provas de imunidade cruzada. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 8, p. 209-220, 1933-1934b.

MONTEIRO, J. L. Vaccina contra o “typho exanthematico” de S. Paulo. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 8, p. 11-20, 1933-1934c.

MONTEIRO, J. L.; FONSECA, F. Typho exanthematico de São Paulo: novas experiências sobre a transmissão experimental por carrapatos – (*Boophilus microplus* e *Amblyomma cajennense*). **Brasil Medico**, v. 16, n. 48, p. 993-995, nov. 1932.

MONTEIRO, J. L.; FONSECA, F.; PRADO, A. Typho endemico de São Paulo: pesquisas sobre a possibilidade de transmissão experimental do vírus por Ixodidae. **Brasil Medico**, v. 46, n. 3, p. 49-52, jan. 1932.

MOREIRA, J. A.; MAGALHÃES, O. Typhus exantematico em Minas Gerais. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 28, n. 2, p. 225-234, jun. 1934.

MOREIRA, J. A.; MAGALHÃES, O. Typho exanthematico em Minas Geraes. **Brasil Medico**, v. 44, n. 21, p. 465-470, maio 1935.

MOREIRA, J. A.; MAGALHÃES, O. Typho exanthematico de Minas Geraes. **Brasil Medico**, n. 41, p. 881-882, out. 1936.

MOREIRA, J. A.; MAGALHÃES, O. Typho exanthematico de Minas Geraes. **Brasil Medico**, v. 51, n. 12, p. 388-392, mar. 1937.

NAVA S, BEATI L, LABRUNA MB, CÁCERES AG, MANGOLD AJ, GUGLIELMONE AA. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and

reinstatement of *Amblyomma mixtum*, and *Amblyomma sculptum* (Ixodida: Ixodidae). **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 5, n. 3, p. 252-276, Apr. 2014.

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. 773-778, Feb. 1999.

OLIVEIRA, P. R.; BORGES, L. M. F.; LEITE, R. C.; FREITAS, C. M. V. Seasonal dynamics of the Cayenne tick, *Amblyomma cajennense* on horses in Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 17, n. 4, p. 412-416, Dec. 2003.

ORTIZ MARIOTTE, C.; BUSTAMANTE, M. E.; VARELA, G. Hallazgo del *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) infectado naturalmente con fiebre manchada de las Montañas Rocosas, en Sonora (Mexico). **Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales**, v. 5, n. 4, p. 297-300, dic. 1944.

OTOMURA, F. H.; SANGIONI, L. A.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B.; GALHARDO, J. A.; RIBEIRO, M. G.; TEODORO, U. Anticorpos anti-rickettsias do grupo da febre maculosa em equídeos e caninos no norte do Estado do Paraná, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 3, p. 761-764, jun. 2010.

PACHECO, R. C.; HORTA, M. C.; PINTER, A.; MORAES-FILHO, J.; MARTINS, T. F.; NARDI, M. S.; SOUZA, S. S.; SOUZA, C. E.; SZABÓ, M. P.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. Survey of *Rickettsia* spp in the ticks *Amblyomma cajennense* and *Amblyomma dubitatum* in the State of São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 3, p. 351-353, May-June 2009.

PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; GUEDES, E.; SILVEIRA, I.; RICHTZENHAIN, L. J.; LEITE, R. C.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infections of dogs, horses and ticks in Juiz de Fora, southeastern Brazil, and isolation of *Rickettsia rickettsii* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 25, n. 2, p. 148-155, June 2011.

PARKER, R. R. Protective value of convalescent sera of São Paulo exanthematic typhus against virus of Rocky Mountain spotted fever. **Public Health Reports**, v. 48, n. 19, p. 501-507, May 1933.

PAROLA, P.; PADDOCK, C. D.; SOCOLOVSKI, C.; LABRUNA, M. B.; MEDIANNIKOV, O.; KERNIF, T.; ABDAD, M. Y.; STENOS, J.; BITAM, I.; FOURNIER, P.; RAOULT, D. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 657-702, Oct. 2013.

PATINO, L.; AFANADOR, A.; PAUL, J. H. A spotted fever in Tobia, Colombia: preliminary report. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 17, n. 5, p. 639-653, Sept. 1937.

PHILIP, R. N.; CASPER, E. A.; ORMSBEE, R. A.; PEACOCK, M. G.; BURGDORFER, W. Microimmunofluorescence test for the serological study of Rocky

Mountain spotted fever and typhus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 51-61, Jan. 1976.

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, Nov. 1978.

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

PIRANDA, E. M.; FACCINI, J. L. H.; PINTER, A.; SAITO, T. B.; PACHECO, R. C.; HAGIWARA, M. K.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical and laboratory findings. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 7, p. 696-701, Nov. 2008.

PIRANDA, E. M.; FACCINI, J. L. H.; PINTER, A.; PACHECO, R. C.; CANÇADO, P. H. D.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of *Rhipicephalus sanguineus* ticks with the bacterium *Rickettsia rickettsii*, using experimentally infected dogs. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 1, p. 29-36, Jan. 2011.

PIRES, M. S.; SANTOS, T. M.; SANTOS, H. A.; VILELA, J. A. R.; PEIXOTO, M. P.; ROIER, E. C. R.; da SILVA, C. B.; BARREIRA, J. D.; LEMOS, E. R. S.; MASSARD, C. L. *Amblyomma cajennense* infestation on horses in two microregions of the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 2, p. 235-242, abr-jun. 2013.

PIZA, J.; SALLES-GOMES, L.; MEYER, J.; FLEURY, J. P.; CASTRO, O.; RODRIGUES, C.; ROCHA LIMA, H. Le typhus exanthématique a São Paulo. **Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales**, v. 106, p. 1020-1022, févr. 1931.

RADOSTITS, O. M.; MAYHEW, I. G.; HOUSTON, D. **Veterinary clinical examination and diagnosis**. 1. ed. London: WB Saunders, 2000. 771 p.

RAOULT, D.; ROUX, V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 4, p. 694-719, Oct. 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, n. 5, p. 1576-1589, Mar. 1991.

RICKETTS, H. T. The role of the wood-tick (*Dermacentor occidentalis*) in Rocky Mountain spotted fever, and the susceptibility of local animals to this disease – a preliminary report. **The Journal of the American Medical Association**, v. 49, n. 1, p. 24-27, July 1907.

RICKETTS, H. T. Some aspects of Rocky Mountain spotted fever as shown by recent investigations. **Medical Record**, v. 76, p. 843-855, 1909.

RICKETTS, H. T.; GOMEZ, L. Studies on immunity in Rocky Mountain spotted fever: first communication. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 5, n. 2, p. 221-244, Mar. 1908.

RIPOLL, C. M.; REMONDEGUI, C. E.; ORDONEZ, G.; ARAZAMENDI, R.; FUSARO, H.; HYMAN, M. J.; PADDOCK, C. D.; ZAKI, S. R.; OLSON, J. G.; SANTOS-BUCH, C. A. Evidence of rickettsial spotted fever and ehrlichial infections in a subtropical territory of Jujuy, Argentina. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 2, p. 350-354, Aug. 1999.

RODANICHE, E. C.; RODANICHE, A. Spotted fever in Panama; isolation of the etiologic agent from a fatal case. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, n. 4, p. 511-517, July 1950.

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

SAMMONS, L. S.; KENYON, R. H.; BURGER, G. T.; PEDERSEN, C. E. JR.; SPERTZEL, R. O. Changes in blood serum constituents and hematologic values in *Macaca mulatta* with Rocky Mountain spotted fever. **American Journal of Veterinary Research**, v. 37, n. 6, p. 725-730, June 1976.

SANGIONI, L. A.; HORTA, M. C.; VIANNA, M. C.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. M.; GALVÃO, M. A.; SCHUMAKER, T. T.; 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, Feb. 2005.

SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO. Febre Maculosa Brasileira. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 8, n. 1, p. 1-32, out. 2011. Suplemento. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/sucen/homepage/downloads/arquivos-de-febre-maculosa/bepa94_suplemento_fmb.pdf. Acesso em: 27 maio 2014.

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, Aug. 1993.

SHIRAI, A.; BOZEMAN, F. M.; PERRI, S.; HUMPHRIES, J. W.; FULLER, H. S. Ecology of Rocky Mountain spotted fever. I: *Rickettsia rickettsii* recovered from a cottontail rabbit from Virginia. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 107, p. 211-214, 1961.

SHIRAI, A.; BOZEMAN, F. M.; HUMPHRIES, J. W.; ELISBERG, B. L.; FABER, J. E. Experimental infection of the cotton rat *Sigmodon hispidus* with *Rickettsia rickettsii*. **Journal of Bacteriology**, v. 94, n. 5, p. 1334-1339, Nov. 1967.

SOARES, J. F. **Infecção experimental do carrapato *Amblyomma cajennense* pela bactéria *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da febre maculosa brasileira: avaliação das transmissões transovariana e transtadial, efeito da infecção nos parâmetros biológicos do carrapato e capacidade de larvas, ninfas e adultos transmitirem a bactéria para vertebrados.** 2011. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SOARES, J. F.; SOARES, H. S.; BARBIERI, A. M.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of the tick *Amblyomma cajennense*, Cayenne tick, with *Rickettsia rickettsii*, the agent of Rocky Mountain spotted fever. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 26, n. 2, p. 139-151, June 2012.

SOUZA, C. E.; MORAES-FILHO, J.; OGRZEWALSKA, M.; UCHOA, F. C.; HORTA, M. C.; SOUZA, S. S.; BORBA, R. C.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. **Veterinary Parasitology**, v. 161, n. 1-2, p. 116-121, Apr. 2009.

SPEIRS, V. C.; WRIGLEY, R. H. **Clinical examination of horses.** Philadelphia: WB Saunders, 1997. 358 p.

SPOLIDORIO, M. G.; LABRUNA, M. B.; MACHADO, R. Z.; MORAES-FILHO, J.; ZAGO, A. M.; DONATELE, D. M.; PINHEIRO, S. R.; SILVEIRA, I.; CALIARI, K. M.; YOSHINARI, N. H. Survey for tick-borne zoonoses in the state of Espírito Santo, Southeastern Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 1, p. 201-206, July 2010.

TAMEKUNI, K.; TOLEDO, R. S.; SILVA FILHO, M. F.; HAYDU, V. B.; PACHECO, R. C.; CAVICCHIOLI, J. H.; LABRUNA, M. B.; DUMLER, J. S.; VIDOTTO, O. Serosurvey of antibodies against spotted fever group *Rickettsia* spp. in horse farms in Northern Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 4, p. 259-261, out.-dez. 2010.

TOLEDO, R. S.; TAMEKUNI, K.; SILVA FILHO, M. F.; HAYDU, V. B.; BARBIERI, A. R. M.; HILTEL, A. C.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B.; DUMLER, J. S.; VIDOTTO, O. Infection by spotted fever *Rickettsiae* in people, dogs, horses and ticks in Londrina, Paraná state, Brazil. **Zoonoses and Public Health**, v. 58, n. 6, p. 416-423, Sept. 2011.

TOSTES, J.; BRETZ, G. Sobre uma rickettsiose observada em zona rural do estado do Rio de Janeiro. **Brasil Medico**, v. 55, n. 48, p. 789-794, nov. 1941.

TRAVASSOS, J. Identificação de um vírus semelhante ao do “typho exanthematico de S. Paulo”, isolado do *Didelphis aurita*, Wied. **Boletim da Sociedade de Medicina e Cirurgia de S. Paulo**, p. 352-353, out. 1937.

TRAVASSOS, J.; DIAS, E. Identidade imunologica dos virus de Minas Gerais, São Paulo e das Montanhas Rochosas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 34, n. 2, p. 149-179, jul.-ago. 1939.

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 Butantan**, v. 15, p. 73-86, jan. 1942a.

TRAVASSOS, J.; VALLEJO, A. Possibilidade de *Amblyomma cajennense* se infectar em *Hydrochoerus capybara* experimentalmente inoculado com o vírus da febre maculosa. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 15, p. 87-90, jan. 1942b.

TRAVASSOS, J.; VALLEJO-FREIRE, A. Soro anti-*Rickettsia* na febre maculosa experimental. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 16, p. 285-307, fev. 1943.

VERONEZ, V. A.; FREITAS, B. Z.; OLEGÁRIO, M. M. M.; CARVALHO, W. M.; PASCOLI, G. V. T.; THORGA, K.; GARCIA, M. V.; SZABÓ, M. P. J. Ticks (Acari: Ixodidae) within various phytophysionomies of a Cerrado reserve in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 50, n. 2, p. 169-179, Feb. 2010.

VIANNA, M. C.; HORTA, M. C.; SANGIONI, L. A.; CORTEZ, A.; SOARES, R. M.; MAFRA, C. L.; GALVÃO, M. A.; LABRUNA, M. B.; GENNARI, S. M. Rickettsial spotted fever in capoeirão village, Itabira, Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 5, p. 297-301, Sept.-Oct. 2008.

WALKER, D. H. Rickettsiae and rickettsial infections: the current state of knowledge. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, p. 39-44, July 2007. Supplement, 1.

WEINERT, L. A.; WERREN, J. H.; AEBI, A.; STONE, G. N.; JIGGINS, F. M. Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria. **BMC Biology**, v. 7, n. 6, Feb. 2009.

WOLBACH, S. B. Studies on Rocky Mountain spotted fever. **The Journal of Medical Research**, v. 41, n. 1, p. 1-198, Nov. 1919.