IARA SILVEIRA

**Investigação da infecção pela bactéria *Rickettsia parkeri*
em carrapatos *Amblyomma triste* no Estado de São Paulo:
isolamento e caracterização molecular da bactéria**

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva
e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e
Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

São Paulo
2006

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1742
FMVZ

Silveira, Iara

Investigação da infecção pela bactéria *Rickettsia parkeri* em carrapatos *Amblyomma triste* no Estado de São Paulo: isolamento e caracterização molecular da bactéria / Iara Silveira. – São Paulo: I. Silveira, 2006.
54 f.: il.

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

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna.

1. *Rickettsia parkeri*. 2. Febre maculosa. 3. Carrapatos.
4. *Amblyomma triste*. I. Título.

Comissão de Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Investigação da infecção pela bactéria *Rickettsia parkeri* em carrapatos *Amblyomma triste* no Estado de São Paulo: isolamento e caracterização molecular da bactéria", protocolo nº628/2005, não utilizando animais de laboratório, serão utilizados, apenas, carrapatos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Investigation of infection from *Rickettsia parkeri* bacteria in ticks *Amblyomma triste* in São Paulo State: isolation and molecular characterization of bacteria", protocol number 628/2005, under the responsibility of Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 11 de março de 2005

Prof. Dr. José Luiz Bernadino Merusse
Vice-Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SILVEIRA, Iara

Título: Investigação da infecção pela bactéria *Rickettsia parkeri* em carrapatos *Amblyomma triste* no Estado de São Paulo: isolamento e caracterização molecular da bactéria

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

À minha família, por sempre incentivar e acreditar em todos os projetos da minha vida, mesmo quando eu desanimava.

Ao Anand pelo seu amor, companheirismo e paciência.

Aos amigos que escutaram, acalmaram, deram broncas e opiniões valiosas.

Ao naturalista alemão Kock por ter nomeado o carrapato mais infeliz do mundo: o *Amblyomma triste*, mesmo sem a intenção.

Ao Pastor Welligton e sua família, que acolheram toda a equipe do trabalho de campo com muita hospitalidade e amizade na cidade de Panorama.

Aos componentes da Equipe Carrapatos no Pontal do Paranapanema: Cássio, Hernani, Lucas, Márcio, Marcos, Nancy e Vivi, responsáveis pelos primeiros passos desta empreitada e vitoriosos mesmo com água da várzea até os joelhos!

Ao Professor Matias Juan Pablo Szabó, pioneiro nas coletas de carrapatos na região, sempre retornando para mais pesquisas com muito amor e dedicação.

Ao Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, um orientador que participou em todas as etapas deste projeto, me deixando livre para fazê-lo à minha maneira, porém sempre atento e corrigindo as escorregadelas e dando broncas quando era preciso.

Ao Prof. Silvio de Arruda Vasconcellos, uma das pessoas mais gentis que já conheci e que me abriu as portas do VPS.

À Profa. Solange Maria Gennari, pessoa generosa e que incentivou muitas ações na pós-graduação.

Aos “parças” do Laboratório de Doenças Parasitárias: Adriano, Alessandra, Alexandre, Aline, Ataliba, Daniel, Lúcia, Maria (obrigada pelas lindas fotos), Maurício, Renata, Ricardo, Richard, Silvio e Taís pelo extremo companheirismo e diversão durante todo este tempo de convívio.

Ao funcionário Pedrinho e à técnica Hilda

Às colegas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro: Luciana e Eliane pelas valorosas dicas e conversas sobre a vida.

À Cristina Brito por ser minha principal companheira na luta por um VPS atuante e participativo, pois O VPS É NOSSO!

À todos os colegas antigos e recentes do curso de Pós-Graduação do VPS.

À Jussara do Laboratório de Epidemiologia e Bioestatística pela inestimável ajuda no mapa de Paulicéia.

Aos funcionários da secretaria do VPS: Cristina, Danival e Virgínia, sempre solícitos todas as vezes que precisei (que não foram poucas!).

Aos professores e funcionários do VPS, muito hospitaleiros e gentis desde o primeiro momento em que entrei para este departamento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro para a execução deste projeto, através do processo de número 04/03902-6.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

SILVEIRA, I. **Investigação da infecção pela bactéria *Rickettsia parkeri* em carrapatos *Amblyomma triste* no Estado de São Paulo: isolamento e caracterização molecular da bactéria.** [Investigation on the *Rickettsia parkeri* infection in ticks *Amblyomma triste* in the state of São Paulo: isolation and molecular characterization of the bacterium]. 2006. 54f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Em janeiro de 2005, foram coletados 31 carrapatos adultos da espécie *Amblyomma triste* em uma propriedade rural da CESP, localizada no município de Paulicéia, Estado de São Paulo. Três carrapatos foram positivos para o teste de hemolinfa, demonstrando estruturas compatíveis com riquetsias no interior de hemócitos. Dois desses carrapatos foram submetidos à tentativa de isolamento de riquetsias em células Vero, através da técnica de Shell vial. Um isolado foi obtido com sucesso, estando já estabelecido em cultivo celular, com várias passagens e partidas congeladas. Do restante do carrapato utilizado para este isolamento, foi extraído o DNA e este foi submetido a PCR para um fragmento do gene *ompA* de *Rickettsia* spp. Foi realizada a caracterização molecular do isolado, através do sequenciamento genético de quatro genes de *Rickettsia* spp: *gltA*, *htrA*, *ompA* e *ompB* e os genes apresentaram 99,8 a 100% de identidade com as seqüências correspondentes de *Rickettsia parkeri* no GenBank. Todos os 31 carrapatos tiveram o DNA extraído, sendo processados pela PCR para um fragmento do gene *gltA* e para um fragmento do gene *ompA*. Três (9,7%) foram positivos a PCR para o gene *gltA* e os mesmos 3 carrapatos foram positivos para o *ompA*, sendo exatamente os 3 carrapatos previamente positivos ao teste de hemolinfa). O material amplificado destes 3 carrapatos para o fragmento de gene *ompA* foi processado para o sequenciamento automático de nucleotídeos resultando em 100% de identidade com a seqüência correspondente de *Rickettsia parkeri* no GenBank. Este trabalho relata pela primeira vez a bactéria *R. parkeri* no Brasil, o que foi confirmado pelo isolamento do agente em cultivo de células.

Palavras-chave: *Amblyomma triste*. Carrapato. Febre maculosa. *Rickettsia parkeri*.

ABSTRACT

SILVEIRA, I. **Investigation on the *Rickettsia parkeri* infection in ticks *Amblyomma triste* in the state of São Paulo:** isolation and molecular characterization of the bacterium. [Investigação da infecção pela bactéria *Rickettsia parkeri* em carrapatos *Amblyomma triste* no Estado de São Paulo: isolamento e caracterização molecular da bactéria]. 2006. 54 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

In January 2005, 31 adult free-living ticks of the species *Amblyomma triste* were collected in the CESP rural farm located in the city of Paulicéia, state of São Paulo, Brazil. In the laboratory, 3 of these ticks were positive by the hemolymph test, showing structures compatible with *Rickettsia* within the hemocytes. Attempts to isolate *Rickettsia* were performed in two hemolymph-positive ticks by the Shell-vial technique. One isolate was successfully obtained, being established in Vero cell culture, with several passages performed. DNA extracted from infected cells was submitted to PCR targeting fragments of four *Rickettsia* genes: *gltA*, *htrA*, *ompA* and *ompB*. DNA sequences obtained from PCR products of these four genes showed 99.8 to 100% of similarity with corresponding sequences of *Rickettsia parkeri* in the Genbank. DNA was extracted from all 31 ticks and processed by PCR targeting a fragment of the rickettsial *gltA* gene and a fragment of *ompA* gene. Three (9.7%) ticks were positive for both genes, being the same ticks previously positive by the hemolymph test. PCR products of these ticks were sequenced, being 100% identical to the corresponding sequence of *Rickettsia parkeri* in GenBank. This study performs the first report of *R. parkeri* in Brazil, confirmed by the isolation of the agent in cell culture.

Key-words: *Amblyomma triste*. *Rickettsia parkeri*. Spotted fever. Tick.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa de Paulicéia e pontos de coleta (A, B, C) dos carrapatos	24
Figura 2 – <i>Amblyomma triste</i> fêmea	25
Figura 3 – <i>Amblyomma triste</i> macho	25
Figura 4 – Células Vero infectadas por <i>R. parkeri</i> (coloração de Gimenez, 1000x)	35

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Primers (oligonucleotídeos iniciadores) utilizados para amplificação dos diferentes fragmentos dos genes do gênero *Rickettsia* 27

Quadro 2 – Concentração dos reagentes empregados na reação em cadeia pela polimerase (PCR) de acordo com o gene alvo buscado..... 27

Quadro 3 – Protocolos do termociclador de acordo com o gene alvo utilizado na PCR 28

Quadro 4 – Reagentes para a reação de seqüenciamento 29

Quadro 5 – Protocolo para a reação de seqüenciamento 30

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Locais de coleta de carrapatos da espécie *A. triste* no município de Paulicéia, SP, no período de 25 a 26 de janeiro de 2005 23
- Tabela 2** – Carrapatos da espécie *Amblyomma triste* coletados em vida livre por quantidade, local de coleta, sexo e data 33
- Tabela 3** – Resultados do teste de hemolinfa para os carrapatos da espécie *A. triste* coletados no município de Paulicéia 34
- Tabela 4** – Similaridade em percentagem das seqüências dos fragmentos dos genes *gltA*, *ompA*, *ompB* e *htrA* do presente isolado de *Rickettsia* com outras seqüências disponíveis no GenBank 36
- Tabela 5** – Resultados da PCR para os genes de *Rickettsia* spp (*gltA* e *ompA*) em carrapatos da espécie *A. triste* coletados no município de Paulicéia 38
- Tabela 6** – Similaridade em percentagem das seqüências dos fragmentos do gene *ompA* dos carrapatos positivos para a PCR com outras seqüências disponíveis no GenBank 39

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	<i>Amblyomma triste</i>	16
2.2	<i>Rickettsia parkeri</i>	18
3	OBJETIVOS	22
4	MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1	Coleta dos carrapatos <i>Amblyomma triste</i>	23
4.2	Extração de DNA dos carrapatos	25
4.3	Reação em cadeia pela polimerase (PCR)	26
4.4	Análise dos produtos amplificados	28
4.5	Seqüenciamento do DNA genômico	29
4.6	Isolamento e detecção das riquetsias	30
4.7	Manutenção em laboratório do isolado de <i>Rickettsia parkeri</i>	31
4.8	Identificação genotípica do isolado de <i>Rickettsia</i> spp.	32
4.9	Frequência de carrapatos infectados	32
5	RESULTADOS	33
5.1	Coleta dos carrapatos	33
5.2	Teste de hemolinfa	33
5.3	Isolamento da <i>R. parkeri</i> em cultura de células Vero	34
5.4	Manutenção em laboratório e caracterização molecular do isolado de <i>Rickettsia</i> spp.	36
5.5	Reação em cadeia pela polimerase (PCR) dos carrapatos coletados	37
5.6	Sequenciamento	39
6	DISCUSSÃO	40
7	CONCLUSÕES	44
	REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

As riquetsias são bactérias da ordem *Rickettsiales*, família *Rickettsiaceae* e subgrupo α -*Proteobacteria*. Apresentam o formato de pequenos batonetes, gram-negativos, corados pela fucsina básica no método de Giménez e são parasitas intracelulares obrigatórios. Dentre os vetores envolvidos em sua transmissão estão diversos artrópodes como: ácaros, carrapatos, piolhos e pulgas. As riquetsias são divididas em três grupos: o grupo ancestral formado pela *Rickettsia bellii* e *Rickettsia canadensis*; grupo do tifo composto pela *Rickettsia prowazekii* e *Rickettsia typhi*; grupo da febre maculosa com mais de 30 espécies descritas como causadoras de enfermidades já conhecidas, dentre elas: *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia conorii* assim como bactérias agentes das enfermidades emergentes descobertas no mundo nos últimos 16 anos: *Rickettsia felis*, *Rickettsia akari*, *Rickettsia africae*, *Rickettsia japonica*, *Rickettsia parkeri* e outras riquetsias de patogenicidade desconhecida, até o presente momento (EREMEEVA, 2003; FENG, 2003; FOURNIER et al., 2003; FOURNIER; ROUX; RAOULT, 1998; LABRUNA et al., 2004a, 2004c; RAOULT; ROUX, 1997; ROUX; FOURNIER; RAOULT, 1996; WATT; PAROLA, 2003).

No século 5 a.C há o relato da praga de Atenas, possivelmente o tifo murino causado pela *R. typhi*, caracterizando a primeira epidemia causada por riquetsias no mundo. Somente no século 16 d.C há a confirmação de uma epidemia de tifo murino ou epidêmico na Europa e a partir daí existem relatos de riquetsioses por todo o mundo. O primeiro relato da febre maculosa das Montanhas Rochosas (FMMR) foi em 1899 no estado de Idaho nos Estados Unidos da América e no Brasil foi descrita uma enfermidade chamada de tifo exantemático de São Paulo em 1929 cujos sintomas eram semelhantes à FMMR: febre alta, mialgias, prostração, cefaléia e no 2º a 6º dia exantema máculo-papular na face, palmar, plantar e óbito. Na década de 1930 foram descritos casos em Minas Gerais e esta doença foi renomeada como febre maculosa brasileira (FMB) pela semelhança antigênica à FMMR (DIAS; MARTINS; RIBEIRO, 1937; MOREIRA; MAGALHÃES, 1935, 1937; RAOULT; ROUX, 1997). Após a década de 1950 não ocorreram registros sistemáticos dos casos, somente alguns esparsos, havendo a suspeita que a descoberta dos antibióticos e seu uso em massa tenham diminuído o aparecimento de novos casos neste período. A partir de 1985, a ocorrência da doença foi novamente relatada nos

estados de São Paulo, Minas Gerais e São Paulo, com casos novos no estado do Espírito Santo pela primeira vez (LEMOS, 1996; LIMA, et al., 2003; GALVÃO, 2003; MELLES, 1992; ROZENTAL, 2002). A partir de 2002, a doença foi considerada de notificação compulsória no Brasil, sendo considerada atualmente a riquetsiose mais prevalente no país. Atualmente, as regiões endêmicas para FMB (causada por *R. rickettsii*) estão restritas aos estados do sudeste do Brasil: Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo. Casos recentes notificados nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul carecem da confirmação da espécie de *Rickettsia* envolvida. A FMMR também foi relatada em outros países da América Latina: Colômbia, Costa Rica, México e Panamá (LEMOS et al., 2001; LIMA et al., 2003; GALVÃO et al., 2003; GUEDES, 2005; SEXTON, 1993).

O diagnóstico clínico da FMB é difícil por esta apresentar sintomas inespecíficos como febre alta, mialgias, cefaléia e confundir-se com outras doenças febris e exantemáticas circulantes no país, como a dengue e a leptospirose, porém apresenta alta taxa de letalidade. O sintoma mais severo da FMB ocorre quando a bactéria se aloja no citoplasma de células endoteliais causando vasculite, hipoperfusão e mudanças na permeabilidade vascular, com prejuízo aos órgãos nobres como os pulmões e o cérebro (DUMBLER; WALKER, 2005; OLIVEIRA et al., 2002). O diagnóstico precoce da doença é essencial para o sucesso do tratamento e evitar a alta mortalidade e a falta de diagnóstico encobre a real taxa de mortalidade tanto no Brasil como nos E.U.A. (GALVÃO et al., 2003).

A FMB tem o carrapato *A. cajennense* como seu principal vetor no Brasil, porém outros artrópodes estão envolvidos na sua transmissão como o *Amblyomma aureolatum*. A FMMR tem como vetores nos E.U.A os carrapatos *Dermacentor andersoni* e *Dermacentor variabilis* e há relatos no México e nos E.U.A. do *R. sanguineus* como possível transmissor desta bactéria (LEMOS et al., 1997a; GALVÃO et al., 2003; GUEDES, 2005).

Pesquisando ectoparasitas de animais domésticos em Minas Gerais em uma região endêmica para a FMB foram encontradas amostras homólogas para *R. felis* em carrapatos *A. cajennense* e *R. sanguineus* e também em pulgas do gênero *Ctenocephalides*, além de *R. rickettsii* em carrapatos *A. cajennense*. Esta pesquisa demonstra a importância de uma busca epidemiológica ativa nos vetores conhecidos e suspeitos pois a *R. felis* foi caracterizada como agente de uma riquetsiose branda

e sem letalidade, tendo as pulgas *Ctenocephalides* spp como possíveis vetores (CARDOSO et al., 2006; HORTA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2002).

Após a virada do último milênio, foi descrita uma enfermidade em humanos nos E.U.A, cujo agente foi comprovado como *Rickettsia parkeri*, sem a confirmação do vetor, porém com a suspeita recaindo sobre o carrapato *Amblyomma maculatum*, espécie abundante na região de moradia do paciente. Esta bactéria foi considerada não patogênica por mais de 65 anos, desde a sua descoberta na década de 1930 e descrita por Lackman et al. (p. 137, 1965) como: “[...] pequenos organismos de formato arredondo, coradas em vermelho pelo corante de Macchiavello”. Uma riquetsiose cutâneo-ganglionar em humanos também foi diagnosticada no Uruguai, país fronteiro ao Brasil, cujo agente primeiramente diagnosticado por imonofluorescência indireta foi a *R. conorii*, porém em pesquisas posteriores no país foi comprovada a existência da *R. parkeri* em carrapato da espécie *Amblyomma triste*, coletado em uma pessoa diagnosticada com riquetsiose. Desta maneira aventou-se a possibilidade que o agente circulante nesta nação fosse a *R. parkeri* e não a *R. conorii*.

O carrapato *A. triste* também ocorre no Brasil, sendo relatado recentemente em grandes quantidades em regiões de várzeas na divisa dos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul (SZABÓ et al., 2003).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Amblyomma triste*

Foi Koch (1844), um naturalista alemão, quem descreveu pela primeira vez a espécie de carrapatos *A. triste* quando coletou 2 fêmeas em Montevideo, Uruguai, porém sem prover informações sobre o seu hospedeiro. O primeiro registro do *A. triste* no Brasil foi em 1928 quando uma fêmea foi depositada na Coleção do Instituto Oswaldo Cruz, coletada nas bordas do rio Cuminá, próximo ao município de Obidos no Estado do Pará. Somente em 1947 foi descrita outra fêmea coletada em anta (*Tapirus* spp) também às margens do rio Cuminá e em 1948 foram coletados um macho e duas fêmeas às margens do Rio Xingu, no Estado do Mato Grosso do Sul (KOHLS, 1956). Posteriormente foram relatados exemplares de *A. triste* coletados em cão doméstico e capivara (*Hydrochoeris hydrochaeris*) no Estado do Rio Grande do Sul, em gambá (*Didelphis marsupialis*) e tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) no Estado de São Paulo (EVANS; MARTINS; GUGLIEMONE, 2000; FREIRE, 1967/1968; LABRUNA et al., 2002; LEMOS et al., 1997; SINKOC et al., 1997). Szabó et al. (2003) sugeriu que o cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) desempenha o papel de hospedeiro primário para o estágio adulto na região do Pontal do Paranapanema.

Na América do Sul foi confirmado no Uruguai o parasitismo por *A. triste* em cão doméstico, bovinos, caprinos e eqüinos, humanos e em animais silvestres, segundo Venzal et al. (2003a). Além do Uruguai, esta espécie foi encontrada em humanos na Argentina, Colômbia, Peru, e Venezuela (SAMPAIO; CARBELLO; PARIETTI, 1992; VENZAL et al., 2003a, 2003b) e também em cão doméstico na Argentina, em gado no Equador e em suçuaranas (*Puma concolor*) e onça-pintada (*Panthera onca*) no chamado Chaco Paraguaio (DURDEN et al., 2006; IVANCOVICH, 1980; VENZAL et al., 2003).

No Uruguai foram encontradas formas imaturas do *A. triste* parasitando naturalmente diversos roedores silvestres: camundongo-do-mato (*Oligorysomys flavescens*), (*Oxymycterus nasutus*), rato-da-palha (*Scapteromys tumidus*) e preá

(*Cavia aperea aperea*), assim como em um pequeno marsupial chamado guaiquica (*Monodelphis dimidiata*) (ESTRADA-PEÑA; VENZAL; GUGLIELMONE, 2002; VENZAL et al., 2003c). A ausência de relatos das formas imaturas no Brasil pode estar ocorrendo pela identificação errônea desta espécie com outras, já que hospedeiros para estágios imaturos da maioria das espécies *Amblyomma* do Brasil são ainda mais escassos. Esta situação está ligada à falta de descrições morfológicas e chaves taxonômicas para a identificação de estágios imaturos *Amblyomma* na América Latina (LABRUNA et al. 2002).

Existem enganos na identificação das formas adultas do *A. triste* com outras espécies neotropicais como *Amblyomma maculatum* e *Amblyomma tigrinum*, sendo estas espécies ainda consideradas sinônimos do *A. maculatum* por muitos pesquisadores. (KOHLS, 1956; VENZAL et al., 2003a). A diferenciação do *A. triste* das outras espécies com sinonímia com o *A. maculatum* de acordo com Kohls (1956, p.146) é: “*A. triste* concorda com *A. tigrinum* tendo um esporão no metatarso das patas II, III e IV, mas diferencia-se desta espécie e do *A. maculatum* pela presença de um pequeno tubérculo ventralmente em ambos os sexos no ângulo interno-posterior de todos os festões, exceto no mediano”, confirmando neste trabalho que *A. maculatum*, *A. triste* e *A. tigrinum* eram espécies válidas e distintas. A distribuição das espécies favorece o engano na sua identificação, pois tanto o *A. triste* como o *A. tigrinum* estão restritos à América do Sul, enquanto o *A. maculatum* é encontrado do Sul dos E.U.A à Colômbia, Venezuela e Peru (EVANS, 2000; GUGLIELMONE; MANGOLD; HADANI, 1982).

Relatos de parasitismo no Brasil por *A. tigrinum* em cervo-do pantanal (*B. dichotomus*) provavelmente foram equivocados e o real ectoparasita seria o *A. triste* (LABRUNA et al., 2002). Alguns exemplares citados neste cervídeo como *A. tigrinum* foram revistos, sendo identificados como *A. triste* e coleções entomológicas também revisaram seu material descobrindo exemplares de *A. tigrinum* e *A. triste* erroneamente identificados como *A. maculatum*. É interessante ressaltar que existem evidências moleculares que *A. maculatum* e *A. triste* sejam a mesma espécie de carrapato (GUGLIELMONE; MANGOLD; HADANI, 1982; SZABÓ et al., 2001, 2003; VENZAL, 2003a).

Para prover informações sobre o ciclo de vida do *A. triste* no Brasil Labruna e colaboradores (2003) simularam em laboratório o ciclo de vida do *A. triste* usando

modelos animais para simular os hospedeiros naturais. Obtiveram como resultados para a recuperação das larvas e ninfas a cobaia (*Cavia aperea porcellus*) como melhor hospedeiro, seguido pelas galinhas (*Gallus gallus*), podendo supor a manutenção das formas imaturas na natureza em seus paralelos silvestres: preás e aves silvestres. Para as formas adultas o hospedeiro mais competente foi a capivara (*H. hydrochaeris*), seguida pelo cão. A distribuição da capivara corresponde às áreas alagadiças próximas a cursos de água onde foram encontrados os exemplares de *A. triste* no Brasil. A recuperação em roedores foi menos eficiente, porém existem uma ampla gama de espécies com diferentes nichos e a adaptação do *A. triste* aos seus hospedeiros no Brasil pode ser diferente da observada no Uruguai, onde o cão exerce o papel de hospedeiro primário para as formas adultas.

Segundo Sinkock (1997) a frequência parasitária de *A. triste* encontrada em capivaras (*H. hydrochaeris*) de vida livre no Brasil pode indicar adaptação a este roedor como hospedeiro de formas adultas, concordando com os resultados encontrados por Labruna et al. (2003). Há a hipótese da manutenção da população de *A. triste* nas áreas pesquisadas em capivaras (*H. hydrochaeris*) substituindo o cervo-do-pantanal (*B. dichotomus*), cuja população foi drasticamente diminuída na região. Estudos realizados ainda na década de 1940 apontam a probabilidade de preás (*C. aperea*) e capivaras (*H. hydrochaeris*) serem amplificadores e mantenedores da *R. rickettsii*, mantendo assim o ciclo da bactéria na natureza e outras bactérias do GFM podem ter esta característica, inclusive a *R. parkeri* (TRAVASSOS; VALLEJO, 1942a, 1942b, MACHADO et al., 2006).

2.2 *Rickettsia parkeri*

Em 1937, após a coleta de carrapatos para a busca ativa de possíveis agentes patogênicos ao homem, foi isolado por Ralph Robinson Parker, um agente infeccioso em *A. maculatum*, proveniente do estado do Texas. Este patógeno causava em cobaias (*C. aperea porcellus*) sintomas semelhantes à *R. rickettsii*, porém brandos e sem mortalidade. Este agente apresentou imunidade cruzada com a FMMR e febre botonosa mas era um agente distinto dos citados (PARKER et al.,

1939). Os pesquisadores Lackman, Parker e Gerloff (1949), após a repetição do experimento de Parker, confirmaram os sintomas brandos em cobaias (*C. aperea porcellus*): febre branda, edema testicular leve e recuperação total dos animais. Esta amostra maculatum novamente se diferenciava dos sintomas severos causados pela *R. rickettsii* em cobaias como: febre alta, edema testicular e de extremidades severo, podendo chegar a necrose e mortalidade da maioria dos animais (PARKER et al., 1939).

A Nomeação da chamada amostra Maculatum como *Rickettsia parkeri* se deu em homenagem ao importante riquetsiologista americano R. R. Parker por Lackman et al. (1965), que também a incluiu no mesmo grupo da *R. conorii*, pela semelhança de resultados em teste de neutralização de toxinas. Existiram diferenças nos teste de fixação de complemento, com esta bactéria apresentando reações sorológicas distintas das outras riquetsias conhecidas do GFM.

Até a primeira metade do século XX a *R. rickettsii* era considerada o principal agente de riquetsioses, causando a FMMR, sendo outras riquetsias consideradas não patogênicas segundo Raoult e Roux (1997) que afirmam se a riquetsia é encontrada em uma espécie de carrapato com antropofilia então há potencial desta bactéria causar doenças ao homem e a não patogênica deve ser classificada como apresentando patogenicidade desconhecida ou ainda não descoberta. Com a evolução das técnicas diagnósticas, cada vez mais espécies de riquetsias foram sendo descobertas e segundo Raoult (2004, p. 813): “[...] vários fatos estão para ser descobertos, mesmo nas doenças clássicas e que descrições de doenças infecciosas permanecem inalteradas somente quando não são mudadas por novas investigações”. A *R. parkeri* estava na lista das riquetsias consideradas não patogênicas, ou de patogenicidade desconhecida para o homem. Esta definição continuou até mais de 65 anos da sua descoberta quando Paddock e colaboradores (2004) descreveram-na como agente de uma riquetsiose em humanos, comprovando-o por teste de imunofluorescência indireta com anticorpos para *R. rickettsii* e *R. akari*., isolamento do agente em cultura de células Vero, PCR e sequenciamento, (GODDARD, 2003; RAOULT; ROUX, 1997; VENZAL et al., 2004). Paddock (2005) sugere que o primeiro caso humano de riquetsiose por *R. parkeri* pode ter sido documentado não intencionalmente antes mesmo da descrição do agente em 1926 e Raoult (2004) afirma que em 1990 a análise molecular de um

paciente que veio a óbito com uma doença febril mostrou um isolado considerado como *R. rickettsii* porém indiferenciado da *R. parkeri*, porém na época esta não foi reportada como um novo agente, fato ocorrido somente em 2004.

No Uruguai foram descritos por Conti-Díaz (1990) três casos de uma riquetsiose cutâneo-ganglionar em humanos cujos sintomas eram semelhantes à febre botonosa (requetsiose endêmica nos países banhados pelo Mediterrâneo), com adenopatias regionais, febre, artralguas, miopatias e exantema maculo-papular. A lesão característica desta enfermidade é a chamada “tache noir” no local da picada e os vetores são carrapatos do gênero *Rhipicephalus* e tem como agente a *R. conorii*. O diagnóstico do agente *R. conorii* foi feito pelo exame de imunofluorescência indireta IgM (anti-*R. conorii*), o vetor foi identificado como a espécie de carrapato *A. maculatum*. Novos casos desta rickettsiose emergente foram reportados posteriormente, sendo considerada uma doença endêmica no Uruguai, e em todos os casos havia uma lesão inicial pápulomatosa pequena no local da picada, adenopatias regionais, porém somente em quatro casos o agente foi confirmado como *R. conorii* pelo exame de imunofluorescência indireta. (CONTI DÍAZ, 2001a, 2001b, 2003). Venzal e colaboradores (2003a, 2003b) atentam para o fato dos novos casos desta riquetsiose apontarem para a necessidade de uma busca ativa de casos não diagnosticados desta enfermidade.

Nesta mesma época conseguiu-se a detecção de *R. parkeri* em um exemplar de *A. triste* e segundo os autores (VENZAL et al., 2004, p.1494): “Nossas informações sugerem que *Amblyomma triste* é um hospedeiro de *Rickettsia* do GFM no Uruguai, e *Rickettsia parkeri* pode ser o agente causal dos casos humanos de riquetsioses no Uruguai”. Neste mesmo trabalho o autor sugere que ocorreu uma identificação errônea dos vetores como *A. maculatum* que seriam na verdade o *A. triste*, responsável pela maioria dos casos de parasitismo humano no Uruguai sendo este fato aceito pelo autor que descreveu os primeiros casos desta enfermidade (VENZAL et al., 2003a, 2003b, 2004). O fato do agente desta riquetsiose ter sido diagnosticado somente com evidências sorológicas, sem o uso de técnicas de biologia molecular, como PCR e isolamento em cultura de células, não descartava a possibilidade de outra *Rickettsia* estar circulante no Uruguai, fato confirmado pelo isolamento da *R. parkeri* (Conti-Díaz, 2003; VENZAL et al., 2004).

Nos Estados Unidos da América Philip e White (1955) descreveram 8 isolados da “amostra maculatum” em carrapatos da espécie *A. maculatum* em diferentes estados ao longo da costa do Golfo do México nos Estados Unidos. Em trabalho na década de 1980, após teste de hemolinfa em carrapatos *A. maculatum* o autor considera uma possível associação deste carrapato com riquetsias. (GODDARD; NORMENT, 1986). Já Goddard (2003) demonstrou experimentalmente que há o desenvolvimento e a manutenção da infecção com *R. parkeri* por 2 ou mais gerações de *A. maculatum*. Há a sugestão de desenvolvimento da *R. parkeri* em *A. cajennense* o que pode implicar em mais um vetor desta rickettsia com distribuição em todo o território brasileiro e vários países da América Latina (PADDOCK, 2005; SANGIONI et al., 2005).

3 OBJETIVOS

- Avaliar a frequência de carrapatos *Amblyomma triste* infectados pela bactéria *Rickettsia parkeri* em uma área do Estado de São Paulo.
- Buscar o isolamento em cultura de células Vero da bactéria *Rickettsia parkeri* a partir do carrapato *Amblyomma triste* naturalmente infectado.
- Realizar a caracterização molecular do isolado de *Rickettsia parkeri* brasileiro.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta dos carrapatos *Amblyomma triste*

Durante o período de 25 a 26 de janeiro de 2005, carrapatos da espécie *A. triste* de vida livre foram capturados em área de várzea numa propriedade rural da Companhia Energética de São Paulo (CESP), no município de Paulicéia, Estado de São Paulo (Tabela 1). A Figura 1 demonstra os locais de coleta, cujas coordenadas foram obtidas por aparelho de geoposicionamento por satélite (Carmin GPS 12 XL, Olathe, KS, USA). O município de Paulicéia localiza-se a 686 Km da capital do estado, apresenta 374 Km² de área total e tem aproximadamente 6.019 habitantes (IBGE, 2006).

Tabela 1 – Locais de coleta de carrapatos da espécie *A. triste* no município de Paulicéia, SP, no período de 25 a 26 de janeiro de 2005

Local de coleta	Coordenadas		Data
	Latitude	Longitude	
Ponto A	21° 07' 17,3" S	51° 46' 08,1" W	25/01/2005
Ponto B	21° 07' 10,3" S	51° 46' 05,2" W	25 e 26/01/2005
Ponto C	21° 06' 08,0" S	51° 42' 46,6" W	26/01/2005

Figura 1– Mapa de Paulicéia e pontos de coleta (A, B, C) dos carrapatos

Para captura dos carrapatos, foram utilizadas armadilhas de gelo seco (CO_2), segundo Oliveira et al. (2000). As armadilhas foram montadas em áreas de várzea por ser este o principal habitat de um dos hospedeiros naturais do *A. triste*, o cervo-do-pantanal (*B. dichotomus*) conforme Szabó et al. (2003). Os carrapatos capturados foram transportados vivos em frascos plásticos tampados e com pequenos furos para a entrada de ar, tendo papel absorvente em seu interior, para evitar o excesso de umidade. Os artrópodes foram trazidos para o laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Os carrapatos foram mantidos vivos em estufa BOD (câmara climática MA 402 Marconi®) a 34°C , com umidade relativa maior que 95% durante quatro dias, buscando favorecer a multiplicação das riquétsias. A identificação da espécie de carrapato como *A. triste* foi feita segundo as chaves taxonômicas de Aragão e Fonseca (1961) e Guimarães, Tucci e Barros-Battesti (2001).

Foram coletados 31 indivíduos adultos da espécie *A. triste*, estando ilustrados nas figuras 2 e 3.

Foto por Maria Ogrzewalska

Figura 2 – *A. triste* fêmea

Foto por Maria Ogrzewalska

Figura 3 – *A. triste* macho

4.2 Teste de hemolinfa

O teste de hemolinfa é um método de triagem que permite identificar carrapatos adultos que estejam infectados por organismos morfológicamente compatíveis com o gênero *Rickettsia* (BURGDORFER, 1970). De cada carrapato a porção distal de uma das patas dianteiras foi cortada com tesoura e uma a duas gotas de hemolinfa foram pingadas em lâminas de vidro, previamente limpas e desengorduradas. As lâminas foram fixadas a temperatura ambiente, coradas pelo método de Giménez (1964) e examinadas ao microscópio óptico com aumento de 1000x, em óleo de imersão. Após este procedimento os carrapatos foram acondicionados individualmente em microtubos (Eppendorf®) de 1,5 ml e congelados em freezer a -80°C, para aguardar o processamento pela técnica de PCR ou isolamento de rickettsia em cultivo celular.

4.3 Extração de DNA dos carrapatos

Todos os carrapatos congelados, que foram negativos ao teste de hemolinfa, foram descongelados e processados diretamente pela técnica de extração do DNA, conforme descrito a seguir. A técnica utilizada foi uma adaptação do protocolo descrito por Chomekzynski (1993), conforme adotado por Sangioni et al. (2005). Cada carrapato inteiro foi triturado em microtubo de 1,5 ml, com o auxílio de um micropistilo. Ao tubo foram adicionados 150 µl de tampão TE pH 8,0 (10 mM TRIS HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) seguindo-se de homogeneização no vórtex e centrifugação (Eppendorf® Centrifuge 5415D) por 6 segundos. Acrescentou-se 450 µl de GT (5 ml TRIS HCl pH 7,5; 10 ml EDTA 0,5 M, pH 8,0; 60g de isotiocianato de guanidina) e esta mistura foi homogeneizada no vórtex a cada 2 minutos e meio, até o tempo total de 10 minutos. Foram acrescentados 100 µl de clorofórmio e os tubos centrifugados a 12.000 rpm, durante 5 minutos. Após a retirada da fase aquosa superior o tubo com o carrapato foi descartado e o líquido recolhido colocado em novo microtubo, ao qual foram adicionados 400 µl de propanol e colocado em freezer (-20°C) para descanso mínimo de 2 horas. Após o repouso a amostra foi centrifugada (Eppendorf® Centrifuge 5804R) refrigerada a 4°C a 12.000 rpm, durante 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 800 µl de etanol 70%, centrifugado refrigerado (4°C) a 12.000 rpm, durante 15 minutos. O líquido foi descartado e o sedimento final ressuspensionado em 30 µl de TE pH 8,0, colocado em banho-maria a 56°C durante 15 minutos, para facilitar a dissolução do DNA previamente precipitado. O material genético extraído foi quantificado em espectrofotômetro digital com comprimento de onda de 50- 60 Hz (Eppendorf® AG Biophotometer), antes de ser congelado (-20°C), para aguardar análise pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

4.4 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

O DNA extraído de cada carrapato foi individualmente testado pelo par de primers 1 (Quadro 1). Esses primers são mais sensíveis e amplificam um fragmento de 401-pb de qualquer espécie de *Rickettsia*, sendo indicados para triagem para presença de DNA de *Rickettsia* (LABRUNA et al., 2004a). Uma vez positivo para esses primers, o material era testado pelos demais pares de primers descritos no

Quadro 1. Como controle positivo da PCR, foi utilizado DNA de carrapato *A. cajennense* experimentalmente infectado por *R. parkeri* (SANGIONI et al., 2005).

Para cada reação de PCR, foram acrescentados 5 µl da amostra de DNA extraído aos reagentes da reação de PCR, de acordo com o gene utilizado, conforme demonstra o Quadro 2.

Pares de primers	Genes e primers	Sequência de nucleotídeos (5' - 3')	Tamanho do produto amplificado (pb)	Posição relativa à ORF
	<i>gltA</i> (citrito sintase)			
1	CS-78	GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT	401	-78 to -56
	CS-323	GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT		323-296
2	CS-239	GCTCTTCTCATCCTATGGCTATTAT	834	239-263
	CS-1069	CAGGGTCTTCGTGCATTTCTT		1069-1049
	<i>ompA</i> (190 kDa)			
3	<i>Rr190.70p</i>	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA	530	478 a 499
	<i>Rr190.602n</i>	AGTGCAGCATTTCGCTCCCCCT		990 a 969
	<i>htrA</i> (17 kDa)			
4	17k-5	GCTTTACAAAATTCTAAAAACCATATA	549	-62 a -34
	17k-3	TGTCTATCAATTCACAACTTGCC		+6 a 464
	<i>ompB</i> (135 kDa)			
5	120-M59	CCGCAGGGTTGGTAACTGC	856	M59 a M41
	120-807	CCTTTTAGATTACCGCCTAA		807 a 788

Quadro 1 – Primers (oligonucleotídeos iniciadores) utilizados para amplificação dos diferentes fragmentos dos genes do gênero *Rickettsia*

Reagentes	Citrato Sintase	<i>OmpA</i>	<i>OmpB</i>	<i>htrA</i>
Tampão “buffer” 10 X	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl
Nucleotídeos trifosfatados (Dntp 1,25 mM)	8,0 µl	8,0 µl	8,0 µl	8,0 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl
Primer Foward (pmoles/µl)	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
Primer Reverse (pmoles/µl)	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
Taq polimerase (5000 U/ml)	0,3 µl	0,3 µl	0,5 µl	0,25 µl
H ₂ O mili Q q.s.p.	25,2 µl	25,2	25,00 µl	25,25 µl
TOTAL	45 µl	45 µl	45 µl	45 µl

Quadro 2 – Concentração dos reagentes empregados na reação em cadeia pela polimerase (PCR) de acordo com o gene alvo buscado

Após o acréscimo do DNA, cada reação de PCR foi ao aparelho de termociclador (Eppendorf® Mastercycler gradient) para ser processada segundo o protocolo específico para cada gene, conforme demonstrado no Quadro 3.

Etapas	<i>gltA</i>	<i>ompA</i>	<i>ompB</i>	<i>htrA</i>
Desnaturação inicial	95°C 3 min	95°C 5 min	95°C 3 min	94°C 3 min
Número de ciclos	40	35	40	35
Desnaturação	95°C 15 seg	95°C 40 seg	95°C 30 seg	94°C 45 seg
Anelamento	48°C 30 seg	58°C 30 seg	50°C 30 seg	56°C 1 min
Extensão	72°C 30 seg	65°C 45 seg	68°C 1 min e 30 seg	72°C 1 min e 30 seg
Extensão final	72°C 7 min	72°C 10 min	68°C 1 min	72°C 10 min

Quadro 3 – Protocolos do termociclador de acordo com o gene alvo utilizado na PCR

4.5 Análise dos produtos amplificados

Os produtos amplificados da reação de PCR foram visualizados com aparelho de eletroforese em gel de agarose a 2% (100ml TBE 0,5%; 2,0g agarose UltraPure™ Agarose Invitrogen™), em cuba horizontal e tampão TBE 0,5X (0,045 M Tris-borato; 0,001 M EDTA pH 8,0) submetida à voltagem de 1 a 10 V/cm durante 30 minutos. A revelação se deu em solução de brometo de etídeo (0,5 ug/ml) em agitação por 15 a 30 minutos e a visualização das bandas em transiluminador ultravioleta.

4.6 Seqüenciamento do DNA genômico

Todos os produtos amplificados obtidos nas reações de PCR foram purificados. Acrescentou-se ao total da amostra 40 µl de álcool isopropílico 100%, homogenizou-se e o tubo ficou em descanso, protegido da luz, por uma hora. Após este tempo o tubo foi centrifugado refrigerado (25°C) a 14.000 rpm durante 25 minutos. O sobrenadante foi descartado e acrescentado ao tubo 300 µl de etanol 70%, sendo homogeneizado e centrifugado refrigerado (25°C) a 14.000 rpm durante 10 minutos. Após a centrifugação o líquido foi descartado e o tubo colocado em termobloco (Type 17600 Dri-Bath Barnstead Thermolyne) a 80°C por 2 minutos, o DNA foi ressuspensionado em 30 µl de tampão TE pH 8,0 e posto no termobloco a 56 °C por 15 minutos.

Ao DNA purificado foram acrescentados os reagentes nas quantidades demonstradas no Quadro 4 e os primers foram acrescentados de acordo com o gene utilizado na PCR, *gltA* ou *ompA* (Quadro 1). Esta mistura foi processada no aparelho de termociclador (Quadro 5).

Reagentes	Quantidades
“Big Dye”	1 µl
Tampão	2 µl
Primer (pmoles/µl)	1 µl
DNA purificado	4 µl
H ₂ O mili Q q.s.p.	2 µl
TOTAL	10 µl

Quadro 4 – Reagentes para a reação de seqüenciamento

Após a reação de seqüenciamento no termociclador foi realizada a precipitação do DNA com o acréscimo de 40 µl de álcool isopropílico 65% ao total da amostra, após homogeneização o tubo foi deixado em descanso protegido da luz, por 20 minutos e centrifugado refrigerado (25°C) a 14.000 rpm durante 25 minutos. O sobrenadante foi descartado e acrescentado ao tubo 300 µl de etanol 60%, homogeneizado e centrifugado refrigerado (25°C) a 14.000 rpm durante 10 minutos.

Após a centrifugação o líquido foi descartado e o tubo colocado em termobloco a 80°C por 2 minutos. O tubo foi armazenado em freezer (-20°C) para aguardar a leitura do seqüenciamento direto de nucleotídeos no sequenciador automático de DNA. Foi utilizado o seqüenciador de DNA modelo ABI Prism™ 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems), segundo seu manual de instruções. As seqüências obtidas foram editadas com o pacote de programas BioEdit® Sequence Alignment Editor (HALL, 1999) e submetidas à análise de similaridade com as seqüências disponíveis de espécies de riquetsias no GenBank, através do programa BLAST analysis (ALTSCHUL et al., 1990).

Etapas	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	96°C	1min
Número de ciclos	40	
Desnaturação	96°C	15 seg
Anelamento	50°C	15seg
Extensão	60°C	4min

Quadro 5 – Protocolo para a reação de seqüenciamento, São Paulo, 2006

4.7 Isolamento e detecção das riquetsias

Carrapatos positivos ao teste de hemolinfa foram descongelados para tentar o isolamento de riquetsias em cultura de células Vero pela técnica de “shell vial”, conforme descrito por Espejo-Arenas (1989) e Marrero e Raoult (1989) utilizado por Labruna et al. (2004a). Cada carrapato foi triturado em meio BHI estéril (1 ml), com pinças e tesouras estéreis, inoculado em monocamada de células Vero presentes no fundo raso de 3 tubos “shell vial” para cada amostra, os quais foram centrifugados refrigerados (22°C) a 700 g durante uma hora. Após isso a monocamada de células Vero foi lavada com meio “Minimum Essential Medium” (MEM) contendo 5% de soro fetal bovino e para cada tubo foi acrescentado 1 ml deste mesmo meio com antibióticos (penicilina G Sódio 10,000 ug/ml, estreptomicina sulfato 25 ug/ml, GIBCO™ Invitrogen™) e incubados em Estufa BOD nas temperaturas de 28°C, 32°C

e 37°C (um tubo para cada temperatura). Após três dias os antibióticos foram retirados, o meio líquido de cada tubo foi centrifugado e o sedimento fixado em lâmina de vidro. Cada lâmina foi corada pelo método de Giménez (1964) para visualização de estruturas semelhantes a riquetsias no interior das células, conforme Labruna et al. (2004a). Quando demonstradas estas estruturas compatíveis com riquetsias as células do tubo foram raspadas com a ponta de uma pipeta e inoculadas em garrafa de 25cm² com monocamada de células Vero, visando estabelecer o isolado em laboratório. A amostra negativa continuou com os tubos incubados na mesma temperatura sendo examinados a cada três dias, até a monocamada estar naturalmente destruída.

4.8 Manutenção em laboratório do isolado de *Rickettsia parkeri*

Assim que as células do “shell vial” se mostraram infectantes estas foram inoculadas em garrafa de 25cm² (com uma monocamada de células Vero), monitoradas até demonstrarem um mínimo de 90% de células infectadas pela *Rickettsia*, através da raspagem das células com raspador (COSTAR® Corning Incorporation) e leitura em lâmina corada pela coloração de Giménez (1964), observada em microscópio óptico com aumento de 1000X em óleo de imersão. Estando infectada nesta magnitude, a monocamada foi raspada e transferida para garrafas de 150cm², com monocamada de células Vero, sendo estas também monitoradas até demonstrarem um nível de infecção próximo a 100% das células nas lâminas coradas com coloração de Giménez (1964). A partir daí, várias passagens do isolado foram realizadas em garrafas de 150cm², com monocamada de células Vero. Em todas as passagens, as garrafas foram raspadas sendo uma pequena parte da suspensão de células inoculadas numa nova monocamada não infectada e o restante da suspensão de células foi centrifugada a 4.000 rpm, por 5 minutos e o sedimento de células ressuspendido em tampão SPG (sucrose-fosfato-

glutamato, pH 7.0) estéril para congelamento a -80°C, caracterizando-se como amostras de referência para o isolado obtido (LABRUNA et al., 2004a).

4.9 Identificação genotípica do isolado de *Rickettsia* spp.

Uma alíquota de células Vero infectadas da terceira passagem do isolado foi submetida à extração de DNA, técnica de PCR e seqüenciamento gênico dos fragmentos amplificados, conforme descrito nos subitens 4.3 a 4.7 acima, visando caracterizar a espécie de riquetsia isolada. Neste caso, uma bateria de PCR foi utilizada com o objetivo de amplificar fragmentos dos genes *gltA*, *htrA*, *ompA* e *ompB* (Quadro 2). Os produtos de PCR obtidos foram submetidos à mesma técnica para o seqüenciamento de nucleotídeos (item 4.6), visando a identificação genotípica da riquetsia isolada em cultivo celular.

4.10 Frequência de carrapatos infectados

Para determinar a frequência de carrapatos *A. triste* infectados por *R. parkeri* foram analisados os resultados positivos da técnica de PCR seguido de seqüenciamento gênico, além dos dados moleculares do isolado obtido dos carrapatos inoculados em células Vero pela técnica shell-vial.

5 RESULTADOS

5.1 Coleta dos carrapatos

Em janeiro de 2005 foram capturados 31 adultos de vida livre da espécie *A. triste*, sendo 16 machos (51,6%) e 15 fêmeas (48,4%), coletados em 3 pontos distintos descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Carrapatos da espécie *Amblyomma triste* de vida livre por quantidade por local de coleta, sexo e data

Local de coleta	Nº de carrapatos coletados	%	<i>Amblyomma triste</i>	
			Fêmeas	Machos
Ponto A	3	9,7	3	—
Ponto B	24	77,4	10	14
Ponto C	4	12,9	2	2
Total	31	100	15	16

5.2 Teste de hemolinfa

A frequência de carrapatos positivos ao teste de hemolinfa foi de 9,7%, já que três de um total de 31 carrapatos submetidos demonstraram estruturas compatíveis com *Rickettsia* spp no interior de seus hemócitos. Conforme demonstrado na Tabela 3, o ponto B proveu 2 carrapatos positivos e o ponto C um carrapato positivo.

Tabela 3 – Resultados do teste de hemolinfa para os carrapatos da espécie *A. triste* coletados no município de Paulicéia

Número do carrapato	Local de coleta	Sexo	Teste de hemolinfa
1	Ponto A	Fêmea	Negativo
2	Ponto A	Fêmea	Negativo
3	Ponto A	Fêmea	Negativo
4	Ponto B	Macho	Negativo
5	Ponto B	Macho	Negativo
6	Ponto B	Macho	Negativo
7	Ponto B	Macho	Negativo
8	Ponto B	Macho	Positivo
9	Ponto B	Macho	Negativo
10	Ponto B	Fêmea	Negativo
11	Ponto C	Fêmea	Positivo
12	Ponto C	Fêmea	Negativo
13	Ponto C	Macho	Negativo
14	Ponto C	Macho	Negativo
15	Ponto B	Macho	Negativo
16	Ponto B	Macho	Negativo
17	Ponto B	Macho	Negativo
18	Ponto B	Macho	Negativo
19	Ponto B	Macho	Negativo
20	Ponto B	Macho	Negativo
21	Ponto B	Fêmea	Negativo
22	Ponto B	Fêmea	Negativo
23	Ponto B	Fêmea	Negativo
24	Ponto B	Fêmea	Positivo
25	Ponto B	Fêmea	Negativo
26	Ponto B	Fêmea	Negativo
27	Ponto B	Fêmea	Negativo
28	Ponto B	Fêmea	Negativo
29	Ponto B	Fêmea	Negativo
30	Ponto B	Fêmea	Negativo
31	Ponto B	Fêmea	Negativo

5.3 Isolamento da *R. parkeri* em cultura de células Vero

Dois dos três carrapatos positivos ao teste de hemolinfa foram descongelados e submetidos à técnica de Shell vial para o isolamento de riquetsias em cultura de células Vero. Um isolado de riquetsia foi obtido com sucesso de um dos carrapatos, no Shell vial incubado a 28°C, (Figura 4) . As células deste Shell vial foram raspadas e inoculadas em uma garrafa de 25cm² contendo uma monocamada de células

Vero, a qual demonstrou 90% das células infectadas após 10 dias, sob incubação a 28°C. As células desta garrafa 25cm² foram então raspadas e inoculadas em uma garrafa de 150cm², contendo uma monocamada de células Vero, a qual demonstrou 90% das células infectadas após 4 dias, sob incubação a 28°C. A partir daí, o isolado foi mantido por sucessivas passagens em garrafas de 150cm², sempre demonstrando 100% de infecção após 9 a 15 dias. Este isolado encontra-se estabelecido em cultivo celular e foi depositado como amostra de referência em nosso laboratório. Várias alíquotas de diferentes partidas do isolado foram congeladas a -80°C e em nitrogênio líquido.

Figura 4 – Células Vero infectadas por *R. parkeri* (coloração de Gimenez, 1000x)

5.4 Manutenção em laboratório e caracterização molecular do isolado de *Rickettsia*.

O isolado de riquetsia já se encontra estabelecido em laboratório, com várias passagens em cultura de células Vero, sempre demonstrando 90-100% de infecção das células (Figura 4). Uma suspensão de células da quarta passagem foi submetida à extração de DNA e este foi processado para uma bateria de PCRs, objetivando amplificar fragmentos dos genes *gltA*, *htrA*, *ompA* e *ompB* de riquetsias, utilizando todos os primers descritos no Quadro 1. Produtos esperados foram amplificados para todos os quatro genes descritos no Quadro 1, sendo submetido ao sequenciamento de DNA. As seqüências obtidas apresentaram 99,8% a 100% de identidade com as seqüências correspondentes de *Rickettsia parkeri* (amostra Maculatum) no GenBank, conforme descrito na Tabela 4.

Tabela 4 – Similaridade em percentagem das seqüências dos fragmentos dos genes *gltA*, *ompA*, *ompB* e *htrA* do presente isolado de *Rickettsia* com outras seqüências disponíveis no GenBank

Gene de <i>Rickettsia</i>	Tamanho do fragmento (nt)	Maior similaridade com as seqüências disponíveis no GenBank
<i>gltA</i>	1093	100% (1093/1093) com <i>Rickettsia parkeri</i> (U59732) 99,9% (1092/1093) com <i>Rickettsia sibirica</i> (U59734)
<i>ompA</i>	479	100% (479/479) com <i>Rickettsia parkeri</i> (U43802) 98,3% (471/479) com <i>Rickettsia africae</i> (U83436)
<i>ompB</i>	775	100% (775/775) com <i>Rickettsia parkeri</i> (AF123717) 98,7% (765/775) com <i>Rickettsia africae</i> (AF123706)
<i>htrA</i>	489	99,8% (487/489) com <i>R. parkeri</i> (U17008)

5.5 Reação em cadeia pela polimerase (PCR) dos carrapatos coletados

Amostras de DNA foram extraídas dos 28 carrapatos previamente negativos ao teste de hemolifa, de um carrapato positivo ao teste de hemolinfa, porém não submetido ao protocolo de isolamento de *Rickettsia* em cultivo celular, e dos restos teciduais do macerado dos dois carrapatos positivos ao teste de hemolinfa, que haviam sido testados para o isolamento de *Rickettsia* em cultivo celular, conforme descrito no item 5.3. Desse total de 31 carrapatos, apenas 3 foram positivos pela PCR para o gene *gltA* (Tabela 5). Esses 3 carrapatos foram exatamente os mesmos que haviam sido positivos ao teste de hemolinfa (Tabela 3). Os mesmos 3 carrapatos também foram positivos na PCR para o gene *ompA*. Sendo assim, dos 31 carrapatos, 3 (9,7%) foram positivos à PCR para *Rickettsia*.

Tabela 5 – Resultados da PCR para os genes de *Rickettsia* spp (*gltA* e *ompA*) em carrapatos da espécie *A. triste* coletados no município de Paulicéia

Número do carrapato	Local de coleta	<i>gltA</i>	<i>ompA</i>
1	Ponto A	Negativo	Negativo
2	Ponto A	Negativo	Negativo
3	Ponto A	Negativo	Negativo
4	Ponto B	Negativo	Negativo
5	Ponto B	Negativo	Negativo
6	Ponto B	Negativo	Negativo
7	Ponto B	Negativo	Negativo
8	Ponto B	Positivo	Positivo
9	Ponto B	Negativo	Negativo
10	Ponto B	Negativo	Negativo
11	Ponto C	Positivo	Positivo
12	Ponto C	Negativo	Negativo
13	Ponto C	Negativo	Negativo
14	Ponto C	Negativo	Negativo
15	Ponto B	Negativo	Negativo
16	Ponto B	Negativo	Negativo
17	Ponto B	Negativo	Negativo
18	Ponto B	Negativo	Negativo
19	Ponto B	Negativo	Negativo
20	Ponto B	Negativo	Negativo
21	Ponto B	Negativo	Negativo
22	Ponto B	Negativo	Negativo
23	Ponto B	Negativo	Negativo
24	Ponto B	Positivo	Positivo
25	Ponto B	Negativo	Negativo
26	Ponto B	Negativo	Negativo
27	Ponto B	Negativo	Negativo
28	Ponto B	Negativo	Negativo
29	Ponto B	Negativo	Negativo
30	Ponto B	Negativo	Negativo
31	Ponto B	Negativo	Negativo

5.6 Sequenciamento

Foi realizado o sequenciamento dos fragmentos amplificados do gene *ompA* para os 3 carrapatos positivos à PCR, sendo todos apresentando 100% de similaridade com a sequência correspondente de *R. parkeri* no GenBank (U43802), conforme demonstrado na Tabela 6.

Tabela 6 – Similaridade em percentagem das seqüências dos fragmentos do gene *ompA* dos carrapatos positivos para a PCR com outras seqüências disponíveis no GenBank

Gene de <i>Rickettsia</i>	Tamanho do fragmento (nt)	Similaridade com as seqüências do GenBank
<i>ompA</i>	479	100% (479/479) com <i>Rickettsia parkeri</i> (U43802)
		98,3% (471/479) com <i>Rickettsia africae</i> (U83436)

6 DISCUSSÃO

Nos últimos 20 anos, houve vários relatos de novas espécies de *Rickettsia* e de novas áreas de ocorrência para as espécies já conhecidas, em várias partes do mundo. No entanto, a América do Sul não estava sendo contemplada nesses novos relatos, mesmo com uma grande população de vetores e alta taxa de invasão de áreas naturais pelo avanço agrícola industrial humano, o que pode aumentar o contato com doenças emergentes. Publicações recentes, a partir do início deste século, mostraram que existem novas riquetsias circulantes na América Latina. O desconhecimento anterior se deu provavelmente pelas poucas pesquisas nestes países com os vetores, juntamente com a falta de preparo dos médicos em reconhecer a riquetsioses e realizar os testes diagnósticos necessários. Com a comprovação destas novas espécies de *Rickettsia* no Brasil e América Latina, apresentando patogenicidade desconhecida ou sem casos de doença registrada, aumentaram as dúvidas com relação à capacidade de morbidade destas riquetsias. Somente algumas dessas amostras foram isoladas em cultivo celular e caracterizadas genotipicamente pelo sequenciamento de porções significativas de pelo menos dois genes presentes nas riquetsias, comparados com outros genótipos já estudados (FOURNIER et al. 2003; LABRUNA et al., 2004a,b,c; WALKER, 2004; VENZAL et al., 2004).

A bactéria *R. rickettsii* é comprovadamente mantida transovarialmente por gerações nos carrapatos, porém há efeitos deletérios ao vetor e esta não é extinta porque há transmissão transovariana da bactéria. O homem é um hospedeiro acidental e o conhecimento é falho de quais são os hospedeiros críticos dos carrapatos na natureza, mantendo a riquetsia circulante. A epidemiologia da doença é determinada por fatores climáticos como temperatura e umidade e prevalência de hospedeiros que possibilitam a existência das populações de carrapatos e também as atividades humanas que possibilitam o parasitismo humano por carrapatos. Desde o início do século XX são estudados os mecanismos de virulência da FMMR e da FMB, e mesmo com novas ferramentas diagnósticas, ainda não foram desvendados a dinâmica dos focos desta riquetsiose, especialmente seu caráter esporádicos, com pequena taxa de infecção entre os vetores. Outras riquetsioses

podem ter um comportamento epidemiológico semelhante, tais como a manutenção transovariana e transestadial. Não há explicação para os longos períodos de aumentos ou decréscimos na incidência de FMMR (DUMBLER; WALKER, 2005; WALKER, 2002, 2004).

A recente detecção de *R. rickettsii* em ninfas e adultos da espécie de carrapato *R. sanguineus* no Estado do Arizona, E.U.A., aumenta a preocupação com o potencial deste vetor em transmitir a doença em locais não endêmicos para a FMMR, pela grande distribuição deste vetor neste país. Este fato é um alerta para outros países do continente americano, pois estes também possuem grandes populações deste vetor, com risco de aumento da distribuição da doença para os seres humanos e também para os cães seus hospedeiros primários, seguindo as populações deste vetor (DEMMA et al., 2005; ROZENTAL et al., 2002). Em pesquisa recente em área endêmica para a FMB encontrou-se *R. bellii* em carrapatos *A. dubitatum* coletados de capivaras (*H. hydrochaeris*) uma bactéria do grupo ancestral que não apresenta patogenicidade conhecida ao homem e não foi isolada a *R. rickettsii*, deixando a dúvida se está ocorrendo a predominância das bactérias não patogênicas nos carrapatos ou se esta bactéria está se mantendo no mamífero (HORTA et al., 2005).

Os carrapatos podem estar mantendo a circulação de riquetsias por serem vetores e reservatório. (ROUX, 1996; ROZENTAL, 2002; VENZAL et al., 2004). Segundo Venzal (2003b, p. 771): "O papel dos carrapatos como vetores de patógenos para humanos claramente merece maiores investigações, no Uruguai e outros locais". É importante saber o que se mantém na população de carrapatos. Segundo Paddock (2005, p. 318): "Não há informação disponível que descreva os hospedeiros vertebrados envolvidos como reservatórios ou amplificadores no ciclo natural de transmissão de *R. parkeri* ou que descreva o ciclo de vida da *R. parkeri* em carrapatos".

No presente trabalho, os carrapatos *A. triste* foram coletados em uma área de várzea, habitat natural de dois hospedeiros silvestres deste carrapato, o cervo-do-pantanal (*B. dichotomus*) e capivaras (*H. hydrochaeris*). Os hospedeiros naturais das formas imaturas do *A. triste* são desconhecidos no Brasil. A manutenção da população de *A. triste* na região, em outros hospedeiros que não o cervo-do-pantanal (*B. dichotomis*), deve ser investigada, a fim de conhecer melhor a ecologia de *R. parkeri* no Brasil.

A importância deste trabalho está em fazer uma pesquisa epidemiológica para uma nova enfermidade e demonstrar que a bactéria está circulante na amostra de carrapatos estudada e apresenta risco para a população humana nos arredores. Nossos achados auxiliam a desvendar a história natural desta riquetsiose tão pouco conhecida no Brasil e no mundo.

No Estado de Santa Catarina foi investigado um surto de febre maculosa cujos sintomas (febre, cefaléia, mialgia, prostração, linfadenopatia e exantema) foram brandos, sem qualquer caso letal registrado, no período de março de 2003 a maio de 2004. Foram confirmados 10 casos de febre maculosa através do teste de imunofluorescência indireta. Porém os sintomas foram brandos quando comparados aos casos existentes no país de febre maculosa e os pacientes não foram à óbito, mesmo sem tratamento, muito distinto do observado nos quase 100% de mortalidade em casos da febre maculosa brasileira causada por *R. rickettsii*, sem tratamentos com antibióticos. Não foi relatado o contato com carrapatos dos pacientes e nem feita uma investigação acarológica na região, ficando uma incógnita a respeito do possível vetor, assim como não foram investigados os animais domésticos quanto à sintomas semelhantes (MADEIRA; WEISBRICH, 2004). Como não foi relatado o isolamento do agente, tão pouco diagnóstico molecular, não foi possível determinar a espécie de *Rickettsia* envolvida, uma vez que o único diagnóstico efetuado foi sorológico com antígeno de *R. rickettsii*, que apresenta reações cruzadas com praticamente todas espécies de *Rickettsia* do grupo da febre maculosa, incluindo a espécie *R. parkeri*. No entanto, a sintomatologia branda e ausência de óbitos nesses casos, mesmo sem tratamento específico, sugere se tratar de uma riquetsiose semelhante à causada por *R. parkeri* nos E.U.A e Uruguai. Como o presente trabalho, confirmou-se a existência da *R. parkeri* circulante em carrapatos no Brasil, destacando-se possibilidades reais desta bactéria estar causando enfermidades não diagnosticadas em nosso país (PADDOCK et. al., 2004; VENZAL et. al., 2004).

A importância desta pesquisa reside em desvendar uma parte do ciclo desta bactéria no Brasil a partir do primeiro isolado desta no país. São necessárias mais pesquisas para elucidar aspectos obscuros do ciclo da *R. parkeri* no *A. triste*, como se há transmissão transestadial ou transovariana neste carrapato em comparação com os resultados obtidos experimentalmente por Goddard (2003) com o

desenvolvimento e a manutenção da infecção com *R. parkeri* por 2 ou mais gerações de *A. maculatum* e se há prejuízo ao carrapato neste processo. Faz-se necessária a definição do papel da bactéria *R. parkeri* como agente ou não em casos brandos não diagnosticados ou somente definidos como febre maculosa. Há a chance da doença ocorrer em outros locais e não estar sendo diagnosticada, acompanhando a ocorrência dos vetores (EVANS; MARTINS; GUGLIEMONE, 2000; FREIRE, 1967/1968; LABRUNA et al., 2002; LEMOS et al., 1997). Por fim, ressalta-se que o carrapato *A. triste* no local de pesquisa do presente trabalho (Paulicéia, SP) parece não ser agressivo aos seres humanos como relatado para esta espécie no Uruguai (Venzal et al., 2004).

7 CONCLUSÕES

- A bactéria *R. parkeri* é relatada pela primeira vez no Brasil.
- Na área amostrada em Paulicéia, estado de São Paulo, encontrou-se uma frequência de 9,7% de infecção por *R. parkeri* em carrapatos adultos da espécie *A. triste*, comprovado por análises moleculares e isolamento *in vitro* do agente em cultivo celular.

REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.

ARAGÃO, H. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrophes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 31, n. 4, p. 759-843, 1936.

_____.; FONSECA, F. Notas de ixodologia. VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 59, n. 2, p. 115-130, 1961.

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

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

CARDOSO, L. D. et al. Caracterização de *Rickettsia* spp. circulante em foco silencioso de febre maculosa brasileira no Município de Caratinga, Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 3, p.495-501, 2006.

CHOMEKZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **BioTechniques**, v. 153, n. 3, p. 532-537, 1993.

CONTI DÍAZ, I. A. Rickettsiosis por *Rickettsia conorii* (fiebre botonosa del Mediterráneo o fiebre de Marsella). Estado actual en Uruguay. **Revista Médica del Uruguay**, v. 17, n. 2, p. 199-124, 2001a.

_____. Enfermedades emergentes y reemergentes en Uruguay. **Revista Médica del Uruguay**, v. 17, n. 2, p. 180-199, 2001b.

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

_____.; RUBIO, I.; MOREIRA, E. S.; BÓRMIDA, G. P. Rickettsiosis cutáneo ganglionar por *Rickettsia conorii* en el Uruguay. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 32, n. 5, p. 313-318, 1990.

DEMMA, J. L. et al. Rocky Mountain Spotted Fever from an unexpected tick vetor in Arizona. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 6, p. 587-594, 2005.

DIAS, M. E.; MARTINS, A. V.; DOMINGOS, J. R. Tipho Exantemático no Oeste de Minas Gerais. **Brasil-Médico**, v. 51, n. 24, p. 651-655, 1937.

DUMLER, J. S.; WALKER, D. H. Rocky Mountain spotted fever – changing ecology and persisting virulence. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 6, p. 51-553, 2005.

DURDEN, L. A.; CUNNINGHAN, M. W.; MCBRIDE, R.; FERREE, B. Ectoparasites of free-ranging pumas and jaguars in the Paraguayan Chaco. **Veterinary Parasitology**, v.137, n. 1-2, p. 189-193, 2006.

EREMEEVA, M. E.; DASCH, G. A.; SILVERMAN, D. J. Evaluation of a PCR assay for quantitation of *Rickettsia rickettsii* and closely related spotted fever group Rickettsiae. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5466-5472, 2003.

ESPEJO-ARENAS, E.; RAOULT, D. First isolates of *Rickettsia conorii* in Spain using a centrifugation-shell vial assay. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 159, n. 6, p. 1158-1159, 1989.

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

EVANS, D. E.; MARTINS, J. R.; GUGLIELMONE, A. A. A review of the ticks (Acari: Ixodidae) of Brazil, their hosts and geographic distribution -1. The State of Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 4, p. 453-470, jul/ago. 2000.

FENG, HUI-MIN; WALKER, D. H. Cross-protection between distantly related spotted fever group rickettsiae. **Vaccine**, n. 21, p. 3901-3905, 2003.

FIGUEIREDO, L. T. M.; BADRA, S. J.; PEREIRA, L. E.; SZABÓ, M. P. J. Report on ticks collected in the southeast and mid-west regions of Brasil: analyzing the potential transmission of tick-borne pathogens to man. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 6, p. 613-619, nov./dez. 1999.

FOURNIER, P.-E.; ROUX, V.; RAOULT, D. Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae by study of the outer surface protein rOmpA. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 839-849, 1998.

FOURNIER, P.-E et al. Gene sequence-based criteria for identification of new *Rickettsia* isolates and description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp.nov. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5456-5465, 2003.

FREIRE, J. J. Fauna parasitária riograndense. **Revista da Faculdade de Agronomia e Veterinária (RS)**, v. 9, p. 111-149, 1967/1968.

GALVÃO, M. A. M. et al. Fatal spotted fever rickettsiosis, Minas Gerais, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 11, p. 1402-1405, 2003.

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

GODDARD, J. Experimental infection of Lone Star ticks, *Amblyomma americanum* (L.), with *Rickettsia parkeri* and exposure of guinea pigs to the agent. **Journal of Medical Entomology**, v. 40, n. 5, p. 686-689, Sep. 2003.

GODDARD, J.; NORMENT, B. R. Spotted fever group rickettsiae in the Lone Star tick *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 23, n. 5, p. 465-472, Sep. 1986.

GORDON, J. C. GORDON, S. W.; PETERSON, E.; PHILIP, R. N. Epidemiology of rocky Mountain Fever in Ohio, 1981: Serologic evaluation of canines and rickettsial isolation from ticks associated with human case exposure sites. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 33, n. 5, p. 1026-1031, 1984.

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

GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J.; HADANI A. *Amblyomma tigrinum* Koch, 1844 em la Argentina. Su diagnóstico errôneo como *Amblyomma maculatum* y su distribución geográfica. **Gaceta Veterinária**, v. 45, n. 367, p. 57-63, 1982.

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

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

HORTA, M. C. **Pesquisa de infecção por riquetsias do grupo da febre maculosa em humanos, equídeos, caninos e em diferentes estádios de vida de *Amblyomma cajennense*, provenientes de uma área endêmica do Estado de São Paulo**. 2002. 72 f. il. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

HORTA, M. C. et al. Rickettsia felis (Rickettsiales : Rickettsiaceae) in Ctenocephalides felis felis (Siphonaptera : Pulicidae) in the State of Sao Paulo, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 3, p.321-325, 2005

IBGE. **Banco de dados cidades**. Disponível em:
< <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/default.php>>. Acesso em: 09 maio 2006.

IVANCOVICH, J. C. Reclasificación de algunas especies de garrapatas del género “*Amblyomma*” (Ixodidae) en la Argentina. **Revista de Investigaciones Agropecuarias**, v. 15, n. 4, p. 673-682, 1980.

KELLY, P. J.; RAOULT, D.; MASON, P. R. Isolation of spotted fever group rickettsias from triturated ticks using a modification of the centrifugation-shell vial technique. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 3, p. 397-398, 1991.

KNIGHT, J. C. Observations on potential ticks vectors of human disease in the Cerrado region of Central Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 25, n. 2, p. 145-146, 1992

KOCH, C. L. Systematische Uebersicht uber die Ordnung der Zecken **Archiv fur naturgeschichte**, v. 1, p. 217-239, 1844.

KOHL, G. M. Concerning the identity of *Amblyomma maculatum*, *A. trigrinum*, *A. triste*, and *A. ovatum* of Koch, 1844 (ACARINA: IXODIDAE). **Proc. Ent. Soc. Wash.**, v. 58, n. 3, p. 143-147, 1956.

LABRUNA, M. B. et al. Ticks (Acari: Ixodidae) on wild animals from the Porto-Primavera hydroelectric power station. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 8, p. 1133-1136, 2002.

LABRUNA, M. B. et al. Life cycle and host specificity of *Amblyomma triste* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Experimental and Applied Acarology**, v. 30, n. 4, p. 305-316, 2003.

LABRUNA, M. B. et al. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the State of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n.1, p. 90-98, 2004a.

LABRUNA, M. B. et al. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the State of Rondônia, Western Amazon, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 6, p.1073-1081, 2004b.

LABRUNA, M. B. et al. Molecular evidence for a spotted fever group *Rickettsia* species in the tick *Amblyomma longirostre* in Brasil. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 3, p. 533-537, 2004c.

LACKMAN, D. B.; PARKER, R. R.; GERLOFF, R. K. Serological characteristics of a pathogenic *Rickettsia* occurring in *Amblyomma maculatum*. **Public Health Reports**, v. 64, n. 43, p. 1342-1349, Oct. 1949.

_____.; BELL, E. J.; STONNER, H. G.; PICKENS, E. G. The Rocky Mountain spotted fever group of *Rickettsias*. **Health Laboratory Science**, v. 2, n. 3, p. 138-141, July 1965.

LEMOS, E. R. S. et al. Primary isolation of spotted fever rickettsiae from *Amblyomma cooperi* collected from *Hydrochaeris hydrochaeris* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 273-275 1996.

_____. et al. *Rickettsiae*-infected ticks in an endemic area of spotted fever in the State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 4, p. 477-481, 1997a.

_____; et al. Epidemiological aspects of the Brazilian spotted fever: seasonal activity of ticks collected in an endemic area in São Paulo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 3, p. 181-185, 1997b.

_____. et al. Spotted fever in Brazil: a seroepidemiological study and description of clinical cases in an endemic area in the state of São Paulo. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 4, p.329-334, 2001.

LIMA, V. L. C. et al. Situação da febre maculosa na Região Administrativa de Campinas, São Paulo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p. 331-334, 2003.

MACHADO, R. Z. et al. Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). **Veterinary Parasitology**, v. 139, n. 1-3, p. 262-266, 2006

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

MARRERO, M.; RAOULT, D. Centrifugation-shell vial technique for rapid detection of Mediterranean spotted fever *Rickettsia* in blood culture. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 40, n. 2, p. 197-199, 1989.

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

MOREIRA, J. A.; MAGALHÃES, O. Tífo Exantemático em Minas Gerais. **Brasil-Médico**, v. 49, n. 21, p. 465-470, 1935.

_____. Tífo Exantemático de Minas Gerais (8ª comunicação). **Brasil-Médico**, v. 51, n. 21, p. 583-584, 1937.

OLIVEIRA, R. P. et al. 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. et al. *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides* spp. fleas, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 3, p. 317-319, 2002.

PADDOCK, C. D. SUMNER, J. W.; COMER, J. A.; ZAKI, S. R.; GOLCSMITH, C. S.; GODDARD, J.; MCLELLAN, S. L. F.; TAMMINGA, C. A.; OHL, C.A. *Rickettsia parkeri*: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 6, p. 805-811,. 2004.

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

PARKER, R. R.; KOHLS, G. M.; COX, G. W.; DAVIS, G. E. Observations on an infectious agent from *Amblyomma maculatum*. **Public Health Reports**, v. 54, n. 32, p. 1482-1484, 1939.

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, July 1990.

PHILIP, C. B.; WHITE, J. S. Disease agents recovered indental to a tick survey of the Mississippi Gulf Coast. **Journal of Economic Entomology**, v. 48, n. 4, p. 396-400, Aug. 1955.

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

RAOULT, D. A new rickettsial disease in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p. 812-813, 2004.

RAOULT, D.; ROUX, V. Rickettsiosis as paradigms of new or emerging infectious deseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 4, p. 694-719, Oct. 1997.

REGNERY, R. L.; SPRUILL, C. L.; PLIKAYTIS, B. D. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. **Journal of Bacteriology**, v.173, n. 5, p. 1576-1589, Mar. 1991.

RIPOLL, C. M. et al. Evidence of Rickettsial Spotted Fever and Ehrlichial Infectious in a Subtropical Territory of Jujuy, Argentina. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 2, p. 350-354, 1999.

ROLAIN, J. JENSENIUS, M. RAOULT, D. Rickettsial Infectious – a threat to travellers. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 17, p. 433-437, 2004.

ROUX, V.; FOUNIER, P. E.; RAOULT, D. Differentiation of spotted fever group Rickettsiae by sequencing and analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA of the gene encoding the protein rOmpA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 8, p. 2058-2065, Sept. 1996.

ROUX, V.; RYDKYNA, 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, Apr. 1997.

ROUX, V.; RAOULT, D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (*ompB*). **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 1449-1455, 2000.

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

SAMPAIO, I.; CARBELLO, M.; PARIETTI, S. Comprobación de la presencia de *Amblyomma triste* (Acari: Ixodidae) en Uruguay. **Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay**, v. 7, p. 75-76, 1992.

SANGIONI, L. A. **Pesquisa de infecção por rickettsias do grupo da febre maculosa em humanos, cães, equinos e em adultos de *Amblyomma cajennense*, em região endêmica e não endêmica do Estado de São Paulo.** 2003, 86 f. il. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

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

SEXTON, D. J. et. al. Brazilian Spotted Fever in Espirito Santo, Brazil: description of a focus o infection in a new endemic region. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 2, p. 222-226, 1993

SINKOCK, A. L. et al. Ocorrência de Ixodidae parasitos de capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris* Linnaeus 1766) na estação ecológica do Taim, Rio Grande - RS, Brasil **Ciência Rural**, v. 27, n. 1, p. 119-122, 1997.

SZABÓ, M. P. J. et al. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, n. 25, p. 909-916, 2001.

SZABÓ, M. P.; LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C.; DUARTE, J. M. B. Ticks (Acari: Ixodidae) on wild Marsh-Deer (*Blastocerus dichotomus*) from Southeast Brazil: infestations before and after habitat loss. **Journal of Medical Entomology**, v. 40, n. 3, p. 268-264, May 2003.

TRAVASSOS, J.; VALLEJO, A. Comportamento de Alguns Cavídeos (*Cavia aperea* e *Hydrochoerus capybara*) às Inoculações Experimentais do vírus da Febre Maculosa. Possibilidade desses cavídeos representarem o papel de depositários transitórios do vírus na natureza. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 15, p. 73-86, jan. 1942a.

_____. Possibilidade de *Amblyomma cajenense* se infectar em *Hydrochoerus capybara* Experimentalmente Inoculado com o vírus da Febre Maculosa. **Memórias do Instituto Butantan**, Tomo XV, p. 87-90, jan. 1942b.

VENZAL, J. M. CASTRO, O.; CABRERA, P. A.; SOUZA, C. G.; GUGLIELMONE, A. A. Garrapatas de importancia médica y veterinaria em Uruguay. **Entomologia y Vectores**, v. 10, n. 4, p. 635-650, 2003a.

_____.; GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PEÑA, A.; CABRERA, P. A.; CASTRO, O. Ticks (Ixodida: Ixodidae) parasiting humans in Uruguay. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 97, n. 7, p. 769-772, 2003b.

VENZAL, J. M. et al. Las garrapatas de Uruguay: especies, hospedadores, distribución e importancia sanitária. **Veterinaria (Montevideo)**, v. 38, n. 150-151, p. 17-28, 2003c.

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

WALKER, D. H. (Ed.). *Rickettsia rickettsii*: as virulente as ever. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 5, p. 448-449, 2002.

_____. Clinical, epidemiologic and control perspectives of Rickettsioses and Ehrlichioses in the Americas. In: CONGRESSO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA , 13.; SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 1., 2004, Ouro Preto. **Anais...** p. 1-3.

WATT, G.; PAROLA, P.; Scrub typhus and tropical rickettsioses. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 16, p. 429-436, 2003.

ZAVALA-VELÁZQUEZ, J. E. ; SÁNCHEZ-ELIAS, R. A.; BECERRA-CARMONA, G.; WALKER, D. H. *Rickettsia felis* rickettsioses in Yucatán. **The Lancet**, v. 356, n. 9235, p. 1079-1080, Sep. 2000.