LUÍS ANTONIO SANGIONI

Pesquisa de infecção por rickettsias do grupo da febre maculosa em humanos, cães, eqüídeos e em adultos de *Amblyomma cajennense*, em região endêmica e não endêmica do estado de São Paulo.

São Paulo

2003

LUÍS ANTONIO SANGIONI

Pesquisa de infecção por rickettsias do grupo da febre maculosa em humanos, cães, eqüídeos e em adultos de *Amblyomma cajennense*, em região endêmica e não endêmica do estado de São Paulo.

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor junto à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Odilon Vidotto

SÃO PAULO
2003

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1227 Sangioni, Luís Antonio
FMVZ Pesquisa de infecção por rickettsias do grupo da febre maculosa em humanos, cães, eqüídeos e em adultos de *Amblyomma cajennense*, em região endêmica e não endêmica do estado de São Paulo / Luis Antonio Sangioni. – São Paulo : L. A. Sangioni, 2003.
86 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2003.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Odilon Vidotto.

1. Febre maculosa. 2. *Rickettsia*. 3. Epidemiologia. I. Título.

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

Certificamos que o Projeto intitulado "Aspectos Epidemiológicos da Febre Maculosa nos Estados de Minas Gerais e São Paulo", Protocolo nº 54/2002, sob a responsabilidade da Profª Drª Solange Maria Gennari, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 20/03/2002.

(We certify that the Research "Epidemiological aspects of Brazilian Spotted Fever in the States of Minas Gerais and São Paulo", protocol number 54/2002, under the responsibility of Profª Drª Solange Maria Gennari, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in 20/03/2002 meeting.)

São Paulo, 22 de março de 2002

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

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: SANGIONI, Luís Antonio

Título: Pesquisa de infecção por rickettsias do grupo da febre maculosa em humanos, cães, equídeos e em adultos de *Amblyomma cajennense*, em região endêmica e não endêmica do estado de São Paulo.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Epidemiologia Experimental aplicada às Zoonoses

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof Dr.
Julgamento _____

Instituição :
Assinatura _____

Prof Dr.
Julgamento _____

Instituição :
Assinatura _____

Prof Dr.
Julgamento _____

Instituição :
Assinatura _____

Prof Dr.
Julgamento _____

Instituição :
Assinatura _____

Prof Dr
Julgamento _____

Instituição :
Assinatura _____

Aos meus pais,

*Antonio Sangioni e Gracy Aparecida M. Sangioni,
Meus grandes exemplos de amor, dedicação, abdicção, trabalho e honestidade.*

À minha família

Pelo apoio e solidariedade em todos os momentos....

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Odilon Vidotto, pelo exemplo de profissionalismo, amizade, orientação, apoio e incentivo em todos os momentos da graduação, mestrado e doutorado.

Ao prof. Marcelo Bahia Labruna, verdadeiro engenheiro desse projeto, pelo apoio, solidariedade, orientação em todos os momentos deste trabalho.

À profa. Solange Maria Gennari, pelo exemplo de profissionalismo, ética e pela oportunidade que me deu para participar dessa excelente equipe de trabalho.

Ao prof. Dr. Márcio Galvão pelas sugestões apresentadas durante a qualificação e acolhida no Laboratório de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto.

Ao prof. Dr. Cláudio Mafra e a graduanda de farmácia Denise pela acolhida no Laboratório de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto e orientação das atividades.

Ao prof. Leonardo José Richtzenhain, pelo acolhida e concessão do laboratório de Biologia Molecular.

Ao prof. Dr. Ademir Pereira pelo incentivo, generosidade e amizade dispensada.

Ao prof. Dr. Sílvio Arruda Vasconcelos, coordenador do curso de Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Aos mestres Manoella Campostrini Vianna e Maurício Cláudio Horta e mestrando Adriano Pinter, por todo auxílio dispensado, amizade e companheirismo nessa jornada.

À Doutoranda Adriana Cortez, e prof. Dr. Rodrigo pelo auxílio durante a realização das reações de PCR,

À minha sobrinha e graduanda de Medicina Veterinária Marilú de Cássia Ceratt, pelo auxílio técnico.

Aos funcionários Pedrinho, Renato e Jusciléia pela colaboração e inestimável auxílio dispensado.

A todos os funcionários do VPS e do Campus de Pirassununga – USP pela inestimável colaboração.

A todos os docentes que ministraram aulas para a conclusão dos créditos exigidos e contribuíram para o meu conhecimento.

À Conceição Montans Baer, Presidente da Mantenedora do CIES, pelo apoio, incentivo financeiro, liberação e colaboração dispensada, sem o qual não poderia ter realizado mais essa etapa.

A minha companheira Wínia Maria Cavalcanti Lopes pela dedicação em todos os momentos difíceis.

À Cleuza Proetty Yurassek, Paula. Pintro e Rubens José Antunes, pela amizade, incentivo e atenção nos vários momentos.

A todos os docentes e funcionários do CIES pela grande amizade e incentivo dispensado.

A minha tia Iacy Galvão Montemor e tio Miguel, tia Míriety Inês Montemor, minha irmã Rita de Cássia Sangioni Mauenberg e Silas Mauenberg pela acolhida em São Paulo, pelo companheirismo e solidariedade.

A minha irmã Mônica de Cássia M. Sangioni e sobrinhos pela dedicação e solidariedade em todos os momentos.

Ao meu inestimável amigo José César da Costa pela amizade e apoio em todos os momentos e sempre torcendo a cada conquista.

Aos amigos Hilda, Vânia, Alessandra, Letícia, Willian, Sílvio, Fábio, Paulo, Letice, Marcos, Bob, Pancho, Luis César, Guimarães, Leandro, Patrícia, Patrícia Pozetti, Sandra, Bozó, Eric, Laura, Lara, Nanci e todos os colegas que encontrei nos tempos de doutoramento que fizeram os anos de 1999, 2000, 2001 e 2002 simplesmente inesquecíveis.

Agradeço, de forma geral, porém não menos importante, a todos os que foram realmente meus amigos durante o período do Doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo apoio financeiro para a execução deste trabalho (processo nº 00/02711-1).

*“... Tu me fizeste uma das tuas criaturas
Com ânsia de voar
E eu percebi que as minhas penas já cresceram
E que eu preciso abrir as asas e tentar
Se eu não tentar não saberei como se voa
Não foi a toa que eu nasci para voar
Só que é preciso olhar os pais como eles voam, e aperfeiçoar
Haja mau tempo haja correntes traiçoeiras
Se já tem asas seu destino é voar
Tu me fizeste amar o risco das alturas
Com ânsia de chegar
E embora eu seja como as outras criaturas
Não sei me rebaixar
Não vou brincar de não ter sonhos se eu os tenho
Sou da montanha e na montanha eu vou ficar
Igual meus pais vou construir também meu ninho
Mas não sou águia se lá em cima eu não morar...”*

Pe. Zezinho

RESUMO

SANGIONI, L. A. **Pesquisa de infecção por rickettsias do grupo da febre maculosa em humanos, cães e equídeos e em adultos de *Amblyomma cajennense*, em área endêmica e não endêmica do estado de São Paulo.** [Detection of rickettsia of the spotted fever group in humans, canine, equine and in *Amblyomma cajennense* adult ticks of an endemic and non endemic área of São Paulo state]. 2003. 86 f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

A febre maculosa, doença de caráter endêmico, já foi diagnosticada em vários estados brasileiros. Em São Paulo a doença é considerada endêmica em algumas regiões e não endêmica ou desconhecida na maior parte do estado. Com o objetivo de estudar a epidemiologia da febre maculosa em regiões consideradas endêmica e não endêmica do estado de São Paulo, foram colhidos carrapatos das pastagens e amostras de sangue de seres humanos, cães e equídeos que viviam em propriedades rurais dos municípios de Pedreiras, (região endêmica); Pirassununga, Sorocaba e Cotia (não endêmica). A colheita de carrapato e de sangue foi efetuada no período de novembro de 2000 a março de 2001, época de predomínio do estágio adulto de ixodídeos do gênero *Amblyomma* na região. Foram colhidos 686 amostras de carrapatos, 50 amostras de sangue de seres humanos, 28 eqüinos, quatro asininos e 16 caninos de região endêmica e 658 amostras de carrapatos, 16 amostras de sangue de seres humanos, 48 eqüinos e cinco caninos de região não endêmica. Os carrapatos foram examinados pelo teste de hemolinfa e pela *nested* reação em Cadeia da Polimerase (*n*-PCR). A amplificação de uma região do gene que codifica uma proteína interna de membrana de 17 kDa pela *n*-PCR, foi utilizada para a detecção do gênero *Rickettsia* spp nos carrapatos. De um total de 686 amostras de carrapatos de região endêmica, foram encontrados 34 amostras positivas (4,9%) e de 658 amostras de carrapatos de região não endêmica, foram

encontrados seis amostras positivas (0,9%). O sequenciamento de um fragmento de 232 pares de bases do gene 17 kDa efetuados em duas amostras de região endêmica e seis de região não endêmica demonstraram homologia em 100% com a *Rickettsia felis*. Foi realizada a reação de imunofluorescência indireta (IFI) nos soros sanguíneos utilizando-se antígenos brutos de superfície de *Rickettsia rickettsii*. Foram considerados positivos soros com títulos superiores a 64. Nenhuma amostra de soro de seres humanos de região endêmica e não endêmica apresentou sorologia positiva. 17 (65,3%) amostras de soros de equinos, de região endêmica, apresentaram sorologia positiva, com titulação máxima de 4096. Apenas uma (2,0%) amostra de soro equino de região não endêmica apresentou sorologia positiva, com titulação de 128. Cinco (31,2%) amostras de soros de cães de região endêmica apresentaram sorologia positiva, com titulação máxima de 512. Não foi detectada sorologia positiva para cães de região não endêmica. Os títulos elevados da sorologia de cães e equinos de região endêmica sugerem indiretamente a circulação de *Rickettsia rickettsii* nesta localidade. A vigilância epidemiológica em regiões não endêmicas é de grande importância visto que são consideradas vulneráveis a futuros casos de febre maculosa.

Palavras - chave: Febre Maculosa. *Rickettsia*. Epidemiologia.

ABSTRACT

SANGIONI, L. A. **Detection of Rickettsia of the Spotted Fever Group in humans, canine, equine and in *Amblyomma cajennense* adult ticks of an endemic and non endemic área of São Paulo state** [Pesquisa de infecção por rickettsias do grupo da febre maculosa em humanos, cães e eqüídeos e em adultos de *A. cajennense*, em área endêmica e não endêmica do estado de São Paulo] 2002. 86 f. Dissertação (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Spotted fever, a disease of endemic characteristics, has already been diagnosed in several Brazilian states. The disease is considered to be endemic in some regions of the state of São Paulo and non-endemic or unknown in most of the state. In order to study the epidemiology of spotted fever in endemic and non-endemic regions of the state of São Paulo, ticks were collected from pastures, and blood samples were collected from humans, dogs and horses living in rural properties in the cities of Pedreiras (endemic region); Pirassununga, Sorocaba and Cotia (non-endemic regions). Collection of the ticks was performed from November 2000 to March 2001, a period when adults ticks of the *Amblyomma* genus predominate in the region. Collection was performed as follows: 686 tick samples, 50 blood samples from humans, 26 blood samples from horses, four blood samples from donkeys and 16 blood samples from dogs in the endemic region. In the non-endemic region, 658 tick samples, 16 blood samples from humans, 48 blood samples from horses and one blood sample from a dog were collected. Ticks were studied using the hemolymph test, and by means of the nested polymerase chain reaction (n-PCR). The amplification, by n-PCR, of a region of the gene that codifies a 17 kDa internal protein in the membrane of the microorganism was used for the detection of the *Rickettsia* spp genus, in the ticks. From 686 tick samples from the endemic region, 34 were positive (4.9%). From the 658 tick samples collected in the non-

endemic region, six were positive (0.9%). Sequencing of a 232 base-pair fragment of the 17 kDa gene, performed in two samples of the endemic region and in six samples of the non-endemic region, showed 100% homology with *Rickettsia felis*. Indirect immunofluorescence (IFI) was performed in serum samples using crude antigens from *Rickettsia rickettsii* surface. Serum samples were considered to be positive when presenting titers higher than 64. No human serum sample from the endemic or non-endemic region was positive. Seventeen (65.3%) serum samples from horses in the endemic region were positive, with maximum titer equal to 4096. Only one horse (2.0%) in the non-endemic region presented positive serology, with titer equal to 128. Five (31.2%) dog serum samples from the endemic region were positive, with maximum titer equal to 512. No dog serum sample was positive in the non-endemic region. Epidemiological surveillance in endemic regions is very important, for new spotted fever cases may be expected.

Key words –: Spotted fever. *Rickettsia*. Epidemiology.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Mapa do estado de São Paulo, indicando os municípios das áreas de estudos e distância com relação a capital.....	40
FIGURA 2 – Armadilha de CO ₂ utilizada para captura de <i>A. cajennense</i> adultos de vida livre, nas áreas de estudo, São Paulo – Dez. – 2000.....	43
FIGURA 3 – Resultados da reação de <i>n</i> -PCR em gel de agarose 2%, realizado com o primer 17 kDa, em carrapatos <i>A. cajennense</i> , colhidos na Fazenda Quitandinha considerada região endêmica. A amplificação dos fragmentos de DNA com tamanho de 230 pb foi demonstrado na canaleta 3 (reação positiva) e 8 (controle positivo). As amostras das canaletas 1, 2, 4, 5, 6, 7 e 9 apresentaram resultados negativos...	56
FIGURA 4 – Resultados da reação de <i>n</i> -PCR em gel de agarose 2%, realizado com o primer 17 kDa, em carrapatos <i>A. cajennense</i> , colhidos na Fazenda FMVZ-USP – Campus Pirassununga, considerada região não endêmica. A amplificação dos fragmentos de DNA com tamanho de 230 pb foi demonstrada nas canaletas 2 e 16 (controle positivo) e 4, 5, 6, 10, 11 e 19 (reação positiva). Nas canaletas 3, 9, 18 e 21 foram utilizados controles negativos. São Paulo – 2002.....	57
FIGURA 5 – Amostra de fragmentos de DNA de rickettsia obtida na <i>n</i> -PCR do gene 17 kDa, realizado em carrapato <i>A. cajennense</i> da Fazenda Quitandinha considerada região endêmica. Sequência de nucleotídeos alinhados de 186 pares de bases. A análise dos fragmentos apresentou compatibilidade a rickettsia pertencente ao SFG com 100% de similariedade com a <i>R. felis</i>	59
FIGURA 6 – Amostra de fragmentos de DNA de rickettsia obtida na <i>n</i> -PCR do gene 17 kDa, realizado em carrapato <i>A. cajennense</i> da Fazenda FMVZ-USP – Campus Pirassununga considerada região não endêmica. Sequência de nucleotídeos alinhados de 109 pares de bases. A análise dos fragmentos apresentou compatibilidade a rickettsia pertencente ao SFG com 100% de similariedade com a <i>R. felis</i>	59
FIGURA 7 – Soro canino positivo, anti- <i>Rickettsia rickettsii</i> , através da Reação de Imunofluorescência Indireta, na diluição de 1/64. 400x. Ouro Preto – Minas Gerais – 2002.....	60

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	Características das propriedades rurais envolvidas nos trabalhos e respectivas localizações obtidas através do uso de GPS (Garmin GPS 12XL/Garmin Corp.; 1998) - São Paulo – 2002.....	39
TABELA 2 –	Distribuição das amostras de carrapatos <i>A.cajennense</i> , de acordo com a localidade, colhidos em áreas endêmicas e não endêmicas, para febre maculosa - São Paulo - nov 2000/mar 2001.....	44
TABELA 3 –	Distribuição das amostras de carrapatos <i>A. cajennense</i> colhidos em áreas endêmicas e não endêmicas, para febre maculosa, por sexo, de acordo com a localidade - São Paulo - nov 2000/mar 2001.....	45
TABELA 4 –	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para identificação genotípica de espécies e amostras de rickettsias do grupo da febre maculosa, São Paulo, 2002.....	47
TABELA 5 –	Concentração de reagentes empregados na reação em cadeia pela polimerase (PCR), segundo o gene pesquisado. São Paulo – 2002.....	48
TABELA 6 –	Condições de amplificação das diferentes reações, conforme o gene pesquisado. São Paulo - 2002.....	49
TABELA 7 –	Soros de humanos, eqüinos e caninos colhidos em regiões endêmicas e não endêmicas para febre maculosa - São Paulo – 2001.....	52
TABELA 8 –	Resultados das reações de <i>n</i> -PCR realizados em carrapatos <i>A. cajennense</i> colhidos em região considerada endêmica no estado de São Paulo – 2002.....	55
TABELA 9 –	Resultados das reações <i>n</i> -PCR realizados em carrapatos <i>A. cajennense</i> colhidos em região considerada não endêmica no estado de São Paulo – 2002.....	55
TABELA 10 –	Grau de identidade calculado para cada par de seqüências de nucleotídeos, entre as amostras estudadas de região considerada	

endêmica e as seqüências obtidas no GenBank. São Paulo – 2002.....	58
--	----

TABELA 11 – Recíprocas de títulos de anticorpos anti <i>Rickettsia rickettsii</i> obtidas em soros de eqüinos, asininos e cães de região endêmica para febre maculosa do estado de São Paulo – São Paulo – 2002.....	60
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% = Por cento

°C = graus Celsius

dATP = desoxi-adenosina trifosfato

dCTP = desoxi-citosina trifosfato

dGTP = desoxi-guanosina trifosfato

dTTP = desoxi-timidina trifosfato

Taq = *Thermus aquaticus*

DNA = ácido desoxirribonucleico

RNA = ácido ribonucleico

EDTA = ácido etileno-diamino-tetracético

TE = tampão Tris-EDTA

TRIS = tris(hidroximetil)amino metano

TBE = Tris-borato-EDTA

GT = Isotiocianato de guanidina

kDa = kilodalton

M = molar (mol por litro)

mM = milimolar

B.O.D.= *biological oxygen demand*

RFLP = *Restriction Fragment Length Polymorphism*

CO₂ = dióxido de carbono

GPS = *global position system*

x g = múltiplos da gravidade terrestre (9,8m/s²)

g = grama

mg = miligrama

µg = micrograma

L = litro

µL = microlitro

p/v = peso por volume

pb = pares de bases

pH = potencial hidrogeniônico

et al. = e colaboradores

q.s.p. = quantidade suficiente para

® = marca registrada

≥ = maior ou igual

x = vezes

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	OBJETIVOS	24
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	25
3.1	Histórico	25
3.2	Taxonomia	26
3.3	Epidemiologia.....	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1	Área de estudo	38
4.1.1	Área endêmica	41
4.1.2	Área não endêmica	42
4.2	Amostragem	43
4.3	Teste de hemolinfa de <i>A. cajennense</i>	45
4.4	Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).....	46
4.4.1	Extração de DNA riquetsial.....	46
4.4.2	Oligonucleotídeos iniciadores	47
4.4.3	Deteccção de riquetsias através do gene 17 kDa.....	47
4.4.4	Avaliação do desempenho da <i>n</i> -PCR	48
4.5	Análise dos produtos amplificados.....	49
4.6	Purificação dos produtos amplificados e quantificação de DNA	49
4.7	Seqüenciamento.....	50
4.8	Pesquisa de riquetsia em soros de seres humanos e animais.....	51
4.8.1	Imunofluorescência Indireta (IFI)	52
5	RESULTADOS	53
5.1	Teste de hemolinfa de <i>A. cajennense</i>	53
5.2	Pesquisa de DNA riquetsial.....	53
5.3	Seqüenciamento.....	56
5.4	Imunofluorescência Indireta (IFI)	59
6	DISCUSSÃO	61
7	CONCLUSÃO.....	69
	REFERÊNCIAS	70
	ANEXOS	82

1 INTRODUÇÃO

A febre maculosa foi reconhecida pela primeira vez no estado de São Paulo em 1929, circunscrito às áreas suburbanas da capital (DEBERALDINI et al., 1996). Inúmeros óbitos em seres humanos ocorreram nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Espírito Santo (GALVÃO et al., 1999) e novos casos da doença foram diagnosticados nos últimos anos. Em três de novembro de 1997, Bridi (1997a) publicou:

“A suspeita de que a engenheira agrônoma Beatriz Cintra tenha morrido, aos 27 anos, de febre maculosa há duas semanas, no município de Amparo, região de Campinas, mostrou o quanto a doença ainda é desconhecida pela população, médicos e pesquisadores. A região acumulou, na última década, um total de 58 casos suspeitos com 14 óbitos. O pai de Beatriz, o ex-prefeito da cidade, João Batista Cintra, assim como outras famílias da região que tiveram parentes com suspeita de terem contraído a febre, não terão condições de saber se eles foram mesmo vítimas da doença. As autoridades da área de saúde “ignoram” que exista algum caso da enfermidade no país. “Fiquei impressionado como existem médicos que nunca ouviram falar da febre”, disse Cintra”.

Já em 7 de novembro de 1997, Bridi (1997b), relata:

“A febre maculosa pode ter provocado a segunda morte em Amparo, na região de Campinas. Ana Paula Marco de Oliveira, de 14 anos, morreu sexta-feira na Santa Casa Anna Cintra. Ela foi internada no dia anterior com os sintomas da doença. A cidade está em estado de alerta há 20 dias, desde que Beatriz Cintra, de 27 anos, filha do ex-prefeito João Baptista Cintra, morreu com suspeita de ter contraído a febre. O médico Sérgio Marson, que atendeu Ana, não descarta a possibilidade de a menina ter morrido em consequência da enfermidade, que pode matar em cinco dias, se não for diagnosticada a tempo. “Ela apresentava erupções nas palmas das mãos e solas dos pés, além de manchas rosadas pelo corpo, sintomas típicos da febre”.

O último relato de óbito pela doença foi publicado por Cafardo (2002):

“O acesso ao Campus da Universidade de São Paulo (USP) em Piracicaba foi restringido por causa da morte do filho do professor, vítima da febre maculosa. A doença é transmitida por picadas de carrapatos, comuns na Escola Superior de Agricultura Luiz de

Queiroz (ESALQ), que tem área de matas, pastos e plantações. A unidade atende mais de dois mil alunos, a maioria cursando ciências agrárias, que requerem estudos justamente nesses locais.

... A universidade não tinha como evitar a doença porque não existia nem recomendação no País de uso de roupas apropriadas para evitar o contato com o carrapato.

... A doença demorou para ser identificada e não houve tempo para um tratamento apropriado.”

Medidas eficazes de controle da doença por parte das autoridades competentes são realizadas somente em estado de alerta, quando as pessoas morrem.

Com o objetivo de traçar um perfil epidemiológico e comparar uma área considerada endêmica de uma não endêmica, do estado de São Paulo, três propriedades de cada região foram estudadas. Foram colhidos 1469 carrapatos, 66 soros sangüíneos de seres humanos, 76 soros de eqüinos e 21 soros de cães para a pesquisa do agente. Os carrapatos foram examinados pelo teste de hemolinfa e pela *nested* PCR e os soros sangüíneos foram submetidos a reação de Imunofluorescência Indireta (IFI). Os resultados foram comparados e concluímos que novas regiões, nunca antes observadas a presença do agente causador da febre maculosa, são vulneráveis a novos casos da doença, contribuindo para a expansão horizontal desta moléstia.

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo:

- Estudar a epidemiologia da febre maculosa em áreas endêmicas e não endêmicas do estado de São Paulo.

Objetivos específicos:

- Pesquisar a presença de riquetsias na hemolinfa dos carrapatos, através da coloração de Gimenez.
- Determinar a prevalência de infecção por riquetsias do grupo da febre maculosa, em carrapatos naturalmente infectados, através da técnica da *nested* Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).
- Comparar a infecção de riquetsias do grupo da febre maculosa, em carrapatos de região endêmica e não endêmica.
- Determinar a presença de anticorpos anti-*R. rickettsii* em soros obtidos a partir de seres humanos, cães e eqüinos, através da IFI.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Histórico

A febre maculosa é uma doença infecciosa, que geralmente se desenvolve em caráter endêmico, transmitida por carrapatos ao homem, tem como agente etiológico a *Rickettsia rickettsii* (BURGDORFER et al., 1962; DIAS; MARTINS, 1939). O conhecimento a respeito dos primeiros casos da doença ocorreu em 1896, em Idaho, nos Estados Unidos e foi definida como “Doença Febril Endêmica” (HARDEN, 1990). Em 1902 chegou-se à conclusão da participação dos carrapatos na disseminação da doença (RICKETTS, 1909). Foi em 1916 que a bactéria foi nomeada de *Rickettsia* (STRAUSS, 1991; WEISS).

No Brasil a doença é conhecida como febre maculosa ou febre maculosa brasileira e teve seus primeiros relatos na década de trinta. De outubro de 1929 a setembro de 1933, 88 casos foram relatados no estado de São Paulo (DIAS; MARTINS, 1939; MONTEIRO, 1933). Em 1930 foi realizado o primeiro relato da bactéria, no estado de São Paulo (PIZA et al., 1932). Entre 1957 a 1974, foram notificados 53 casos da doença em seres humanos e de 1976 a 1982 mais 10 casos, todos provenientes da zona rural de municípios vizinhos da capital de São Paulo. Em 1985 foi feita a suspeita diagnóstica de febre maculosa no município de Pedreira, com um óbito. Em 1986 mais quatro casos suspeitos foram diagnosticadas no mesmo município. Em 1987, de três casos suspeitos, dois foram confirmados através da reação de Imunofluorescência Indireta (IFI).

Em 1988 foi isolada uma riquetsia do grupo da febre maculosa de um ser humano de Mogi das Cruzes, com comprovação sorológica e caracterização da amostra isolada por PCR

(DEL GUERCIO et al., 1997). Vários casos foram diagnosticados em outros estados brasileiros, incluindo Rio de Janeiro, Bahia e Espírito Santo (GALVÃO et al., 1999).

3.2 Taxonomia

Este agente pertence a α -proteobactéria, ordem Rickettsiales, família Rickettsiaceae (DUMLER et al., 2001) foi primariamente descrito como pequeno bastonete e bacilo gram-negativo, (0,3 x 1,5 μ m), que retinha fucsina básica quando corado pelo método de Gimenez (GIMENEZ, 1964), parasita intracelular obrigatório e que reside em glândulas salivares e ovários de artrópode hospedeiro (BILLINGS et al., 1998). O gênero *Rickettsia* é composto por dois grupos: o grupo tífico (*Thyphus Group* – TG) e o grupo da febre maculosa (*Spotted Fever Group* – SFG). O primeiro está constituído por apenas três espécies (*Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia typhi* e *Rickettsia canadensis*) e é transmitido primariamente por piolhos e pulgas, sendo a *R. canadensis* isolada de carrapatos, patogênicos ao homem, causadores do tifo. O SFG está constituído, até o momento, por 60 espécies. Dessas, pelo menos 13 espécies são reconhecidamente patogênicas para seres humanos, causadores das doenças: febre maculosa das montanhas rochosas (*Rickettsia rickettsii*), febre botonosa ou febre maculosa do mediterrâneo (*Rickettsia conorii*), febre da picada do carrapato (*Rickettsia africae*), tifo do carrapato de Queensland (*Rickettsia australis*), tifo da ilha Flinders (*Rickettsia honei*), tifo siberiano ou do norte da Ásia (*Rickettsia sibirica*), febre maculosa oriental (*Rickettsia japonica*), tifo das pulgas californianas (*R. felis*), Rickettsiose européia, (*Rickettsia mongolotimonae*, *R. slovacae*, *R. helvetica*), rickettsiose variceliforme ou vesicular (*Rickettsia akari*), sendo essa última transmitida por ácaros (BEATI; RAOULT, 1998;

FOURNIER et al., 2000; HOOGSTRAAL, 1985; RAOULT; ROUX, 1997). Atualmente, recentes relatos de *Rickettsia felis* infectando seres humanos foram identificados por Boostrom et al., (2002); Ishikura et al., (2002); Marques et al., (2002); Oliveira et al., (2002); Raoult et al., 2001. São consideradas riquetsias não patogênicas ou de patogenicidade desconhecida: *Rickettsia amblyommii*, *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia montanensis*, *Rickettsia rhipicephali*, *Rickettsia peacockii*, *Rickettsia massiliae*, *Rickettsia helongjiangi*, *Rickettsia sharonii*, (ROUX et al., 1997; BEATI; RAOULT, 1998). De modo geral, as riquetsias patogênicas não são distinguíveis das não patogênicas pelos aspectos morfológicos ou bioquímicos (BURGDORFER, 1970). Algumas riquetsias patogênicas compartilham proteínas de membranas externas com riquetsias não patogênicas. O potencial patogênico está relacionado às alterações destas proteínas externas promovido por mutações gênicas (WELLER et al., 1998).

3.3 Epidemiologia

No Brasil, os carrapatos do gênero *Amblyomma* spp são os principais vetores que transmitem a febre maculosa ao homem e a muitos outros mamíferos (BALASHOV, 1978; GALVÃO et al., 1993; MCDADE; NEWHOUSE, 1986). O *Amblyomma cajennense* é considerado o principal vetor transmissor da doença aos homens (DIAS; MARTINS, 1939; LEMOS et al., 1997). A transmissão transovariana da riquetsia por fêmeas desta espécie foi descrita por Monteiro e Fonseca, (1932). As riquetsias multiplicam-se em vários órgãos do carrapato, inclusive nos ovários, possibilitando a transmissão transovariana para, pelo menos, uma geração. A transmissão transtadial ocorre, em grande maioria dos casos, se o ovo

estiver infectado, conseqüentemente, larvas, ninfas e adultos apresentarão essa riquetsia (RAOULT; ROUX, 1997).

O *A. cajennense* possui baixa especificidade parasitária, principalmente nos estádios de larva e ninfa e é o principal carrapato que parasita o ser humano no Brasil (ARAGÃO, 1911; ARAGÃO, 1936; ARAGÃO; FONSECA, 1953). Seus três estádios evolutivos, (larvas, ninfas e adultos), são capazes de transmitir a bactéria durante o repasto sanguíneo (COMER, 1991). A constatação de numerosas populações desse carrapato nas áreas endêmicas para febre maculosa é um achado comum, completando apenas uma geração por ano na região sudeste do Brasil, com os três estágios parasitários marcadamente distribuídos ao longo dos doze meses (OLIVEIRA, 1998; SOUZA, 1990). As larvas predominam de abril a julho, as ninfas de julho a novembro e os adultos de novembro a março (LABRUNA et al., 2002).

Nos Estados Unidos os principais vetores da *R. rickettsii* são os carrapatos do gênero *Dermacentor* e são comumente encontrados parasitando cães, os quais são identificados como carreadores dos carrapatos para o ambiente humano. Em regiões onde o *Dermacentor* é o principal vetor da doença, os cães podem ser utilizados como animais sentinela da situação epidemiológica (MCDADE; NEWHOUSE, 1986).

As riquetsias do SFG foram diagnosticadas em várias regiões do mundo, como Israel, EUA, Zimbábue, Slovakia, Holanda, Suécia, Argentina, Suíça, China, Japão, França e outros, apresentando uma distribuição em regiões tropicais e subtropicais (BEATI et al., 1994; EGENVALL et al., 1997; ISHIKURA et al., 2002; MARTINO et al., 2001; ZHANG et al., 1995; RAOULT et al., 2001). No Brasil as áreas de ocorrência de casos humanos de febre maculosa estão concentradas nos estados de São Paulo e Minas Gerais (GALVÃO; RIBEIRO, 1993; HORTA, 2002) e têm se caracterizado, epidemiologicamente, como surtos localizados, com ocorrência de casos com intervalos de tempos irregulares e espaçados (GALVÃO et al., 1996; LEMOS et al., 1997). Apenas a febre maculosa é reconhecida, atualmente, como uma

doença transmitida para humanos por carrapatos em nosso país (ABEL, 1999). Apesar da deficiência no sistema de registro de casos, estudos recentes demonstram a manutenção da doença na região endêmica (LIMA et al., 1995).

Nos últimos anos, vários casos de febre maculosa em seres humanos têm sido relatado, principalmente nos estados de Minas Gerais e São Paulo. No período de 1985 a 2000, foram notificados 47 casos de Febre Maculosa no estado de São Paulo, sendo que desse total, 19 foram diagnosticados na cidade de Pedreira e 25 em cidades vizinhas (Jaguariúna, Amparo e Campinas) (LIMA et al., 2001). No entanto, o número de casos não diagnosticados ou sub-notificados pode ser bem maior. Em 1992 foi realizado o isolamento de *Rickettsia* sp em biópsia de pele em cultivo celular e submetido a IFI, por Melles et al. (1992), observando-se altos títulos de anticorpos anti-*R. rickettsii*, sugerindo a presença desse agente. Até o presente momento, no Brasil, as riquetsias identificadas através de Sequenciamento genético são: *R. bellii*, em carrapato *Amblyomma cooperi* (LABRUNA et al., 2001), *R. rickettsii* em sangue de seres humanos (NASCIMENTO et al., 2001) e *R. felis*, em pulgas (OLIVEIRA, 2002).

A necessidade de reservatórios para a circulação da doença e a manutenção do agente na natureza é fundamental. A capivara (*Hydrochoerus capybara*) é um potencial reservatório de *Rickettsia* spp (BURGDORFER, et al., 1962), uma vez que foi demonstrada, através de infecção experimental, sua capacidade de mantê-la circulante em seu organismo, sem apresentar sinais clínicos da doença (PEREIRA; LABRUNA, 1998; TRAVASSOS; VALLEJO, 1942). Isolamentos do agente foram realizados também em gambá (*Didelphis marsupialis*) nos estados de Minas Gerais e São Paulo. Alguns cães (*Canis familiaris*), provenientes de áreas endêmicas, apresentaram testes positivos para a doença, verificados através de reações de *Weil-Felix* (DIAS; MARTINS, 1939). Os equinos apresentam grande importância na epidemiologia dessa rickettsiose sendo o principal hospedeiro desse artrópode.

Em estudos epidemiológicos realizados por Lemos et al., (1996c) testaram soros de eqüinos de região endêmica e observaram altos títulos positivos na IFI, sem observar sinais clínicos.

A ecologia e a distribuição geográfica do carrapato vetor determinam os principais aspectos epidemiológicos da febre maculosa brasileira (LEMOS et al., 1997; RAOULT; ROUX, 1997). A doença determina uma prevalência sazonal definida, apresentando número de casos mais abundantes de setembro a novembro, abrangendo a primavera e início de verão (DIAS; MARTINS, 1939; GALVÃO, 1996; LEMOS et al., 1997). A incidência da doença no homem depende em grande parte da ecologia e distribuição da espécie vetora envolvida (LEMOS et al., 1996c). No entanto, os casos humanos de febre maculosa apresentam um caráter sazonal, com a grande maioria ocorrendo no segundo semestre do ano, quando predominam as formas de ninfas do *A. cajennense* (DIAS; MARTINS, 1939; LIMA et al., 1995; OLIVEIRA, et al., 2000). Ao entrar em contato com o artrópode, uma rápida remoção previne a infecção, pois é necessária uma fixação do carrapato de 5 a 20 horas para que ocorra a transmissão (COMER, 1991). Isso poderia explicar a escassez de casos de febre maculosa nos meses de verão, quando predominam os adultos de *A. cajennense*. O carrapato adulto, além de apresentar o estágio menos populoso do ciclo de uma geração, mostra uma menor predileção para o parasitismo em seres humanos. Além disso, apresenta uma picada mais dolorosa, o que diminui a probabilidade de uma pessoa permitir que um adulto fique fixado por mais de cinco horas em sua pele. Por outro lado, as infestações com larvas desse carrapato em seres humanos são as mais intensas, dadas as pequenas dimensões desse estágio. Uma larva supostamente infectada poderia, facilmente, passar várias horas fixada em uma pessoa. Entretanto, a escassez de casos humanos de febre maculosa nos meses de abril a junho, quando ocorrem os picos de larvas de *A. cajennense* nas vegetações, coloca em questão a magnitude desse tipo de transmissão. Por outro lado, a capacidade natural da larva infectada de transmitir o agente para o hospedeiro não pode ser descartada, pois testes laboratoriais

realizados nos Estados Unidos comprovaram que larvas de *D. andersoni* puderam transmitir a riquetsia para pequenos mamíferos (MCDADE; NEWHOUSE, 1986; RICKETTS, 1909). Vale ressaltar que a distribuição geográfica de animais silvestres, já apontados como reservatórios da febre maculosa brasileira, abrange largas áreas contíguas do território nacional onde existe o *A. cajennense*, independente da endemicidade (DIAS; MARTINS, 1939; TRAVASSOS; VALLEJO, 1942). A febre maculosa pode ser considerada uma zoonose reemergente no Brasil, e as informações sobre a cadeia de transmissão da doença ainda são incipientes.

Embora a febre maculosa seja de caráter endêmico, diferentes níveis de infectividade em seres humanos e animais podem ocorrer em área não endêmica. Poucas pesquisas sorológicas foram realizadas em área não endêmica no Brasil. A maioria dos estudos têm se concentrado em área endêmica onde a ocorrência de casos fatais se manifesta constantemente, portanto, a escassa bibliografia existente sobre a febre maculosa no Brasil refere-se a áreas endêmicas. O conhecimento da epidemiologia em região com potencial biótico para o desenvolvimento da doença consiste em determinar as condições socioeconômicas da população, a distribuição e densidade dos vetores já incriminados como transmissores, as condições ecológicas das localidades e as espécies silvestres relacionadas como vetores. A influência dos fatores climáticos e ambientais regula em grande parte, a dinâmica populacional desses vetores, possibilitando um momento definido de intervenção, visando a quebra do ciclo parasitário quando já instalado. Nas regiões endêmicas, praticamente todos os casos surgiram no segundo semestre do ano, provenientes de localidades rurais, ao qual a população tem um contato mais próximo com os vetores (LE MOS et al., 1996b). Deve-se salientar que aspectos importantes ligados ao ambiente socioeconômico são mais evidentes quando se analisa a co-evolução da população brasileira e o crescimento dos plantéis de equinos e de bovinos. Esse fato permite inferir que o crescimento das populações potencialmente parasitáveis têm proporcionado ao

A. cajennense uma crescente fonte de recursos alimentares que resulta, inexoravelmente, no aumento de sua população (LEITE et al., 1999).

Estudos realizados por Magnarelli et al., 1981, demonstraram que o número de carrapatos infectados, detectados por Imunofluorescência Direta (IFD), não variou quando comparado com região não endêmica. Isso invalidaria o fato da infecção em carrapatos ser por si só um fator indicador de atividade riquetsial focal (LEMOS et al., 1997). O diagnóstico precoce de casos suspeitos, com a instituição imediata do tratamento, tem sido primordial para a redução da letalidade da doença. Sendo assim, o conhecimento da epidemiologia passa ter uma grande importância em regiões endêmicas e não endêmicas. Não se deve retardar o tratamento de um caso suspeito, na espera de confirmação do diagnóstico, pela alta letalidade apresentada pelas formas graves da doença. O conhecimento da epidemiologia das áreas endêmicas e o potencial biótico de áreas limítrofes e não endêmicas passa a ser um dado de extrema importância para subsidiar o diagnóstico precoce da doença (GALVÃO; RIBEIRO, 1993).

Conforme Melles et al., 1992, a doença manifesta-se no homem subitamente com febre contínua, calafrios, prostração, mal estar, mialgia, artralgia principalmente nos tornozelos, punhos e cefaléia após um período de incubação de 2 a 14 dias. Erupções cutâneas maculopapulares aparecem nas extremidades, entre 2º e 6º dia pós-infecção, estendendo-se para o resto do corpo, face e região palmar e plantar. Ao se replicar no endotélio vascular, uma vasculite se instala conduzindo a ativação de plaquetas, ativação do sistema de coagulação, trombose e aumento da permeabilidade vascular. Distúrbios hemostáticos, incluindo trombocitopenia e tempo prolongado de coagulação, estão relacionados com efeitos citopáticos celulares e atividades de endotoxinas da *R. rickettsii* (DAVIDSON et al., 1990).

Casos clínicos já foram descritos em cães nos Estados Unidos (McDADE; NEWHOUSE, 1986), mas no Brasil não há esse relato. A doença nesse animal manifesta-se com febre, que surge de dois a três dias pós-infecção, com lesões cutâneas sob a forma de

vesículas, petéquias ou ecimoses hemorrágicas, que aparecem após 4 a 6 dias, seguido de depressão, anorexia, descarga nasal, ocular, tumefação escleral, tosse, dispnéia e aumento de sons broncovesiculares. Anemia e leucocitose também podem estar presentes, além de injúrias no endotélio vascular que resulta em alterações da permeabilidade vascular (DROST et al., 1997).

Em eqüinos não há descrições de sinais clínicos e sintomatologia, apesar de geralmente apresentarem altos títulos (≥ 1024) de anticorpos anti-*R. rickettsii* (LEMOS et al., 1996c).

O tratamento da febre maculosa baseia-se em antibioticoterapia, e deverá ser instituído imediatamente quando houver suspeita da doença. Pacientes tratados nos primeiros dias de infecção normalmente apresentam melhora clínica em 24 a 72 horas. O alto índice de letalidade encontra-se em pacientes tratados após o 5º dia de decurso da doença, aliado a falta de inclusão da febre maculosa, pelos médicos, nos protocolos de diagnósticos (KIRLAND et al., 1995). Os antibióticos recomendados são as tetraciclinas (22 mg/kg a cada oito horas), cloranfenicol (15 a 20 mg/kg, a cada oito horas) e doxyciclina (5,0 mg/Kg a cada 12 horas) e a duração do tratamento deve levar em conta o quadro geral do paciente, sendo mantido até confirmação de melhora clínica (BREITSCHWERD et al., 1997; MARTINO et al., 2001; WEI et al., 1999).

Embora o diagnóstico de febre maculosa baseie-se em sinais e sintomas clínicos característicos, o mesmo requer confirmação laboratorial para distinção de outras doenças (GALVÃO, 1996). A confirmação laboratorial pode ser feita: através da pesquisa de anticorpos específicos, presentes alguns dias após o aparecimento da doença; através do isolamento do agente em amostras de sangue ou biópsia de pele e, ainda, de amostras de carrapatos coletados de paciente ou de animais reservatórios e de vida livre no meio ambiente. O isolamento a partir de sangue ou biópsia de pele, através de cultivo celular, pode resultar

em diagnóstico precoce da doença, pois na fase inicial de riquetsemia pode ainda não apresentar anticorpos detectáveis no sangue. A detecção e ou isolamento de riquetsias também permite estabelecer em pesquisas, as delimitações de áreas endêmicas (MELLES et al., 1999). O isolamento de riquetsias de carrapatos torna-se difícil, devido a presença de outras bactérias em co-infecções e ao fato das riquetsias do SFG serem sensíveis à maioria dos antibióticos, os quais não podem ser incluídos em meios de cultura (ROUX et al., 1996 e MELLES et al., 1999). Entre as vantagens do isolamento do agente em cultivo celular, quando realizado a partir de amostras de carrapatos, está a recuperação de maiores quantidades do agente para posteriores estudos (MELLES et al., 1999; PHILLIP et al., 1978). Uma metodologia de isolamento de riquetsias do SFG em cultivo celular (Células Vero) foi modificada por Kelly et al., (1991) para identificar o agente etiológico em carrapatos preservados congelados a -70°C , permitindo diagnósticos após um longo prazo de conservação.

A análise da sequência gênica de nucleotídeos de determinados genes constitui-se em um método bastante apropriado para identificação e análise filogenética de diferentes espécies de riquetsias (REGNERY et al., 1991). Embora esse método não possa ser utilizado na rotina para o diagnóstico de múltiplas espécies de riquetsias, atualmente é uma importante ferramenta nas pesquisas que visa caracterizar novos isolados ou espécies (BILLINGS et al., 1998). Nos últimos anos, vários autores têm utilizado a técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para detecção de riquetsias em triturados brutos de carrapatos (BEATI et al., 1995; BILLINGS et al., 1998; BURKET et al., 1998; ISHIKURA et al. 2002). Entretanto, deve-se salientar que esta técnica tem mostrado melhores resultados quando realizada com carrapatos de vida livre (em jejum), devido a presença de sangue nos carrapatos já alimentados, podendo interferir no isolamento de DNA (BURKET et al., 1998).

Os recentes progressos nas técnicas laboratoriais para o estudo das riquetsias, principalmente com o uso de Biologia Molecular, vêm possibilitando a identificação de novas

espécies em todo o mundo. Além disso, esses estudos possibilitam a identificação de espécies patogênicas já conhecidas, em áreas ou continentes nunca reportados anteriormente (BILLINGS et al., 1998; EREMEEVA et al., 1994). A caracterização molecular de um novo agente foi realizada por Bouyer et al. (2001), que amplificou pela PCR o gene Citrato Sintase (CS) e 190 kDa que codifica a proteína Omp A, sendo compatível a análise gênica com a *R. felis*, em pulgas, naturalmente infectadas, notificando a caracterização de um novo exemplar do SFG, patogênico ao homem.

Uma técnica apropriada para comparar amostras de alta e baixa virulência de uma mesma espécie de riquetsia é o seqüenciamento de parte do DNA genômico, especialmente dos genes que codificam as proteínas OmpA e OmpB, as quais desempenham importante papel na patogenicidade das riquetsias do SFG (ANACKER et al., 1986; ANDERSON et al., 1990). A análise fragmento genômico específico tem sido utilizada para comparar relações entre várias espécies de riquetsias. Essa técnica permite o estudo de análise filogenética (ISHIKURA et al., 2002), mas ainda não é utilizada em rotinas de diagnóstico de múltiplos isolados (ZHANG et al., 1997). Esse método dispensa o cultivo celular e protocolos de purificação de proteínas e requer apenas pequenas alíquotas de riquetsia viva ou morta e pode estimar diferenças gênicas entre genes selecionados (ZHANG et al., 1996).

A IFI vem sendo largamente utilizada para o diagnóstico sorológico em seres humanos e animais (DEL GUERCIO et al., 1997; HENKE et al., 1990; JONES et al., 1993; LEMOS et al., 1996c; LEMOS et al., 1997). De modo geral, as espécies do SFG compartilham antígenos de superfície, os quais ocasionam reações positivas com soros heterólogos. Dessa forma, uma reação sorológica positiva contra uma espécie de *Rickettsia* do SFG indica apenas infecção por uma espécie desse grupo, não sendo suficiente para identificação da espécie. A confirmação sorológica de infecção ativa requer um título maior ou igual a 64 (DEL GUERCIO, et al., 1997). A confirmação de uma infecção recente deve se basear em um

aumento nos títulos de amostras pareadas, pois títulos altos podem persistir por vários anos em alguns pacientes infectados com riquetsias do SFG. A IFI apresenta uma sensibilidade de 94 a 100% e especificidade de 100% (MELLES et al., 1999), ainda que os resultados não revelam confiabilidade com o agente etiológico, podendo apresentar reações cruzadas com outras riquetsias não patogênicas (LE MOS et al., 1994; DEL GUERCIO et al., 1997), porém esse teste tem sido preconizado como método padrão para o diagnóstico laboratorial.

Para o propósito de diferenciação entre as espécies do SFG são utilizadas técnicas baseadas no padrão eletroforético de riquetsias e na identificação imunológica de epítomos específicos no padrão de polipeptídeo (*Western Blotting*). No entanto, o método exige que o antígeno utilizado sofra uma purificação rigorosa, eliminando restos celulares do meio de cultura, sem que ocorram modificações estruturais importantes nas proteínas e epítomos da riquetsia (REGNERY et al., 1991). Beati et al., (1994), demonstraram que riquetsias do SFG continham antígenos protéicos de alta massa molecular, espécies específicas, que foram detectados por *Western Blotting*. Portanto, esse teste é útil para confirmar resultados de diagnósticos sorológicos obtidos através de testes convencionais, sendo especialmente utilizado na diferenciação de falsos resultados gerados por reações cruzadas, tanto entre riquetsias dos dois grupos (TG e SFG), quanto entre espécies do mesmo grupo (LA SCOLA; RAOULT, 1997).

A utilização de vários testes diagnósticos tem sido preconizado para se pesquisar a presença de riquetsias do SFG em carrapatos. Os testes usualmente realizados são: Teste de hemolinfa, IFD, ELISA e PCR. Apesar de sua baixa especificidade devido ao grande número de resultados falsos positivos, o teste de hemolinfa vem sendo empregado como rotina para o diagnóstico do agente em carrapatos. O baixo custo aliado a utilização do microscópio ótico, auxilia na triagem dos carrapatos positivos para se estimar a prevalência em vários estudos de diagnósticos (BEATI et al., 1994a), porém a visualização da morfologia dos microorganismos

nos hemócitos do carrapato auxilia em uma classificação preliminar, sendo necessário uma correta determinação das espécies através da IFD, PCR e métodos de isolamento. A pequena concentração de riquetsias nos carrapatos pode ser contornada pela incubação prévia desses a 37°C, por 24-48 horas, o que estimula a replicação da bactéria. No entanto, o número de hemócitos entre diferentes espécies é bastante variável e nem todas as células estarão infectadas. Assim, as possibilidades de erros no diagnóstico existem e são maiores quando pequenas quantidades de hemolinfa estão disponíveis (BURGDORFER, 1970). A utilização do ELISA de captura para esse fim mostrou alta sensibilidade, diminuindo a subjetividade da leitura em relação ao teste de hemolinfa e IFD (RADULOVIC et al., 1994).

A IFD vem sendo utilizada como o teste de eleição para o diagnóstico em carrapatos, apesar de sua complexidade. Todavia, o teste de maior sensibilidade e especificidade é o PCR, possibilitando a determinação de gênero e espécie do agente.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

O estudo foi realizado em três propriedades rurais de área endêmica e outras três propriedades de área não endêmica do estado de São Paulo. As localizações dentro dos municípios estão descritas na Tabela 1 e podem ser melhor visualizadas na Figura 1.

Tabela 1 – Características das propriedades rurais envolvidas nos trabalhos e respectivas localizações obtidas através do uso de GPS (Garmin GPS 12XL/Garmin Corp.; 1998). São Paulo - 2002

Propriedade	Área	Município	Localização
			Latitude e Longitude
Fazenda Duas Pontes	Endêmica	Pedreira	S22°41'14" e O46°53'17"
Fazenda Quitandinha	Endêmica	Pedreira	S22°44'19" e O46°55'27"
Fazenda Monte Nilo	Endêmica	Pedreira	S22°47'03" e O46°54'10"
Fazenda e Haras Conforto	Não Endêmica	Porto Feliz	S23°23'14.85 W47°26'14.5"
Fazenda São João	Não Endêmica	Cotia	S23°36'42.6" e W46°57'29.4"
Fazenda FMVZ-USP – Campus Pirassununga	Não Endêmica	Pirassununga	S21°57'07.2" e W47°27'05.4"

Figura 1 – Mapa do estado de São Paulo indicando os municípios das áreas de estudos e distância com relação a capital.

4.1.1 Área endêmica

As Fazendas Monte Nilo e Quitandinha localizam-se às margens do rio Jaguari, sendo que toda a margem desse rio, que corta os municípios de Pedreira, Amparo e Jaguariúna, pode ser considerada área endêmica para a febre maculosa. A Fazenda Monte Nilo, em particular, está a menos de 100 m da antiga fábrica da Nadir Figueiredo, onde estudos prévios com febre maculosa foram realizados e a doença foi diagnosticada em pessoas dessa localidade com históricos de óbitos (LEMOS et al., 1996a,b; LEMOS et al., 1997). As diferentes áreas estudadas apresentam características geográficas semelhantes, porém a densidade populacional e características de manejos de solos das pastagens são diferenciadas. A Fazenda Monte Nilo não realizava atividades agropecuárias, as pastagens estavam abandonadas e alguns eqüinos estavam soltos na propriedade, com alguns pontos de vegetação nativa. Na Fazenda Duas Pontes houve um caso fatal de febre maculosa em ser humano, no ano de 1999. O diagnóstico foi realizado no município de Amparo por um médico experiente em diagnóstico da febre maculosa, que se baseou nas características clínicas e epidemiológicas do caso. A propriedade localiza-se às margens do rio Camanducaia, um afluente do rio Jaguari. Na Fazenda Quitandinha existe uma pousada de lazer, onde existe um afluxo muito intenso de turistas. Há uma criação de eqüídeos para lida e lazer. Os cães existentes mantêm a guarda da propriedade e tem acesso aos pastos por onde circulam os eqüídeos. Nas três propriedades foram encontradas fezes de capivaras. Os trabalhadores das propriedades apresentavam relatos de constantes picadas de carrapatos.

4.1.2 Área não endêmica

A Fazenda e Haras Conforto tem como exploração econômica a criação de eqüinos com acompanhamento Médico Veterinário periódico e realiza um controle sanitário efetivo do plantel. Há apenas um cão de guarda. Em determinadas áreas da propriedade a pastagem é cultivada e é realizado o manejo de solo das pastagens. Existe uma outra área de mata nativa utilizada, muitas vezes, para pastejo dos animais. Há uma represa nos fundos da propriedade onde os animais consomem água. Foram encontradas fezes de capivara próxima a represa.

Na Fazenda São João, a exploração econômica é a criação de eqüinos para comercialização. O plantel totalizava 38 animais entre jovens e adultos. Não era realizado qualquer manejo na pastagem e apresentava-se com muitas plantas daninhas e nativas no local. Havia carcaças e ossadas de animais dispersos pelo pasto. Nessa propriedade reside apenas uma família composta por três pessoas.

Devido as atividades didáticas pedagógicas realizadas na Fazenda da escola da FMVZ-USP – Campus Pirassununga, o trânsito de animais e pessoas é muito intenso. Os eqüinos ficam alojados em área separada dos outros animais. A pastagem é cultivada para a exploração dessa atividade. Não há acesso de outras espécies animais na área onde circulam os eqüinos. Os eqüinos alojados na sub estação do laboratório de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal -VPS encontravam-se com uma carga parasitária de carrapato muito elevada, devido a um experimento científico realizado anteriormente. O pasto que ficava esses animais apresentava-se muito sujo e com uma extensa área alagada. Nesta área os trabalhadores, docentes, discentes e demais contactantes também relataram contato com carrapatos.

4.2 Amostragem

Os carrapatos da espécie *A. cajennense* foram colhidos nas três propriedades de área endêmica e não endêmica durante as épocas de predomínio dos estágios adultos, nas pastagens ou matas presentes nas propriedades, sob a forma de vida livre, conforme dados de variação sazonal desse vetor obtidos no estado de São Paulo (LABRUNA et al., 2002). Cada propriedade foi visitada entre os meses de dezembro e fevereiro (pico da população de adultos). Foi realizada mais de uma visita por área de estudo, para alcançar o número de carrapatos desejado. Os exemplares dos carrapatos adultos foram colhidos por armadilhas de dióxido de carbono (CO_2), segundo Oliveira, (1998), ilustrada na Figura 2.

Figura 2 – Armadilha de CO_2 utilizada para captura de *A. cajennense* adultos de vida livre, nas áreas de estudo. São Paulo - dez.-2000.

Nas propriedades rurais, os carrapatos capturados foram mantidos vivos e imediatamente colocados em embalagens plásticas, vedadas com tampas contendo pequenos

furos, para oxigenação e acondicionadas em embalagens térmicas refrigeradas, no mesmo dia da colheita e encaminhadas ao laboratório do setor de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

O número de exemplares colhidos foi calculado estatisticamente de acordo com Thrusfield, (1995), conforme as taxas de infecção por riquetsias do SFG reportadas em populações de carrapatos, que oscilam ao redor de 1% no Brasil (LEMOS et al., 1997). A distribuição das amostras por propriedades foi representada na Tabela 2. Somente foram considerados para este estudo os carrapatos *A. cajennense*. Os ixodídeos foram examinados em microscópio estereoscópico (Stemi SV 11, Zeiss® - Germany) e a identificação taxonômica foi realizada segundo Aragão e Fonseca (1961). As distribuições dos carrapatos identificadas por sexo estão representadas na Tabela 3.

Tabela 2 – Distribuição das amostras de carrapatos *A.cajennense*, de acordo com a localidade, colhidos em áreas endêmicas e não endêmicas, para febre maculosa. São Paulo – nov.-2000 / mar.-2001

Tipo de Área	Localidade	Propriedade	Nº <i>A. cajennense</i> Total (%)
Endêmica	Pedreira (SP)	Fazenda Duas Pontes	213 (14,4)
	Pedreira (SP)	Fazenda Monte Nilo	353 (24)
	Pedreira (SP)	Fazenda Quitandinha	244 (16,6)
Sub total			810 (55,1)
Não Endêmica	Cotia (SP)	Fazenda São João	206 (14)
	Porto Feliz (SP)	Haras Conforto	222 (15,1)
	Pirassununga (SP)	Fazenda FMVZ – USP Campus Pirassununga	230 (15,6)
Sub total			658 (44,9)
Total			1468 (100)

Tabela 3 – Distribuição das amostras de carrapatos *A. cajennense* colhidos em áreas endêmicas e não endêmicas, para febre maculosa, por sexo, de acordo com a localidade. São Paulo - nov.-2000 / mar.-2001

Tipo de Área	Propriedade	<i>A. cajennense</i>	
		Machos (%)	Fêmeas (%)
Endêmica	Fazenda Duas Pontes	88 (41,6)	125 (58,4)
	Fazenda Monte Nilo	184 (52,2)	169 (47,8)
	Fazenda Quitandinha	102 (41,8)	142 (58,2)
Sub total		374 (46,1)	436 (53,9)
Não Endêmica	Fazenda São João	99 (48)	107 (52)
	Haras Conforto	108 (48,6)	114 (51,4)
	Fazenda FMVZ – USP	120 (52,4)	110 (47,6)
	Campus Pirassununga		
Sub total		327 (48,7)	331 (50,3)
Total		702 (47,7)	767 (52,2)

4.3 Teste de hemolinfa de *A. cajennense*

No laboratório do VPS, os carrapatos foram incubados em estufa por 24 horas a 36 °C e umidade relativa de 80%, com o objetivo de recuperá-los do estresse hídrico sofrido na captura e transporte, além de favorecer a multiplicação das riquétsias. Após 24 horas os carrapatos foram retirados da estufa. De cada exemplar foi seccionada a porção distal de uma das patas e uma a duas gotas de hemolinfa aplicada em lâmina de vidro limpa e desengordurada. As lâminas foram fixadas ao calor, coradas pelo método de GIMENEZ (1964) e examinadas ao microscópio óptico (aumento de 1200X). Posteriormente os carrapatos foram acondicionados em tubos tipo eppendorf, em caixas de papel, segundo cada propriedade, adequadamente numerados, anotados os sexos e armazenados em freezer – 70°C para o processamento da PCR. O Teste de Hemolinfa foi utilizado como um método de

triagem para identificar os carrapatos adultos infectados por riquetsias, pertencentes ou não ao grupo da febre maculosa (BURGDORFER, 1970).

4.4 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

4.4.1 Extração de DNA Riquetsial.

A extração foi realizada segundo Chomkzynski (1993) com modificações, descrito o protocolo no Anexo 1. Cada carrapato foi descongelado, lavado em álcool 70% por 10 minutos, enxaguado em água corrente e seco em papel absorvente. Em seguida, com uma lâmina de bisturi estéril, realizou-se um corte ao meio do carrapato no sentido longitudinal, produzindo duas partes simétricas. A metade destinada a extração de DNA para PCR e *n*-PCR foi triturada com o auxílio de ponteira de polipropileno e a outra metade foi novamente levada ao freezer - 70°C. As amostras foram manipuladas em gelo seco e os procedimentos foram realizados de forma a manter os carrapatos o menor tempo possível descongelados.

Carrapatos positivos obtidos através da infecção experimental com amostra padrão *Rickettsia parkeri*, cultivada em células VERO¹, foram utilizados como controle positivo em todas as reações de amplificação. As riquetsias foram inoculadas em carrapatos para mimetizar as amostras de campo. Os carrapatos *A. cajennense* são mantidos no laboratório de Doenças Parasitárias do VPS há várias gerações. A manutenção foi realizada através de incubadora tipo BOD (Câmara climática com alternância de temperatura MA 402 – Marconi® - SP-Brasil), a 27°C e umidade relativa de 85% e alimentados em coelhos (Anexo 2).

Os carrapatos que deram origem à colônia foram trazidos de áreas não endêmicas para a febre maculosa. Esses carrapatos foram submetidos ao mesmo procedimento de extração de DNA utilizados nas amostras de campo.

¹ Amostra gentilmente cedida por Dr. David Walker, Universidade do Texas.

4.4.2 Oligonucleotídeos iniciadores

Para a amplificação de DNA riquetsial foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) (Invitrogen/Life Technologies®-California-EUA) descritos na Tabela 4.

Tabela 4 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para identificação genotípica de espécies e amostras de riquetsias do grupo da febre maculosa. São Paulo, 2002

Espécie de Origem	Gene	Seqüência de Nucleotídeo (5'-3')	Tamanho do Produto Amplificado
R. rickettsii	17 kDa	GCTCTTGCAACTTCTATGTT CATTGTTTCGTCAGGTTGGCG	434 pb
R. typhi	17 kDa - Nested	CATTACTTGGTTCTCAATTCGGT GTTTTATTAGTGGTTACGTAACC	230 pb

4.4.3 Detecção de riquetsias através do gene 17 kDa

Um par de *primer* gênero específico, que amplifica uma região do gene que codifica uma proteína interna de membrana de 17 kDa (AZAD et al., 1990), foi utilizado na PCR com o DNA extraído. O uso de um segundo *primer* descrito na Tabela 4 permitiu a realização da técnica *n*-PCR, de maior sensibilidade (SCHRIEFER et al., 1994), que consiste em uma nova reação do produto do PCR. As reações de amplificação foram realizadas a partir de modificações no protocolo de Webb (1990). As amostras foram testadas sob a forma de *pools*, contendo o material extraído de cinco carrapatos. As concentrações e volumes de reagentes e

primers utilizados na PCR e *n*-PCR são descritas na Tabela 5, conforme adaptação da técnica, preconizada por Regnery et al., (1991). As reações estão sumarizadas na Tabela 6.

4.4.4 Avaliação do desempenho da *n*-PCR

Devido a dificuldade em se determinar o limiar de detecção da técnica para riquetsias presentes em carrapatos, optou-se por avaliar o desempenho da *n*-PCR através de diluições sucessivas do controle positivo.

As diluições foram feitas em material extraído de carrapatos negativos. Partindo-se de uma alíquota do controle positivo puro, foram feitas diluições seriadas em base dez, obtendo-se as seguintes amostras:

- 1 (controle positivo puro), 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}

Tabela 5 – Concentração de reagentes empregados na reação em cadeia pela polimerase (PCR), segundo o gene pesquisado. São Paulo, 2002.

Reagentes	17 kDa	17 kDa Nested-PCR
Tampão Buffer 10X	5 µl	5 µl
Nucleotídeos trifosfatados (dNTP 1,25 mM)	8 µl	8 µl
MgCl ₂ (50mM)	1,5 µl	1,5 µl
Primer #1 10 (pmoles/µl)	2,5 µl	2,5 µl
Primer #2 10 (pmoles/µl)	2,5 µl	2,5 µl
Taq (5000 U/mL)	0,25 µl	0,30 µl
H ₂ O miliQ q.s.p 50 µl	25,25 µl	20,20 µl
Glicerol	-	5 µl
Amostra	5 µl	5 µl

Tabela 6 – Condições de amplificação das diferentes reações, conforme o gene pesquisado.
São Paulo, 2002

Etapas	17 kDa	17 kDa Nested- PCR
Desnaturação inicial	94°C – 3 min	94°C – 3 min
Número de ciclos	35	25
Desnaturação	94°C - 45 seg	94°C - 45 seg
Anelamento	56°C – 30 seg	56°C – 3 seg
Extensão	72°C – 90 seg	72°C – 90 seg
Extensão final	72°C – 10 min	72°C – 10 min

4.5 Análise dos produtos amplificados

A visualização dos produtos amplificados foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 2% (p/v), em cuba horizontal com tampão de corrida TBE 0,5X (0,045 M Tris-borato e 0,001 M EDTA, pH 8,0). O gel foi submetido à voltagem constante de 6-7 V/cm durante 40 minutos. A imersão do gel em solução de brometo de etídio a 0,5 µg/ml por 20 minutos e a posterior observação em transiluminador ultravioleta possibilitou a visualização das bandas (SAMBROOK et al., 1989). Essas foram comparadas com o padrão de peso molecular que possuía fragmentos múltiplos de 100 pares de bases. O registro fotográfico foi realizado através da câmera digital (DC- 40 - Kodak - New York - EUA).

4.6 Purificação dos produtos amplificados e quantificação de DNA

Após a separação dos produtos de *n*-PCR, por eletroforese, as bandas de interesse foram purificadas através de kit comercial, seguindo as instruções do fabricante (CONCERT

Rapid Gel Extraction System, Invitrogen/Life Technologies).

A quantificação do DNA das amostras purificadas foi realizada utilizando-se padrão de peso molecular *low mass*, segundo as recomendações do fabricante (Invitrogen/Life Technologies®-California-EUA).

4.7 Seqüenciamento

O DNA obtido, após a reação de *n*-PCR, purificado e quantificado foi utilizado para a reação de Seqüenciamento. Foi utilizado o *kit* comercial *BigDye™ terminator – cycle sequencing ready reaction – Applied Biosystems* (Applied Systems®), e o protocolo foi descrito no Anexo 3. Após a amplificação, descrita no item anterior, o DNA foi purificado através de precipitação com etanol, conforme descrito no manual do *kit* “ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction”. Efetuada a precipitação, as amostras foram submetidas ao seqüenciador automático ABI Prism 310, (Applied Biosystems), segundo instruções do manual Automated DNA Sequencing. As seqüências dos fragmentos amplificados foram alinhadas manualmente com o auxílio dos programas Chromas 1.45 (www.technelysium.com.au/chromas.html) e BioEdit *Sequence Alignment Editor* (HALL, 1999).

O programa BioEdit foi utilizado para a tradução automática das seqüências de nucleotídeos e para o cálculo do grau de identidade entre as seqüências analisadas.

4.8 Pesquisa de riquetsia em soros de seres humanos e animais

Com o objetivo de realizar os exames de IFI foram colhidos sangue de eqüinos, caninos e seres humanos presentes no momento das visitas às propriedades rurais. Cada amostra foi anotada em uma ficha com os seguintes dados: Soro animal - nome, espécie, raça, sexo, idade; Soro humano - nome, idade, sexo, profissão, tempo de residência na propriedade. Foi realizada colheita de sangue venoso através de venocentese na veia braquial do ser humano e dos animais da braquial ou jugular. O sangue foi acondicionado em tubos de vidro estéreis, identificado e acondicionado em caixa térmica para transporte ao laboratório do VPS. Em seguida, foi realizada a centrifugação, com retração do coágulo e a obtenção do soro. Os soros sangüíneos foram aliquotados e estocados em microtubos de polipropileno (tipo eppendorf) previamente identificados. Os soros foram congelados a - 20°C e descongelados no momento da realização da IFI.

As quantidades de soro humano, eqüino e canino, obtidas por procedência estão representadas na Tabela 7.

Tabela 7 – Soros de humanos, eqüinos e caninos colhidos em regiões endêmicas e não endêmicas para febre maculosa. São Paulo, 2001

Área	Local	Propriedade	Soros Humanos	Soros Animais	
				Eqüinos	Caninos
Endêmica	Pedreira	Faz. Duas Pontes	20	12	4
	Pedreira	Faz. Monte Nilo	9	5	6
	Pedreira	Faz. Quitandinha	21	11	6
Sub Total			50	28	16
Não Endêmica	Cotia	Faz. São João	2	11	4
	Porto Feliz	Haras Conforto	4	16	0
	Pirassununga	Campus da USP Pirassununga	10	21	1
Sub Total			16	48	5
Total			66	76	21

4.8.1 Imunofluorescência Indireta (IFI)

Todos os soros de humanos e de animais domésticos, colhidos nas fazendas estudadas, foram submetidos à IFI, sob supervisão do Dr. Márcio A. M. Galvão². As lâminas contendo antígeno específico de *R. rickettsii* foram fornecidas pelo Dr. David H. Walker³. Foram considerados positivos os soros com títulos ≥ 64 . O protocolo da reação está descrito no Anexo 4. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de imunofluorescência epifluorescente, marca Nikon®, modelo Eclipse E600.

² Universidade Federal de Ouro Preto/Minas Gerais.

³ Universidade do Texas/E.U.A.

5 RESULTADOS

5.1 Teste de hemolinfa de *A. cajennense*

Em visitas às propriedades, antes do início deste trabalho, foram realizadas algumas capturas de carrapatos nas pastagens para verificação da presença de *A. cajennense*, espécie alvo deste estudo. Já nessas visitas, havia sido constatada a presença de duas espécies de carrapatos (*A. cajennense* e *A. coopeeri*). Sendo assim, os adultos capturados foram examinados e classificados antes de utilizá-los como amostra. Foram encontrados 1428 (97,2%) *A. cajennense* em região endêmica e não endêmica e 40 (2,8%) *A. coopeeri* em região endêmica. Não foi observada a presença desse carrapato em região não endêmica. Das 1468 amostras processadas para o teste de hemolinfa, não foram identificadas formas características das riquetsias nos hemócitos dos carrapatos, sendo, portanto, todas as amostras negativas. Houve perdas relacionadas à deposição de corantes alteradas pelo pH da hemolinfa do carrapato, que impossibilitaram a leitura.

5.2 Pesquisa de DNA riquetsial

A diluição de 10^{-1} a 10^{-8} de DNA extraído de *A. cajennense* infectado com *Rickettsia parkeri*, utilizado como controle positivo mostrou que a *n*-PCR foi capaz de diagnosticar até a sétima diluição.

Os respectivos resultados das reações de *n*-PCR encontram-se nas Tabelas 8 e 9. Apenas em uma propriedade de área não endêmica foi detectada a presença de *Rickettsia* spp. Nas Figuras 3 e 4 encontram-se ilustradas os resultados da *n*-PCR de algumas amostras positivas de região endêmica e não endêmica.

Tabela 8 – Resultados das reações de *n*-PCR realizados em carrapatos *A. cajennense* colhidos em região considerada endêmica. São Paulo, 2002

Propriedade	Amostragem (n)	Positivos (n %)
Fazenda Duas Pontes	213	7 (3,3%)
Fazenda Monte Nilo	229	9 (3,9%)
Fazenda Quitandinha	244	18 (7,3%)
Total	686	34 (4,9%)

Tabela 9 – Resultados das reações *n*-PCR realizados em carrapatos *A. cajennense* colhidos em região considerada não endêmica. São Paulo, 2002

Propriedade	Amostragem (n)	Positivos (n %)
Fazenda São João	206	0
Fazenda e Haras Conforto	222	0
Fazenda FMVZ-USP – Campus Pirassununga	230	6 (2,6%)
Total	658	6 (0,9%)

Figura 3 – Resultados da reação de *n*-PCR em gel de agarose 2%, realizado com o primer 17 kDa, em carrapatos *A. cajennense*, colhidos na Fazenda Quitandinha considerada região endêmica. A amplificação dos fragmentos de DNA com tamanho de 230 pb foi demonstrado na canaleta 3 (reação positiva) e 8 (controle positivo). As amostras das canaletas 1, 2, 4, 5, 6, 7 e 9 apresentaram resultados negativos. São Paulo, 2002.

Figura 4 – Resultados da reação de *n*-PCR em gel de agarose 2%, realizado com o primer 17 kDa, em carrapatos *A. cajennense*, colhidos na Fazenda FMVZ-USP – Campus Pirassununga, considerada região não endêmica. A amplificação dos fragmentos de DNA com tamanho de 230 pb foi demonstrada nas canaletas 2 e 16 (controle positivo) e 4, 5, 6, 10, 11 e 19 (reação positiva). Nas canaletas 3, 9, 18 e 21 foram utilizados controles negativos. São Paulo, 2002.

5.3 Seqüenciamento

Duas amostras de região endêmica e seis de região não endêmica foram seqüenciadas e apresentaram à análise do fragmento de 230 pb, junto ao GenBank, 100% de similaridade com *Rickettsia felis*.

O grau de identidade entre as seqüências de nucleotídeos das amostras estudadas e as seqüências obtidas no GenBank, variou de 0,870 a 1,000, representada na Tabela 10. O alinhamento das seqüências são demonstrados nas Figuras 5 e 6.

Tabela 10 – Grau de identidade calculado para cada par de seqüências de nucleotídeos, entre as amostras estudadas de região considerada endêmica e as seqüências obtidas no GenBank. São Paulo, 2002

	<i>R.par</i>	<i>R.aus</i>	<i>R.hon</i>	<i>R.jap</i>	<i>R.mon</i>	<i>R.rhi</i>	<i>R.ric</i>	<i>R.typ</i>	<i>R.amb</i>	<i>R.coo</i>	<i>R.fel</i>	<i>R.pea</i>	<i>R.con</i>	A1	A2
<i>R. parkeri</i>	1,000	0,956	0,994	0,983	0,983	0,989	1,000	0,887	0,962	0,924	0,903	1,000	1,000	0,903	0,903
<i>R. australis</i>	—	1,000	0,962	0,956	0,962	0,967	0,956	0,903	0,951	0,935	0,935	0,956	0,956	0,935	0,935
<i>R. honei</i>	—	—	1,000	0,989	0,989	0,994	0,994	0,892	0,967	0,930	0,908	0,994	0,994	0,908	0,908
<i>R. japonica</i>	—	—	—	1,000	0,978	0,983	0,983	0,887	0,956	0,924	0,903	0,983	0,983	0,903	0,903
<i>R. montanensis</i>	—	—	—	—	1,000	0,994	0,983	0,903	0,967	0,930	0,908	0,983	0,983	0,908	0,908
<i>R. rhiphicephali</i>	—	—	—	—	—	1,000	0,989	0,897	0,973	0,935	0,913	0,989	0,989	0,913	0,913
<i>R. rickettsii</i>	—	—	—	—	—	—	1,000	0,887	0,962	0,924	0,903	1,000	1,000	0,903	0,903
<i>R. typhi</i>	—	—	—	—	—	—	—	1,000	0,881	0,897	0,870	0,887	0,887	0,870	0,870
<i>R. amblyommii</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000	0,908	0,897	0,962	0,962	0,897	0,897
<i>R. cooley</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000	0,913	0,924	0,924	0,913	0,913
<i>R. felis</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000	0,903	0,903	1,000	1,000
<i>R. peacock</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000	1,000	0,903	0,903
<i>R. conorii</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000	0,903	0,903
Amostra A1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000	1,000
Amostra A2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000

Os valores grafados em vermelho referem-se a seqüências idênticas.

```

AAGGGCAAAGGACAGCTTGTCGGAGTAGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTTCTTGGT
GGACAAATAGGTGCAGGTATGGATGAGCAGGATAGAAGACTTGCTGAACTCACTTCACAA
AGAGCTTTAGAAGCAACACCTAGCGGCACTAGCGTAGAATGGCGTAATCCGGATAACGGT
AATCAT

```

Figura 5 – Amostra de fragmentos de DNA de riquetsia obtida na *n*-PCR do gene 17 kDa, realizado em carrapato *A. cajennense* da Fazenda Quitandinha considerada região endêmica. Sequência de nucleotídeos alinhados de 186 pares de bases. A análise dos fragmentos apresentou compatibilidade com riquetsia pertencente ao SFG com 100% de similariedade com a *R. felis*. São Paulo, 2002.

```

TATGGATGAGCAGGATAGAAGACTTGCTGAACTCACTTCACAAAGAGCTTTAGAAGCAAC
ACCTAGCGGCACTAGCGTAGAATGGCGTAATCCGGATAACGGTAATCAT

```

Figura 6 – Amostra de fragmentos de DNA de riquetsia obtida na *n*-PCR do gene 17 kDa, realizado em carrapato *A. cajennense* da Fazenda FMVZ-USP – Campus Pirassununga considerada região não endêmica. Sequência de nucleotídeos alinhados de 109 pares de bases. A análise dos fragmentos apresentou compatibilidade com riquetsia pertencente ao SFG com 100% de similariedade com a *R. felis*. São Paulo, 2002.

5.4 Imunofluorescência Indireta (IFI)

Os títulos de anticorpos anti *Rickettsia rickettsii* estão descritos na Tabela 11. Nenhuma das amostras de soros humanos apresentaram sorologia positiva para *R. rickettsii* nas regiões endêmica e não endêmica. Somente um eqüino de região não endêmica, da Fazenda São João, apresentou sorologia positiva. Os cães de região não endêmica apresentaram resultados negativos. Uma típica reação de IFI foi ilustrada na Figura 7.

Figura 7 - Soro canino positivo, anti-*Rickettsia rickettsii*, através da reação de Imunofluorescência Indireta, na diluição de 1/64. 400x. Ouro Preto, Minas Gerais, 2002.

Tabela 11 – Recíprocas de títulos de anticorpos anti *Rickettsia rickettsii* obtidas em soros de eqüinos, asininos e cães de região endêmica para febre maculosa do estado de São Paulo, São Paulo, 2002

Titulação dos soros	Propriedades						
	Duas Pontes		Monte Nilo		Quitandinha		
	Eqüinos	Cães	Eqüinos	Cães	Eqüinos	Asininos	Cães
Não Reagente	1/10	4 /4	1/5	5/6	3/7	4/4	2/6
Positivo	9/10	-	4 /5	1/6	4/7	-	4/6
64	-	-	-	-	-	-	2/6
128	-	-	-	-	1/7	-	-
256	-	-	1/5	1/6	1/7	-	1/6
512	3/10	-	1/5	-	1/7	-	1/6
1024	5/10	-	1/5	-	-	-	-
2048	-	-	-	-	1/7	-	-
4096	1/10	-	1/5	-	-	-	-
Total	10	4	5	6	7	4	6

6 DISCUSSÃO

A febre maculosa tem como principal característica apresentar uma maior incidência da doença na população de seres humanos de área rural ou suburbana de forma endêmica e epidêmica a (DIAS; MARTINS, 1939). A principal espécie de carrapato encontrado em todas as propriedades estudadas de região endêmica e não endêmica foi o *A. cajennense*, já citado como principal vetor de riquetsias do SFG, no Brasil, por Monteiro e Fonseca, 1932; Dias e Martins, 1939; Lemos et al., 1994; Lemos et al., 1997; Lima et al., 1995; Magalhães, 1952. Essa espécie de carrapato distribui-se por todo o território brasileiro e frequentemente é encontrada parasitando humanos e outros mamíferos (LEMOS et al., 1997). A presença de maior número de fêmeas nos meses de outubro a março foi relatado por Oliveira et al., (2000), fato também constatado em nosso estudo. Uma maior ocorrência desse sexo no período da captura, confirma a sazonalidade da dinâmica populacional de machos e fêmeas no ciclo biológico desse parasita. Devido a baixa especificidade parasitária é comum encontrar essa espécie parasitando diversos vertebrados, sendo o equino o hospedeiro preferencial na fase adulta (ARAGÃO; FONSECA, 1953; LABRUNA et al., 2002). Há também uma preferência de larvas e ninfas para parasitar outros animais de pequeno porte, bem como o cão, o que chama a atenção para a possibilidade de participação desses animais no transporte desse vetor para os ambientes próximos ao homem (LIMA et al., 1995). Nossos resultados indicaram algumas condições favoráveis para o desenvolvimento do *A. cajennense* nas regiões avaliadas. Propriedades com pastos abandonados albergando hospedeiros susceptíveis ao parasitismo por carrapatos, sem qualquer controle antiparasitário, em região de clima quente e alto índice de umidade, em condições favoráveis de reprodução e multiplicação, proporcionam alta densidade populacional no meio ambiente e conseqüentemente altas cargas parasitárias nos animais, levando a constantes infestações em seres humanos por esses parasitas. Esses dados

evidenciam a importância do conhecimento da ecologia das espécies de carrapatos envolvidas na transmissão da febre maculosa no Brasil, fato já documentado por Lemos et al., 1994, 1996a,b,c;1997.

O teste de hemolinfa é utilizado rotineiramente como teste de triagem para a realização do PCR para identificação de riquetsias em carrapatos (BEATI et al., 1995; BEATI et al., 1998; KELLY et al., 1991; ZHANG et al., 1995). O presente estudo mostrou uma baixa sensibilidade desse teste na identificação de riquetsias do SFG em hemolinfa de *A. cajennense*. Segundo Policastro et al., (1997) achados morfológicos característicos não permitem diagnósticos conclusivos, pois as riquetsias apresentam pleomorfismo térmico, alterando as formas intracelulares, interferindo na sensibilidade do teste, o que implica em resultados falsos negativos. Vale ressaltar que outras bactérias, gram negativas, de outras famílias, são coradas pela fucsina (BURGDÖFER, 1970). A utilização de diferentes corantes e o pH da hemolinfa, também podem alterar a fixação e conduzir a diferenças na qualidade dos resultados, contribuindo com a baixa confiabilidade do teste.

A inoculação experimental de riquetsias em carrapatos utilizada neste trabalho permitiu a elaboração de controles positivos e a comprovação da eficácia dos *primers* possibilitando a comprovação da transmissão transovariana da *Rickettsia parkeri* em carrapato *A. cajennense*. A taxa de transmissão obtida na infecção experimental foi de 50%, incluindo-se dentro da faixa esperada de 30% a 100% (MCDADE; NEWHOUSE, 1986).

A prevalência de infecções de riquetsias em carrapatos varia de 1 a 50%, quando pesquisados em várias regiões do mundo (NILSSON et al., 1997). Esses autores encontraram uma taxa de infecção em *Ixodes ricinus* de 1,7% na Suíça. Dupont et al., (1994) obtiveram 21,6% em *Rhipicephalus* spp, *Amblyomma* spp e *Haemophysalli* spp, na África; ambos utilizaram a técnica de PCR. Cage et al., (1994) encontraram 5,8% em *Dermacentor Andersoni* com o teste de hemolinfa. Magnarelli et al., (1981) nos EUA, encontraram 2,2% de

infectividade em *Dermacentor variabilis*, utilizando a técnica de Imunofluorescência Direta (IFD).

O resultado obtido neste estudo em região endêmica foi de 4,9%, utilizando a *n*-PCR em *A. cajennense*. O resultado obtido por Lemos et al., (1997), com o teste de hemolinfa, foi 8,1% em região endêmica brasileira, sendo superior quando comparado ao nosso estudo. A diferença entre as taxas de infecção certamente é devida às metodologias empregadas. No trabalho de Lemos et al., (1997) dos 18 carrapatos *A. cajennense* positivos no teste de hemolinfa, somente três amostras reagiram com antígenos de *R. rickettsii* na Imunofluorescência direta (IFD). Em nosso estudo o teste de hemolinfa não apresentou confiabilidade nos resultados. Em região não endêmica, o resultado encontrado foi de 0,9%, compatível para regiões sabidamente não endêmicas. Magnarelli et al., (1981), demonstraram que em regiões em que nunca foi relatada a febre maculosa, a taxa de infectividade em *Dermacentor variabilis* foi de 0,7%. Esses resultados isolados não demonstram uma atividade riquetsial focal, apenas representam uma dispersão da riquetsia na natureza. Provas sorológicas em hospedeiros susceptíveis e animais reservatórios são de fundamental importância para determinar esta atividade (MAGNARELLI et al., 1981).

A maioria das amostras positivas diagnosticadas de região não endêmica foi proveniente de carrapatos da Fazenda FMVZ - USP / Campus Pirassununga. Esse dado pode ser explicado pelo intenso movimento de animais existente na localidade, provenientes de outras regiões de infectividades desconhecidas. Atividades experimentais e trabalhos científicos realizados com carrapatos *A. cajennense* e hospedeiros susceptíveis (bovinos e eqüinos) no local podem desequilibrar a ecologia desse vetor, predispondo a um maior contato com possíveis portadores ea riquetsia.

Os fragmentos amplificados pela *n*-PCR do gene 17 kDa (230 bp) de riquetsias foram seqüenciados. As seqüências obtidas foram comparadas com outras disponíveis no GenBank,

pertencentes ao SFG com 100% de similaridade com a *R. felis*, tanto em região endêmica como não endêmica. O principal vetor da *R. felis* é a pulga, caracterizada como um agente “endosimbionte” e apresenta transmissão vertical (WEDINCAMP; FOIL, 2002). A distribuição é mundial e a doença foi relatada nos EUA, França, Espanha e México, sendo a pulga o vetor incluído na epidemiologia da doença (MÁRQUEZ et al., 2002; RAOULT et al., 2001). Várias cepas de riquetsias responsáveis pela doença no homem foram descritas no mundo e outras cepas de patogenicidade desconhecidas têm sido isoladas em carrapatos nos últimos 15 anos (SEKEYOVÁ et al., 2000). Até o presente momento as únicas espécies de riquetsias identificadas no Brasil, por Biologia Molecular, são a *R. rickettsii*, *R. bellii* e *R. felis* (HORTA, 2002; LABRUNA et al., 2001; NASCIMENTO et al., 2001).

Esse achado já descrito no Brasil, é de extrema importância para o melhor entendimento da epidemiologia dessa doença em nosso país. Ishikura et al., 2002, relatou a presença de riquetsia do cluster da *R. felis* em carrapatos *Amblyomma testudinarium*. A infecção no carrapato ocorreria de forma acidental, não sendo uma associação natural. Esse fato poderia explicar também a baixa quantidade de riquetsia encontrada nos ixodídeos examinados.

Em dois pacientes humanos brasileiros foram diagnosticados doença similar a febre maculosa, provocada pela *R. felis*, em um estudo realizado por Raoult et al., (2001), através da microimunofluorescência e PCR, comprovando a patogenicidade em seres humanos. Os resultados obtidos em nosso estudo auxiliam no conhecimento da epidemiologia das riquetsioses do grupo da febre maculosa no Brasil. Casos de riquetsioses por *R. felis* foram também descritos por Velázquez et al., (2000), em pacientes com sintomatologia evidente, provenientes do México, através do PCR, porém não houve sucesso no cultivo celular. O gambá foi apontado como reservatório da doença por Boomstrom et al., (2002), nos EUA. Nenhum relato de sorologia ou identificação riquetsial em animais reservatórios, para a *R.*

felis, foi publicado no Brasil até o presente momento. Os gatos, ratos e outros animais silvestres poderiam ser os hospedeiros a serem estudados, uma vez que são esses os principais animais que mantêm a *R. felis* em circulação, podendo transmitir a infecção aos seres humanos (BOOMSTROM et al., 2002).

Os dados sobre a sorologia dos eqüídeos e cães deste estudo fornecem maiores elementos para a interpretação do ciclo epidemiológico da febre maculosa nas áreas de estudo. A ausência de seres humanos soropositivos pode ser justificada pelo papel de hospedeiro acidental que esses assumem frente ao vetor, o que ocasiona uma baixa prevalência da infecção, mesmo em se tratando de área endêmica (LIMA et al., 2001). Os títulos elevados de anticorpos dos eqüinos (128 a 4096) registrados no presente trabalho indicam que esses animais entraram em contato, pelo menos uma vez na vida, com bactérias do SFG, possivelmente com *R. rickettsii*, uma vez que o antígeno utilizado na IFI foi *R. rickettsii*. A utilização de testes mais específicos como o *Western Blotting* se faz necessário devido a possibilidade de reações cruzadas entre as espécies que a IFI pode resultar.

Os eqüinos são animais importantes na cadeia de circulação das riquetsias devido a proporcional manutenção de uma alta densidade populacional de *A. cajennense*. Lemos et al., (1996a), demonstraram que 77,8% dos eqüinos pesquisados em área endêmica apresentavam sorologia positiva para a febre maculosa com títulos ≥ 64 na IFI e foi observado uma menor prevalência nos cães. Analisando tais resultados, podemos inferir que os eqüinos podem ser indicados como animais sentinelas para a infecção humana, em uma determinada região, assim como também observado por Lemos et. al. 1996b.

Na fazenda São João, o único animal positivo na sorologia veio a óbito dias após a colheita de sangue, por causa desconhecida. Não se conhecia a procedência desse animal, o qual possivelmente circulou por várias regiões do estado de São Paulo.

Lemos et al., (1996a), pesquisaram anticorpos anti *R. rickettsii* em cães e equinos de região não endêmica através da IFI e observaram positividade em 12,9% e 27,3% em cães e equinos respectivamente. Embora a IFI não detecte especificamente infecção pela *R. rickettsii*, mas infecção por bactérias do SFG, os dados encontrados nos trabalhos sugerem que a riquetsia pode circular naturalmente em região não endêmica em equilíbrio, sem apresentar sintomas. Magnarelli et al., (1981), sugerem que para haver atividade rickettsial deve co-existir uma correlação de positividade entre vetores, hospedeiros e reservatórios, no entanto, os autores sugerem que mais estudos na região devam ser conduzidos, incluindo pesquisas em animais silvestres reservatórios, animais sentinelas, potenciais vetores, isolamento e identificação do agente em cultivo celular.

Apesar da IFI ser um teste *gold standart*, o *western blotting* demonstra uma maior sensibilidade e especificidade, sendo um teste que pode revelar uma real prevalência das doenças riquetsiais (LA SCOLA; RAOULT, 1997), permitindo excluir os resultados falsos positivos.

O dado de sorologia aliado à taxa de infecção das riquetsias em carrapatos permite afirmar a grande atividade rickettsial desenvolvida em região endêmica, o que não foi identificada em região não endêmica, sendo essa associação dos dados um elemento imprescindível para caracterizar a endemicidade da região (MAGNARELLI et al., 1981).

O ciclo da *R. rickettsii* depende muito dos reservatórios vertebrados como amplificadores da infecção do agente na população de carrapatos. Um efeito letal no vetor de vida livre, alimentado ou não, bem como uma sensível redução da fecundidade é promovida pela riquetsia. Esse efeito provavelmente limita a incidência desse agente na natureza, apesar de sua transmissão vertical. Uma flutuação no efeito letal, condicionado a efeitos ecológicos, pode causar o desaparecimento ou emergência no efeito enzoótico (NIEBYLSKI, et al., 1999).

Por outro lado, riquetsias consideradas não patogênicas para seres humanos (*R. bellii*, *R. montana*, *R. peacockii*, *R. rhipicephali*, etc...) geralmente apresentam taxas mais elevadas de infecção nas populações de carrapatos, por apresentar caráter pouco patogênico ao ixodídeo. Isso também ocorre devido à transmissão transovariana (BEATI et al., 1994; CAGE et al., 1994; DUPONT et al., 1994; PHILIP et al., 1983), o que implica no vetor apresentar-se como um dos principais reservatórios na natureza para esse agente (PHILIP et al., 1983). A ausência de reações positivas na sorologia em seres humanos e reservatórios potenciais, no Haras e Fazenda Conforto, Fazenda São João e Fazenda FMVZ-USP – Campus Pirassununga, aliado a baixa prevalência ou ausência de carrapatos positivos no *n*-PCR, caracteriza o status não endêmico das regiões estudadas. Esses fatores podem ser atribuídos às condições ecológicas não inerentes a relação riquetsia - carrapato, tal como a ausência de reservatórios competentes ou a baixa translocação da riquetsia por vetor competente. Nosso resultado desperta um grande alerta para estas regiões, pois estão vulneráveis a novos casos da febre maculosa, já que não estariam circulando outras riquetsias não patogênicas que ofereçam competitividade para a *R. rickettsii*. Isto em parte vem sendo constatado no estado de São Paulo através do aumento de novos casos da doença em regiões consideradas não endêmicas, contribuindo para a expansão horizontal da doença. Aliado a estes fatores há de se salientar a explosão demográfica de possíveis reservatórios como a capivara. Por outro lado, a sorologia positiva para *R. rickettsii* de equinos e cães de região endêmica foram marcadamente elevados, com altos títulos. Isto pode indicar indiretamente a circulação de uma riquetsia do SFG na região. Conforme o que foi exposto, estudos mais detalhados são necessários para equalizar as questões apresentadas.

A inclusão da notificação da febre maculosa deve ser inserida na rotina de urgência epidemiológica de doenças no país. A sintomatologia febril, dor de cabeça e manchas avermelhadas distribuídas pelo corpo são sinais clínicos inerentes também a várias outras

doenças (NUR et al., 2000). A implantação de um programa de vigilância da febre maculosa em regiões endêmicas e não endêmicas teria o mérito de auxiliar no diagnóstico precoce da doença.

7 CONCLUSÃO

Através deste trabalho realizado em três propriedades rurais de região endêmica e três propriedades rurais de região não endêmica, do estado de São Paulo conclui-se:

- a) A confirmação da sazonalidade de *A. cajennense*, com predomínio de carrapatos adultos de vida livre nos meses de outubro a fevereiro com maior presença de fêmeas;
- b) A pesquisa de riquetsias em hemolinfa de carrapatos através do teste de hemolinfa mostrou-se insatisfatória;
- c) A técnica de *n*-PCR foi sensível para o diagnóstico de riquetsias do grupo da febre maculosa em carrapatos;
- d) A análise parcial de sequência de nucleotídeos amplificados pela *n*-PCR identificou uma riquetsia do SFG, compatível com *R. felis*;
- e) A presença de cães e equinos infectados por riquetsias do SFG com a utilização de antígenos da *R. rickettsii* e carrapatos positivos na *n*-PCR para riquetsias do SFG indicam atividade riquetsial em região endêmica.

REFERÊNCIAS

ABEL, I. S. **Investigações preliminares sobre espiroquetídeos e seus potenciais vetores procedentes da reserva florestal do Morro Grande, Município de Cotia – SP.** 1999. 108 f. Dissertação. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

ANACKER, R. L.; LIST, R. H.; MANN, R. E.; WIEDBRAUK, D. L. Antigenic heterogeneity in high – and low-virulence strains of *Rickettsia rickettsii* revealed by monoclonal antibodies. **Infection Immunology**, n. 51, p. 653-660, 1986.

ANDERSON, B. E.; MCDONALD, G. A.; JONES, D. C.; Regnery, R. L. A protective protein antigen of *Rickettsia rickettsii* has tandemly repeated, near identical sequences. **Infection Immunology**, n. 58, p. 2760-2769, 1990.

ANDERSSON, J. O.; ANDERSSON, G. E. A century of typhus, lice and Rickettsia, **Research Microbiological**, n. 151, p. 143-150, 2000.

ARAGÃO, H. Notas sobre ixódidas brasileiros. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 3, p. 145 -195, 1911.

ARAGÃO, H. Ixodidas brasileiros de alguns paizes limitrophes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 31, p. 759-843, 1936.

ARAGÃO, H.; FONSECA, F. Notas de Ixodologia.: propósito da validade de algumas espécies do gênero *Amblyomma* do continente Americano (Acari: Ixodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 51, p. 485-492, 1953.

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

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

BALASHOV, Y. S. Bloodsucking ticks (Ixodoidea)- Vectors of diseases of man and animals. Miscellaneous publications of the **Entomological Society of America**, n. 8, p. 160-376, 1972.

BEATI, L.; KELLY, J. P.; MASON, P. R.; RAOULT, D. Species-specific Balb/c mouse antibodies to rickettsiae studied by western blotting, **Microbiology Letters**, v. 119, p. 339-334, 1994.

BEATI, L.; KELLY, P. J.; MATTHEWMAN, L. A; MASON, P. R.; RAOULT, D. Prevalence of rickettsia-like organisms and spotted fever group rickettsiae in ticks (acari: ixodidae) from Zimbabwe. **Entomological Society of America**, v. 32, n. 6, p. 787-792, 1995.

BEATI, L., RAOULT, D. Mediterranean Spotted Fever and other Spotted Fever Group Rickettsiae. In: PALMER, S. R.; SOULSBY, L.; SIMPSON, D. I. H. **Zoonoses**, Oxford Oxford: University Press, 1998. p. 217-240.

BILLINGS, A. N.; YU, X. J.; TEEL, P. D.; WALKER, D. H. Detection of a spotted fever group Rickettsia in *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in South Texas. **Journal of Medical Entomology**, n. 35, p. 474-478, 1998.

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

BOOSTROM, A; BEIER, M. S.; MACALUSO, J. A; MACALUSO, K. R.; SPRENGER, D.; HAYES, J.; RADULOVIC, S.; AZAD, A. F. Geographic association of *Rickettsia felis*-infected opossums with human murine typhus, Texas, **Emerging Infection Diseases**, v. 8, n. 6, p. 549-554, 2002.

BREITSCHWERDT, E. B.; DAVIDSON, M. G.; HEGARTY, B. C.; PAPICH, M. G.; GRIDEN, C. B. Prednisolone at anti-inflammatory or immunosuppressive dosages in conjunction with doxycycline does not potentiate the severity of *Rickettsia rickettsii* infection in dogs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 1, p. 151-157, 1997.

BRIDI, M. Febre Maculosa ainda é ignorada no país. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 3 nov. 1997a. Disponível em: <<http://www1.estado.com.br/edicao/pano/97/11/02/ger971102.html>>. Acesso em: 2 nov 1999.

BRIDI, M Amparo registra morte atribuída a febre maculosa. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 3 nov. 1997b. Disponível em: <<http://www1.estado.com.br/edicao/pano/97/11/02/ger971107.html>>. Acesso em: 2 nov 1999.

BURGDORFER, W.; NEWHOUSE, V. F.; PICKENS, E. G.; LACKMAND, B. Ecology of Rocky Mountain Spotted Fever in Western Montana – I. Isolation of *Rickettsia rickettsii* from wild mammals. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, n. 76, p. 293-301, 1962.

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

BURKET, C. T.; VANN, C. N.; PINGER, R. R.; CHATOT, C. L.; STEINER, F. E. Minimum infection rate of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) by *Ehrlichia chaffeensis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) in Sourthen Indiana. **Journal of Medical Entomology**, v. 35, p. 653-659, 1998.

CAFARDO, R. Criança de 6 meses morre de febre maculosa. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 16 set. 2002. Disponível em: <<http://www1.estado.com.br/agestado/noticias/2002/set/15/136.html>>. Acesso: em 20 abr. 2002.

CAGE, K. L.; SCHRUMPF, M. E.; KARSTENS, R. H.; BURGDORFER, W.; SCHWAN, T. G. DNA typing of rickettsiae in naturally infected ticks using a polimerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism system. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, n. 2, p. 247-260, 1994.

CHOMCZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **Biotechniques**, v. 15, n. 3, p. 532-537, 1993.

COMER, M. K. Rocky montain spotted fever. **Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 21, n. 1, p. 27-44, 1991.

DAVIDSON, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B; WALKER, D. H.; LEVY, M. G.; CARLSON, C. S.; HARDIE, E. M.; GRINDEN, C. A. NASISSE, M. P. Vascular permeability and coagulation during *Rickettsia rickettsii* infection in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, n. 1, p. 165-170, 1990.

DEBERALDINI, E. R.; SCARDAZZI, M. C.; ALMEIDA, C. A.; DEL GUERCIO, V. M.; MELLES, H. H.; NOUER, S. A.; DE LIMA, V. L. C. Febre maculosa: manual de orientação para vigilância epidemiológica. São Paulo: Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo, 1996. 10 p. Apostila.

DEL GUERCIO, V. M. F.; ROCHA, M. M. M.; MELLES, H. H. B.; LIMA, V. C. L., PIGNATTI, M. G. Febre maculosa no município de Pedreira, SP, Brasil. Inquérito sorológico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 1, p. 47-52, 1997.

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

DROST, W. T.; BERRY, C. R., BREITSCHWERDT, E. B., DAVIDSON, M. G. Thoracic radiographic findings in dogs infected with *Rickettsia rickettsii*. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 38, n. 4, p. 260-266, 1997.

DUPONT, H. T.; CORNET, J.; RAOULT, D. Identification of rickettsiae from ticks collected in the central african republic using the polymerase chain reaction. **American. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, n. 3, p. 373-380, 1994.

DUMLER, J. S.; BARBET, A F.; BEKKER, P. J.; DASCH, G. A PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R.; Reorganization of genera in the families Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and HGE agent as subitive synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*, **International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 2145-2165, 2001.

EGENVALL, A. E.; HEDHAMMAR, Ä. A.; BJÖERSDORFF, A. I. Clinical features and sorology of 14 dogs affected by granulocytic ehrlichiosis in Sweden. **The Veterinary Record**, v. 1, p. 222-226, 1997.

EREMEEVA, M.; YU, X.; RAOULT, D. Differentiation among spotted fever group Rickettsiae species by analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 32, p. 803-810, 1994.

FOURNIER, P. E.; GRUNNENBERGER, F.; JAULHAC, B.; GASTINGER, G.; RAOUL, D. Evidence of *Rickettsia Helvetica* infection in humans, eastern france, **Emerging Infection diseases**, v. 6, n. 4, p. 289-392, 2000.

GALVÃO, M. A. M.; E RIBEIRO, J. G. L., Febre Maculosa. In: PEDROSO, E.R.P.; ROCHA, M.O.C.; SILVA, O. A. EDS. **Clínica Médica; os princípios da prática ambulatorial**. São Paulo; Atheneu, p 1374-1380, 1993.

GALVÃO, M. A. M. **Febre maculosa em Minas Gerais: um estudo sobre a distribuição da doença no estado e seu comportamento em área de foco peri-urbano**. 1996. 114 f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) - Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1996.

GALVÃO, M. A. M. CHAMONE, C.B.; CALIC, S. B.; MACHADO, M. C.; OTONI, M. E. A.; DIETZE, R.; MORON, C.; FENG, H. M.; OLANO, J. P.; WALKER, D. H. Serologic evidence of spotted fever group rickettsia in Novo Cruzeiro Municipality – Minas Gerais state-Brazil, 1999. **Anais Rickettsiae and Rickettsial Diseases at the Turn of the Third Millenium**. D. Raoult, P. Brouqui, Elsevier, Paris, 1999, p. 241.

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

HARDEN, V. A. **Rocky mountain spotted fever**. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 1990, p. 8.

HALL, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.** 41:95-98.

HENKE, E. S.; PENCE, D. B.; DEMARIS, S.; JOHNSON, J. R. Serological survey of selected zoonotic disease agents in black-tailed jack rabbits from Western Texas. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 1, n. 26, p. 107-111, 1990.

HOOGSTRAAL, H. Argasid and Nuttalliellid ticks as parasites and vectors. **Advance Parasitology**, v. 1, n. 24, p. 35-238, 1985.

HORTA, M. C. **Pesquisa de infecção por rickettsias do grupo da febre maculosa em humanos, eqüídeos, caninos e em diferentes estádios de vida do *Amblyomma cajenense*, provenientes de uma área endêmica do estado de São Paulo – SP**. 2002, 72 f. Tese (Mestrado em Epidemiologia experimental aplicado as zoonoses) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

ISHIKURA, M.; FUJITA, H.; SHUJI, A.; MATSUURA, K.; WATANABE, M. Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae isolated from ticks in Japan. **Microbiology Immunology**, v. 46, n. 4, p. 241-247, 2002.

JONES, D.; ANDERSON B.; OLSON, J. GREENE, C.; Enzyme-like immunosorbent assay for detection of human immunoglobulin G to lipopolysaccharide of spotted fever group rickettsiae. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 138-141, 1993.

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

KIRKLAND, K. B.; WILKINSON, W. E.; SEXTON, D. J. Therapeutic delay and mortality in cases of rocky mountain spotted fever. **Clinical Infectious Diseases**, v. 20, p. 1118 – 1121, 1995.

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

LABRUNA, M. B.; HORTA, M. C.; SOARES, R. M.; PINTER, A.; VIANNA, M. B.; SANGIONI, L. A.; RICHTZENHAIN, L. J.; SCHUMAKER, T. T. S.; GENNARI, S. M. Identificação de *Rickettsia bellii* em carrapato *Amblyomma cooperi* do município de Pedreira. In: XV CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE PARASITOLOGIA, **Anais**. São Paulo, 2001, p. 33.

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, p. 65-77, 2002.

LEITE, R. C.; OLIVEIRA, P. R.; LOPES, C. M. L.; FREITAS, C. M. V. **Alguns aspectos epidemiológicos por infestações por *Amblyoma cajennense*: uma proposta de controle estratégico**. Belo Horizonte. Departamento de Medicina Veterinária e Preventiva da Escola de Medicina Veterinária – UFMG, 1999. 16 p. Apostila.

LEMONS, E. R S.; MACHADO, R. D.; COURA, J. R. Rocky mountain spotted fever in a endemic area in Minas Gerais, Brazil. . **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 4, v. 89, p. 497-501, 1994.

LEMOS, E. R. S.; MACHADO, R. D.; COURA, J. R.; GUIMARÃES, M. A. A., SERRA FREIRE, N. M. et al.; Epidemiological aspects of the Brazilian spotted fever: Seazonal activity of ticks collected in a endemic area in São Paulo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n. 30, v. 3, p. 181-185, 1996a.

LEMOS E. R. S.; MACHADO, R. D.; COURA, J. R.; GUIMARÃES, M. A. A., FREIRE, N. M. S. Infestation by ticks and detection of antibodies to spotted fever group rickettsiae in wild animals captured in the state of São Paulo, Brazil. A preliminary report. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, p. 701-702, 1996b.

LEMOS, E. R. S.; MACHADO, R. D.; COURA, J. R.; GUIMARÃES, M. A. A., CHAGAS, N. Epidemiological aspects of the Brazilian spotted fever: Serological survey of dogs and horses in a endemic área in the state of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, n. 6, p. 427-430, 1996c.

LEMOS, E. R. S.; MACHADO, R. D.; PIRES, F. D. A.; MACHADO, S. L.; COSTA, L. M. C.; COURA, J. R. Rickettsiae-infected ticks in a endemic área of spotted fever in state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 4, p. 477-481, 1997.

LIMA, V. L. C.; FIGUEIREDO, A. C.; PIGNATTI, M. G.; MODOLO, M. Febre maculosa no município de Pedreira – Estado de São Paulo – Brasil. – Relação entre ocorrência de casos e parasitismo humano por ixodídeos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 28, n. 2, p. 135-137, 1995.

LIMA, V. L. C.; SOUZA, S. A. L.; SOUZA, C. E.; VILELA, M. F. G.; SANTOS, M. C. G.; PAPAORDANOU, P. M. O.; GUERCIO, V. M. D.; ROCHA, M. M. M. A Situação da febre maculosa na região administrativa de Campinas – SP. In: I Simpósio sobre Doenças Transmitidas por Carrapatos. **Resumo**, Campinas, São Paulo, 2001. p. 23.

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

MARQUES, J. F.; MUNIAIN, M. A.; PEREZ, M. J.; PACHÓN, J. Presence of *Rickettsia felis* pathogenic for humans. **Emerging Infection Disease**, v. 8, n. 1, p 89-91, 2002.

MARTINO, O.; ORDUNA, T.; LOURTAU, L.; SCAPELLATO, P.; CERNIGO, B.; SEIJO, A. Rickettsiosis do grupo das febres maculosas em viajantes argentinos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.br/cielo.php?script=sci_arttext&pid> Acesso em: 4 dez. 2001.

MAGNARELLI, L. A.; ANDERSON, J. F.; PHILIP, R. N.; BURGDORFER, W.; CASPER, E. A Endemicity of spotted fever group rickettsiae in Connecticut. **American Journal Tropical and Hygiene**, v. 30, n. 3, p. 715-721, 1981.

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

MELLES, H. H.; COLOMBO, S.; SILVA, M. V. Febre maculosa: Isolamento de *Rickettsia* em amostra de biópsia de pele. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 1, n. 34, p. 37-41, 1992.

MELLES, H. H.; COLOMBO, S.; LEMOS, E. R. S. Isolamento de rickettsia em cultura de célula vero. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 5, p. 469-473, 1999.

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

MONTEIRO, J. L. Comportamento experimental do coelho aos vírus do “Typho exanthematico de S. Paulo” e da febre maculosa das montanhas rochosas. **Memórias do Instituto Butantã**, n. 8, p. 3-9, 1933.

NASCIMENTO, E. M. M.; GEHRKE, F. S.; MELLES, H. H. B.; SCHUMAKER, T. T. S. Caracterização molecular de rickettsias do grupo da febre Maculosa em material biológico humano. In: Congresso Latino-Americano de Parasitologia. **Jornal Brasileiro de Patologia**, Suplemento Científico, v.37, nº 4, p. 82, 2001.

NCBI. Taxonomy database. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 19 abr. 2003.

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, 1999.

NIEBYLSKI, M. L.; SCHRUMPJ, M. E.; BURGDORFER, W.; FISHER, E. R.; GAGE, K. L.; Schwan, T. G. *Rickettsia peacockii* sp. nov., a new species infecting wood ticks *Dermacentor andersoni*, in Western Montana. **International. Journal of Systematic Bacteriology**, n. 47, p. 446-452, 1997.

NILSSON, K.; JAENSON, T. G. T.; UHNOO, I.; LINDQUIST, O.; PETTERSSON, B.; UHLÉN, M.; FRIMAN, G.; PÅHLSON, C. Characterization of a spotted fever group rickettsia from *Ixodes ricinus* ticks in Sweden. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 243-247, 1997.

NUR, Y. A.; BRANDERBURG, A.; NIESTERS, H. G. M.; WAGENAAR, J. A.; OSTERHAUS, A. D. M. E.; GROEN, J. Need to increase awareness among family doctors and medical specialists of rickettsioses as an import disease in non-endemic areas. **The Netherlands Journal of Medicine**, v. 56, p. 186-189, 2000.

OLIVEIRA, P. R. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae): avaliação de técnicas para o estudo de dinâmica populacional e biotecnologia. 1998. 65 f. Dissertação (Mestrado em, Parasitologia) Escola de Medicina Veterinária - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1998.

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

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

OLIVER JR., J. H. Biology and systematics of ticks (Acari: Ixodida), **Annual Review Ecology and Systematics**, v. 20, p. 397-430, 1989.

PEREIRA, M. C.; LABRUNA, M. B. Febre maculosa: aspectos clínicos-epidemiológicos, **Clínica Veterinária**, n. 12, p. 19-23, 1998.

PÉTER, O.; RAOULT, D.; GILOT, B. Isolation by a sensitive centrifugation cell culture system of 52 strains of spotted fever group rickettsiae from ticks collected in France. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 7, p. 1597-1599, 1990.

PHILLIP, R. N.; CASPER, W.; BURGDORFER, W.; GERLOFF, R. K.; HUGHES, BELL, E. J. Serologic typing of rickettsiae of the spotted fever group by microimmunofluorescence. **Journal of Immunology**, n. 121, p. 1961-1968, 1978.

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

PIZA, J. T.; MEYER, J. R.; GOMES, L. S. Típho exanthematico em São Paulo. **Soc. Impress. Paulista**, São Paulo, 1932.

POLICASTRO, P. F.; MUNDERLOH, U. G.; FISCHER, E. R.; HACKSTADT, T. *Rickettsia rickettsii* growth and temperature-inducible protein expression in embryonic tick cell lines. **Journal Medical Microbiology**, v. 46, p. 839-845, 1997.

RADULOVIC, S.; FENG, H. M.; CROQUET-VALDES, P.; MOROVIC, M.; DZELALIJA, B.; WALKER, H. Antigen-capture enzyme immunoassay: a comparison with other methods for detection of spotted fever group rickettsiae in ticks. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, n. 3, p. 359-364, 1994.

RAOULT, D. e ROUX, V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 4, p. 694-719, 1997.

RAOULT, D.; LA SCOLA, B.; ENEA, M.; FOURNIER, P. E.; ROUX, V.; FENOLLAR, F.; GALVÃO, M. A. M.; LAMBALLERIE, X. A flea associated rickettsia pathogenic for humans. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, p. 73-81, 2001. Disponível em <<http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol7no1/raoult.htm>> Acesso em: 2 nov. 2001.

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**, n. 173, p. 1576-1589, 1991.

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

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**, n. 34, p. 2058-2065, 1996.

ROUX, V.; RYDKINA, E.; EREMEEVA, M.; RAOULT, D. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the Rickettsiae. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 2, p. 252-261, 1997.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed, Cold Spring Harbor; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. p. 398.

SCHRIEFER, M. E.; SACCI JR., J. B.; DUMLER, S.; BULLEN, M. G.; AZAD, A. F. Identification of a novel rickettsial infection in a patient diagnosed with murine typhus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 949-954, 1994.

SEKEYOVÁ, Z.; FOURNIER, P. E.; REHÁČEK, J.; RAOULT, D. Characterization of a new spotted fever group rickettsia detected in *Ixodes ricinus* (acari:ixodidae) collected in Slovakia. **Entomological Society of America**, v. 37, n. 5, p. 707-713, 2000.

SOUZA, A. P. **Variação populacional dos principais ixodídeos parasitas de bovinos e equinos em diferentes condições de manejo, nos municípios de Paracambi e Itaguaí no estado do Rio de Janeiro**. 1990. 81 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 1990.

THRUSFIELD, M. *Veterinary epidemiology*. Cambridge. Blackwell science. 2nd 1995, 479 p.

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

VÉLAZQUEZ, J. Z.; SOSA, S. R.; CARMONA, G. B.; WALKER, D. *Rickettsia felis* in Yucatan. **The Lancet**, v. 3, 2000.

VIANNA, M. C. B. **Pesquisa de infecção por riquetsias do Grupo da Febre Maculosa em humanos, cães, eqüídeos e adultos de *Amblyomma cajennense* em uma área endêmica do Estado de Minas Gerais**. 2002. 67 f. Dissertação (Mestrado em epidemiologia experimental aplicado a zoonoses) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

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

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

WEI, T. Y.; BAUMANN, R. J. Acute disseminated encephalomyelitis after rocky mountain spotted fever. **Pediatric Neurology**, v. 21, n. 1, p. 503-505, 1999.

WEISS, E.; STRAUSS, B. The life and career of Howard Taylor Ricketts. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 13, p. 1241-1242, 1991.

WELLER, S. J. BALDRIDGE, G. D.; MUNDERLOH, U. G.; NODA, H.; SIMSER, J.; KURTTI, T. J. Phylogenetic placement of Rickettsiae from the ticks *Amblyomma americanum* and *Ixodes scapularis*. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 36, p. 1305-1317, 1998.

ZHANG, J. Z.; FAN, M. Y.; BI, D. Z. Detection of spotted fever group rickettsiae in ticks and rodents by polymerase chain reaction technique in people's republic of China. **Acta Virologica**, v. 39, p. 263-267, 1995.

ZHANG, J. Z.; FAN, M. Y.; BI, D. Z. Genotypic identification of three new strains of spotted fever group rickettsiae isolated in China, **Acta Virologica**, v.40, p. 215-219, 1996

ZHANG, J. Z.; FAN, M. Y.; BI, D. Z. Sequence analyses and comparison of 190 K surface antigen gene fragment of a new species of spotted fever group rickettsiae, **Acta Virologica**, v. 41, p. 41-45, 1997.

ANEXOS

ANEXO 1 – PROTOCOLO MODIFICADO DE EXTRAÇÃO DE DNA - CHOMKZYNSKI (1993)

- Adicionar à amostra (meio carrapato triturado) 150 µl de TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4)
- homogeneizar por 30 segundos em agitador
- adicionar 450 µl de GT (5 mol/L)
- incubar por 10 minutos, homogeneizando a cada 2 minutos
- adicionar 100 µl de clorofórmio
- homogeneizar, deixar descansando por 2 minutos
- centrifugar a 12000 x g, durante 5 minutos para separar a fase aquosa da orgânica
- transferir 400 µl da fase aquosa para outro microtubo
- adicionar 600 µl de isopropanol
- homogeneizar
- levar ao freezer por 2 a 18 horas
- centrifugar a 12000 x g, durante 15 minutos
- desprezar o sobrenadante
- acrescentar 800 µl de etanol 70%
- centrifugar a 12000 G, durante 15 minutos
- desprezar o sobrenadante
- secar o sedimento em temperatura ambiente

- ressuspender o sedimento com 30 μ l de TE
- homogeneizar
- levar ao banho-maria, a 56 °C, durante 15 minutos
- armazenar a -20 °C até o momento do uso

ANEXO 2 – OBTENÇÃO DE CONTROLES POSITIVOS – INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Carrapatos negativos foram infectados com *Rickettsia parkeri*. O protocolo da infecção está descrito a seguir.

- fixar os carrapatos, através de fita de dupla face, com a parte ventral voltada para cima, na parte convexa de um vidro de relógio; observar em microscópio esterioscópico
- inocular uma pequena gota de suspensão de *Rickettsia parkeri* na articulação coxo-trocanter de uma das patas do carrapato, com o auxílio de uma seringa de insulina
- retirar cuidadosamente os carrapatos da fita e levá-los à incubadora a 24°C por 3 dias, com umidade relativa superior a 95%
- realizar o primeiro teste de hemolinfa no 3º dia pós infecção para pesquisa de riquetsias
- identificar individualmente os carrapatos e levá-los novamente à estufa por dois dias
- realizar novo teste de hemolinfa, para verificar a replicação das bactérias inoculadas.
- retornar à estufa os carrapatos que apresentarem resultados negativos ao teste de hemolinfa, por mais dois dias
- realizar o último teste de hemolinfa, para verificar se houve estabelecimento da infecção

ANEXO 3 – REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

Para cada reação utilizar:

- 2 µl de *terminator ready reaction mix*
- 3-10 ng de DNA
- 1,6 pmol de *primer*
- 2 µl de tampão *Save Money* (200mM de Tris, 5mM de MgCl₂; pH 9,0)
- água ultra-pura (MilliQ®) q.s.p. 20 µl

Para cada reação foi utilizado um só *primer*, (KN1 ou KN2) conforme o sentido do sequenciamento.

Após a homogeneização a solução foi levada ao termociclador MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler (rampa de temperatura ajustada para 1 °C/s), no qual foram realizados 25 ciclos de 96 °C por 10 segundos para a desnaturação da fita de DNA, 50 °C por 5 segundos para a hibridação dos *primers* e 60 °C por 4 minutos para a extensão da nova fita de DNA.

ANEXO 4 – REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

- Uma alíquota de soro foi diluída em PBS (solução fosfato tamponada) e a seguir depositada sobre a lâmina contendo o antígeno de *R. rickettsii*.
- Após incubação em estufa (37°C, 30 minutos) a lâmina foi lavada com PBS, seguido de água destilada, ficando em repouso até sua secagem total.
- A cada lâmina foi adicionado o conjugado específico em diferentes diluições para cada espécie, sendo 1:250 em cães e eqüídeos e 1:100 em humanos.
- Seguiu-se uma nova incubação e lavagem, com a secagem feita em câmara escura.