MAURÍCIO CLAUDIO HORTA

PESQUISA DE INFECÇÃO POR RIQUETSIAS DO GRUPO DA FEBRE
MACULOSA EM HUMANOS, EQÜÍDEOS, CANINOS E EM DIFERENTES
ESTÁDIOS DE VIDA DE *Amblyomma cajennense*, PROVENIENTES DE
UMA ÁREA ENDÊMICA DO ESTADO DE SÃO PAULO

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestre, 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:

Teresinha Tizu Sato Schumaker

São Paulo

2002

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

Horta, Maurício Claudio

Pesquisa de infecção por riquetsias do grupo da febre maculosa em humanos, eqüídeos, caninos e em diferentes estádios de vida de *Amblyomma cajennense*, provenientes de uma área endêmica do Estado de São Paulo / Maurício Claudio Horta.

72 f. : il.

Dissertação (mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal. São Paulo, 2002.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dra. Teresinha Tizu Sato Schumaker.

Unitermos: 1.Febre maculosa. 2.*Amblyomma cajennense*.
3.*Rickettsia*. 4.Carrapato.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

Aos meus pais,

Ivone Claudio Horta;

Rubens Horta (in memoriam).

À toda minha família; em especial aos meus irmãos,

Silvia Cristina Horta de Almeida,

Sandra Regina Horta Cardoso,

Sérgio Luis Horta,

Ana Paula Claudio Horta.

À Priscilla Bagnatori Rangel.

Sem eles, nada seria possível...

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Teresinha Tizu Sato Schumaker, pela orientação, amizade, paciência e confiança em mim depositada;

Ao Prof. Dr. Marcelo Labruna, pela co-orientação e amizade;

À Prof. Dr. Solange Maria Gennari, pelo auxílio e compreensão;

Ao Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, pelo auxílio, atenção e utilização do LABMAS para realização de parte deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, pela contribuição técnica;

Aos Profs. Drs. Márcio Galvão e Cláudio Mafra, pelo auxílio e hospitalidade em Ouro Preto/MG;

Ao “*Grupo da Febre*”, composto pelos pós-graduandos Manoella Vianna, Luis Sangioni e Adriano Pinter, pelo companheirismo e auxílio;

Aos pós-graduandos do LABMAS, Adriana, Marcos e Sidney, pelo companheirismo e auxílio técnico;

Aos amigos e colegas do curso de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses, pelo estímulo e amizade, indispensáveis à realização deste trabalho;

À Laura Freitas, pela amizade e auxílio na colheita de sangue;

Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira e ao pós-graduando Ricardo Augusto Dias, pela contribuição na análise estatística do trabalho;

A todos os docentes e funcionários do VPS, que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho;

À bolsista Patrícia Mendes, pelo auxílio na maceração do material;

Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo - FMVZ-USP;

À Fundação de Amparo e pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro ao trabalho. Processo no. 00/02711-1; e por ter concedido financiamento de bolsa e reserva técnica. Processo no. 00/02710-5.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

- Figura 1 – Mapa do estado de São Paulo, indicando a posição do município de Pedreira em relação à capital, São Paulo.....p. 25
- Figura 2 – Mapa do município de Pedreira, estado de São Paulo, indicando as posições das fazendas estudadas.....p. 26
- Figura 3 – Fazenda Quitandinha. a) sede; b) Rio Jaguari; c) mata ciliar; d) pasto; e) estrada. São Paulo - 2002.....p. 27
- Figura 4 – Placa fixada às margens do Rio Jaguari, no município de Pedreira/SP, alertando sobre a presença de vetores da febre maculosa. São Paulo - 2002.....p. 28
- Figura 5 – Teste de hemolinfa em *Amblyomma cajennense*. a) organismos semelhantes à *Rickettsia*, corados por fucsina; b) hemócitos; 1000x.....p. 44
- Figura 6 – Teste de hemolinfa em *Amblyomma cooperi*. a) organismos semelhantes a *Rickettsia*, corados por fucsina; b) hemócitos; 1000x.....p. 45
- Figura 7 – Soro canino positivo, anti-*Rickettsia rickettsii*, através da Reação de Imunofluorescência Indireta, na diluição de 1/64. 400x..... p. 51

QUADROS

Quadro 1 – Oligonucleotídeos (“primers”) utilizados para identificação genotípica de espécies e amostras de riquetsias do Grupo da Febre Maculosa. São Paulo – 2002.....p.34

Quadro 2 – Concentração de reagentes empregados na reação em cadeia pela polimerase (PCR), segundo o gene pesquisado. São Paulo – 2002.....p. 35

Quadro 3 – Condições de amplificação das diferentes reações, conforme o gene pesquisado. São Paulo – 2002.....p. 36

TABELAS

Tabela 1 - Quantidade de carrapatos *Amblyomma cajennense* colhidos em propriedades do município de Pedreira/SP. São Paulo – 2002.....p.42

Tabela 2 - Teste de hemolinfa em adultos de *Amblyomma cajennense*, segundo a propriedade, de origem, do município de Pedreira/SP. São Paulo – 2002.....p.44

Tabela 3 - Teste de hemolinfa em adultos de *Amblyomma cooperi*, segundo a propriedade de origem, do município de Pedreira/SP. São Paulo – 2002.....p.45

Tabela 4 - Reação em Cadeia pela Polimerase para pesquisa de riquetsias em carrapatos <i>Amblyomma cajennense</i> colhidos em propriedades do município de Pedreira/SP. São Paulo – 2002.....	p.46
Tabela 5 - Grau de identidade calculado para cada par de seqüências de nucleotídeos, entre as amostras de adultos estudadas e as seqüências obtidas no GenBank. São Paulo – 2002.....	p.48
Tabela 6 - Grau de identidade calculado para cada par de seqüências de nucleotídeos, entre as amostras de larvas estudadas e as seqüências obtidas no GenBank. São Paulo – 2002.....	p.49
Tabela 7 - Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para pesquisa de riquetsias do grupo da febre maculosa em soros de humanos e de animais. Pedreira/SP. São Paulo – 2002.....	p.50
Tabela 8 - Diluição final do soro canino através da RIFI, segundo a propriedade estudada, Pedreira/SP. São Paulo – 2002.....	p.51
Tabela 9 – Diluição final do soro eqüino através da RIFI, segundo a propriedade estudada, Pedreira/SP. São Paulo – 2002.....	p.52

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

PCR	=	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em Cadeia pela Polimerase
DNA	=	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> - Ácido Desoxirribonucléico
rRNA	=	<i>Ribonucleic Acid</i> - Ácido Ribonucléico Ribossômico
Taq	=	<i>Thermus aquaticus</i>
dNTP	=	nucleotídeos trifosfatados
OmpA	=	<i>Outer membrane protein A</i> - proteína externa de membrana A
OmpB	=	<i>Outer membrane protein B</i> - proteína externa de membrana B
RIFI	=	Reação de Imunofluorescência Indireta
RIFD	=	Reação de Imunofluorescência Direta
ELISA	=	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
M	=	molar
mM	=	mili molar
U	=	unidades
g	=	grama
µg	=	micrograma
mL	=	mililitro
µL	=	microlitro
µm	=	micrometro
x g	=	múltiplos da gravidade terrestre (9,81 m/s ²)
kDa	=	kilodalton
pH	=	potencial hidrogeniônico
ITS2	=	segundo espaçador interno transcrito do DNA ribossômico de artrópodes

min	=	minutos
seg	=	segundos
EDTA	=	ácido etileno-diamino-tetracético
TBE	=	tris-borato-EDTA
TE	=	tampão TRIS HCl-EDTA
TRIS	=	tris(hidroximetil)amino metano
PBS	=	<i>Phosphate Buffered Saline solution</i> – Solução fosfato tamponada
SDS	=	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
GPS	=	<i>Global Position System</i>
B.O.D.=		<i>Biological Oxygen Demand</i>
%	=	por cento
°C	=	graus Celsius
x	=	vezes
CO ₂	=	dióxido de carbono
F1	=	primeira geração
q.s.p.	=	quantidade suficiente para
pb	=	pares de bases
=	=	igual
>	=	maior
≥	=	maior ou igual
®	=	marca registrada
<i>et al.</i>	=	e colaboradores
<i>apud</i>	=	citado por

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

RESUMO

HORTA, M. C. Pesquisa de infecção por riquetsias do grupo da Febre Maculosa em humanos, eqüídeos, caninos e em diferentes estádios de vida de *Amblyomma cajennense*, provenientes de uma área endêmica do Estado de São Paulo. [Survey of rickettsiae from the Spotted Fever Group causing infections in humans, equines, canines and in different developmental stages of *Amblyomma cajennense*, from an endemic area of the State of São Paulo, Brazil]. 2002. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

A febre maculosa é uma zoonose emergente causada por bactérias do gênero *Rickettsia* do Grupo da Febre Maculosa (GFM). Este estudo foi delineado para comprovar indiretamente a infecção por riquetsias em humanos e animais e, diretamente em carrapatos *Amblyomma cajennense*. As amostras foram colhidas no município de Pedreira, região endêmica do estado de São Paulo. A reação de imunofluorescência indireta foi positiva em 31,2% e 77,3% dos soros de cães e eqüinos, respectivamente. Nenhum humano se apresentou positivo para esse teste. Para confirmar a infecção natural dos carrapatos adultos, utilizou-se o teste de hemolinfa, que se revelou insatisfatório. Larvas, ninfas e adultos de *A. cajennense* foram submetidos à técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR). As reações resultaram na amplificação de um fragmento (230pb) do gene codificador da proteína 17 kDa, somente em adultos (4,7%) e em larvas (1,1%). Não foi possível a amplificação de nenhum fragmento de outros genes testados (citato sintase, *OmpA* e *OmpB*). Os produtos amplificados pela PCR de dois carrapatos adultos e de quatro larvas foram seqüenciados, apresentando 100% de similaridade com *Rickettsia felis*; e de 99,4% a 100% de similaridade com *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia parkeri* e *Rickettsia peacockii*, respectivamente. A detecção de positividade em larvas não alimentadas confirma a ocorrência da transmissão transovariana de riquetsias na espécie *A. cajennense*. A alta identidade observadas entre as riquetsias estudadas e as espécies acima mencionadas sugere a existência dessas bactérias na região. Contudo, maiores estudos deverão ser realizados, uma vez que as sequências de bases do fragmento de DNA estudado não permite a distinção entre as diferentes riquetsias do GFM.

Unitermos: *Rickettsia*, Febre Maculosa, carrapato, *Amblyomma cajennense*

SUMMARY

HORTA, M. C. Survey of rickettsiae from the Spotted Fever Group causing infections in humans, equines, canines and in different developmental stages of *Amblyomma cajennense*, from an endemic area of the State of São Paulo, Brazil. [Pesquisa de infecção por riquetsias do grupo da Febre Maculosa em humanos, eqüídeos, caninos e em diferentes estádios de vida de *Amblyomma cajennense*, provenientes de uma área endêmica do estado de São Paulo. 2002. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

Spotted fever is an emergent zoonosis caused by *Rickettsia* from the Spotted Fever Group. This study was designed to indirectly detect the human and animals infection by rickettsiae, and to directly detect the *Amblyomma cajennense* tick infection. The samples were collected at the Pedreira County, an endemic region of the State of São Paulo. The indirect immunofluorescence assay was positive for 31.2 % of canine and for 77.3% of equine examined sera. No human serum was positive by the use of this serological tests. In order to confirm the adult tick natural infection, it was used the hemolymph test, which showed to be unsatisfactory. The larvae, nymph and adult tick rickettsiae detection was performed by the use of the polymerase chain reaction (PCR). The PCR resulted on the amplification of a 230 bp fragment of the gene encoding the 17 kDa protein, in adults (4.7%) and larvae (1.1%) only. It was not possible to amplify any other tested gene fragment (citrate synthase, OmpA and OmpB). The PCR amplified products from two adult ticks and from four larvae were sequenced, and presented 100% of similarity with *Rickettsia felis* and from 99,4% to 100% of similarity to *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia parkeri* and *Rickettsia peacockii*, respectively. The rickettsia detection in non-fed larvae confirms the occurrence of the rickettsiae transovarian transmission in *A. cajennense* specie. The high identity observed among the present studied rickettsiae and the above cited rickettsia species suggests the presence of these bacteria in Pedreira County. However, once the sequences of bases of the studied amplified DNA fragment did not allow the differentiation among the SFG rickettsiae, further studies are necessary.

Uniterms: *Rickettsia*, Spotted Fever, Tick, *Amblyomma cajennense*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	OBJETIVOS.....	24
3	MATERIAIS E MÉTODO.....	25
	3.1 Área de Estudo.....	25
	3.2 Pesquisa da Presença de Riquetsias em Carrapatos.....	29
	3.2.1 Cálculo da Amostragem.....	29
	3.2.2 Colheita de Carrapatos.....	29
	3.2.3 Transporte e Identificação dos Carrapatos.....	30
	3.2.4 Teste de Hemolinfa.....	31
	3.2.5 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).....	32
	3.2.5.a. Extração de DNA.....	32
	3.2.5.b. PCR.....	33
	3.2.5.d. Obtenção de Controles Positivos.....	37
	3.2.5.e. Sequenciamento de DNA.....	39
	3.3 Pesquisa de Riquetsias em Humanos e Animais.....	40
	3.3.1 Colheita de Sangue.....	40
	3.3.2 Reação de Imunofluorescência Indireta.....	41

4	RESULTADOS.....	42
	4.1 Colheita e Identificação dos Carrapatos.....	42
	4.2 Teste de Hemolinfa.....	44
	4.3 PCR.....	46
	4.3.1 <i>Amblyomma cajennense</i>	46
	4.3.2 <i>Amblyomma cooperi</i>	47
	4.4 Sequenciamento de DNA.....	47
	4.4.1 Adultos.....	47
	4.4.2 Larvas.....	48
	4.5 Colheita de sangue.....	49
	4.6 Reação de Imunofluorescência Indireta.....	50
5	DISCUSSÃO.....	53
6	CONCLUSÕES.....	64
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

Doenças causadas por riquetsias estão amplamente distribuídas pelo mundo em focos endêmicos. Os humanos adquirem infecções por riquetsias através da picada de carrapatos, pulgas, piolhos e ácaros infectados (SEKEYOVÁ *et al.*, 2000). O termo “*Rickettsia*” foi dado em homenagem ao Dr. Howard Taylor Ricketts, que isolou o agente etiológico da Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (FMMR), e estabeleceu o papel do carrapato na transmissão da doença (RICKETTS, 1909).

O gênero *Rickettsia* é composto pelo Grupo do Tifo (GT) e pelo Grupo da Febre Maculosa (GFM). Classicamente, baseado na presença de um lipopolissacarídeo, o GT inclui dois patógenos humanos, *Rickettsia prowazekii* e *Rickettsia typhi*, causadores do tifo epidêmico e tifo endêmico, respectivamente; além da *Rickettsia canadensis*, bactéria de patogenicidade desconhecida e isolada apenas de carrapatos (EREMEEVA e DASCH, 2000).

O GFM contém mais de 20 espécies que causam pelo menos nove diferentes doenças no homem. As riquetsias patogênicas reconhecidas são: *Rickettsia rickettsii* (Febre Maculosa das Montanhas Rochosas), *Rickettsia conorii* (Febre Maculosa Mediterrânea ou Febre Botonosa), *Rickettsia africae* (Febre da Picada do Carrapato), *Rickettsia australis* (Tifo do Carrapato de Queensland), *Rickettsia honei* (Tifo da Ilha Flinders), *Rickettsia sibirica* (Tifo do Carrapato do Norte da Ásia ou Tifo Siberiano), *Rickettsia japonica* (Febre Maculosa Oriental), *Rickettsia akari* (Riquetsiose Variceliforme ou

Riquetsiose Vesicular), sendo esta última a única transmitida por ácaros. Todas as demais são transmitidas por carrapatos (RAOULT e ROUX, 1997; BEATI e RAOULT, 1998). *Rickettsia felis* é uma riquetsia patogênica ao homem, que pode ser considerada como pertencente ao GT baseado nas características sorológicas e associação com pulgas; entretanto análises filogenéticas a classificam no GFM (EREMEEVA e DASCH, 2000). São consideradas riquetsias não patogênicas e/ou de patogenicidade desconhecida: *Rickettsia amblyommii*, *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia montanensis*, *Rickettsia rhipicephali*, *Rickettsia peacockii*, *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia slovaca*, *Rickettsia massiliae*, *Rickettsia mongolotimonae*, *Rickettsia aeschlimanii*, *Rickettsia helongjiangi*, *Rickettsia sharonii*, além de outras cepas ainda não nomeadas (ROUX *et al.*, 1997; BEATI e RAOULT, 1998). As bactérias do GFM são gram negativas, pequenas (0,3 a 1 μm), intracelulares obrigatórias e residem em glândulas salivares e ovários do artrópode hospedeiro (BILLINGS *et al.*, 1998).

A espécie *Rickettsia bellii* não se enquadra nesse esquema de classificação. Dados moleculares obtidos a partir de dois genes, 16S rRNA e 23S rRNA, indicam que essa bactéria não pertence a nenhum dos dois grupos citados, sugerindo ser um organismo de características ancestrais a eles (STOTHARD, 1994).

No Brasil, a doença é causada por riquetsias transmitidas por carrapatos, e é denominada de Febre Maculosa Brasileira (FMB) (DIAS e MARTINS, 1939) tendo sua ocorrência reconhecida na região sudeste do país (GALVÃO e RIBEIRO, 1993), com destaque para os estados de Minas

Gerais (GALVÃO, 1996) e São Paulo (MONTEIRO, 1932; LIMA *et al.*, 1995). A doença apresenta uma definida prevalência sazonal, apresentando um número de casos mais abundantes de setembro a novembro, abrangendo a primavera e início de verão (DIAS e MARTINS, 1939; LEMOS *et al.*, 1997).

Estudos realizados na década de 30, compararam a patogenicidade experimental do agente da FMB com a *R. rickettsii*, agente da FMMR, e detectaram diferenças em relação aos sintomas das doenças (MONTEIRO, 1933b). No entanto, a identidade imunológica dos agentes foi bem estabelecida, considerando: a) proteção cruzada dos soros de animais imunes à FM em relação à FMMR (PARKER e DAVIS, 1933 *apud* MONTEIRO, 1933a); b) resistência cruzada dos animais imunes ao agente da FMB frente ao da FMMR (DYER, 1933 *apud* MONTEIRO, 1933a); c) vacinas produzidas a partir de vetores infectados pelos agentes das respectivas doenças protegerem animais contra as duas infecções (MONTEIRO, 1933a). Em 1992, isolamento de *Rickettsia* sp foi realizado em amostra de biópsia de pele e submetida à prova de imunofluorescência indireta, obtendo resultados positivos com títulos altos para *R. rickettsii*, sugerindo a presença desta bactéria no estado de São Paulo (MELLES *et al.*, 1992). Embora essa identidade imunológica indique a existência de *R. rickettsii* no Brasil, a bactéria causadora da FMB ainda não foi adequadamente caracterizada por metodologias como a tipificação sorológica por microimunofluorescência (PHILIP *et al.*, 1978) ou biologia molecular, através de sequenciamento de nucleotídeos do DNA genômico (NILSSON, *et al.*, 1997; BILLINGS *et al.*, 1998; SEKEYOVÁ *et al.*, 2000). No

Brasil, as riquetsias identificadas através de sequenciamento genético são: *R. bellii*, em carrapato *Amblyomma cooperi* (LABRUNA *et al.*, 2001), e *R. felis*, em pulgas (OLIVEIRA, 2002).

Em Minas Gerais, há mais de um século, a doença já era citada por profissionais do norte do estado, sendo conhecida como “pintada”, “febre que pinta”, ou “febre chitada”. No início da década de 50, MAGALHÃES (1952) estabelece a história clínica e comportamental da doença, baseado em estudos realizados entre 1929 a 1944. Desde então, somente na década de 80, outros casos foram diagnosticados, tendo sido registrado um número de 100, no período de 1981 a 1990 (GALVÃO e RIBEIRO, 1993). Atualmente, as regiões com maior número de casos estão localizadas na região nordeste do estado (GALVÃO, 1996).

No estado de São Paulo, a doença foi reconhecida pela primeira vez no em 1928, e era denominada “Tifo Exantemático de São Paulo” (PIZA *et al.*, 1932 *apud* DIAS e MARTINS, 1939). No período de 1929 a 1933, 88 casos foram relatados no estado, sendo que 76 ocorreram na capital e 12 pelo interior (DIAS e MARTINS, 1939). Os dados disponíveis sobre registro sistemático são escassos. Constam-se na literatura, a ocorrência de 53 casos no período de 1957 a 1974, e de outros 10 casos no período de 1976 a 1982. A maioria desses indivíduos residia na área rural de municípios vizinhos a capital de São Paulo. Em 1985 surgiram as primeiras suspeitas diagnósticas da doença no município de Pedreira, situada na região de Campinas/SP. Apesar da deficiência no sistema de registro de casos, estudos recentes demonstram a manutenção da doença na região (LIMA *et*

al., 1995). No período de 1985 a 2000, houve 47 casos confirmados de febre maculosa, sendo que desse total, 19 foram diagnosticados na cidade de Pedreira, e 25 em cidades vizinhas (Jaguariúna, Amparo e Campinas) (LIMA *et al.*, 2001).

A relação da bactéria com o vetor apresenta características fundamentais para sua manutenção na natureza, como ocorrência de transmissão transovariana, possibilidade de transmissão transestadial e existência de carrapatos naturalmente infectados. Além disso, podemos citar a necessidade de reservatórios vertebrados da bactéria na natureza (RICKETTS, 1909; TRAVASSOS e VALLEJO, 1942; BURGDORFER *et al.*, 1962). No Brasil, a capivara (*Hydrochoerus capybara*) é incriminada como um reservatório de *Rickettsia* na natureza, uma vez que foi demonstrada, através de infecção experimental, sua capacidade de manter o agente circulante em seu organismo, sem apresentar sintomas clínicos da doença (TRAVASSOS e VALLEJO, 1942). Uma riquetsia do GFM foi isolada de *A. cooperi*, retirado de uma capivara, sugerindo a existência da bactéria no vertebrado (LEMOS *et al.*, 1996). Isolamentos do agente foram feitos também em gambá (*Didelphis marsupialis*), nos estados de Minas Gerais e São Paulo. Alguns cães (*Canis familiaris*), provenientes de áreas endêmicas do estado de São Paulo apresentaram testes positivos para a doença, verificados através de reações de *Weil-Felix* (DIAS e MARTINS, 1939).

O principal vetor da doença no Brasil é o carrapato *Amblyomma cajennense* (DIAS e MARTINS, 1939). A transmissão transovariana da riquetsia por fêmeas desta espécie foi descrita por MONTEIRO e FONSECA

(1932). O *A. cajennense* possui baixa especificidade parasitária, principalmente nos estádios de larva e ninfa, e é o principal carrapato que parasita humanos no Brasil. A constatação de numerosas populações deste carrapato nas áreas endêmicas para febre maculosa é um achado comum. Na natureza carrapatos infectados dessa espécie foram encontrados em uma fazenda onde ocorreram dois casos fatais da doença e, também, em situação de parasitismo sobre cães e sobre um humano com a doença (DIAS e MARTINS, 1939). Entretanto, a contribuição dos diferentes estádios de desenvolvimento do carrapato na epidemiologia da doença no Brasil não está esclarecida. Outras espécies deste gênero de carrapato, tais como *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma brasiliense* e *Amblyomma cooperi* já foram incriminadas como potenciais vetores de febre maculosa para humanos, uma vez que espécimes naturalmente infectados por riquetsia do grupo da febre maculosa foram isolados destes carrapatos (DIAS e MARTINS, 1939; LEMOS *et al.*, 1996a). Em nenhuma das situações, não houve comprovação da espécie de riquetsia em questão ou de sua patogenicidade.

Aspectos comuns das riquetsioses do GFM incluem febre, dor de cabeça, erupções máculo-papular cutânea incluindo uma distribuição nas palmas e solas, além de escaras no local da picada do carrapato. Dependendo da etiologia dentre as cepas de riquetsias, alguns desses sinais podem estar ausentes. Por essa razão o diagnóstico pode ser demorado e incorreto, resultando em um tratamento inadequado (BEATI e RAOULT, 1998).

Os principais alvos dos organismos do GFM são as células endoteliais e células da musculatura lisa de vasos periféricos. Após penetração através da picada do carrapato, a parede vascular é invadida seguindo uma distribuição hematógena e linfática do organismo. A entrada da riquetsia em células endoteliais parece ser diretamente mediada por receptores. Lesões se desenvolvem no endotélio de pequenos vasos sanguíneos, conduzindo a um aumento de permeabilidade capilar que é freqüentemente manifestada por edema periférico, além de hipotensão e hipovolemia. Em formas severas da doença, falência renal e edema pulmonar não-cardiogênico são observados. Sinais digestivos e neurológicos podem também estar presente (WALKER *et al.*, 1987). A letalidade varia de 5 a 80% em diferentes focos, e é determinada em parte pela idade do paciente, virulência da cepa existente no local, e tratamento adequado através de antibioticoterapia (PRICE, 1954).

Embora dados seguros sobre a incidência ou prevalência da FM sejam fragmentados, especialmente em países em desenvolvimento, a distribuição geográfica de riquetsias do GFM é muito ampla. Devido ao fato dos sinais clínicos serem usualmente não específicos, as doenças são geralmente sub notificadas. Em países onde as riquetsioses são bem conhecidas, médicos geralmente tratam seus pacientes, entretanto, sem comunicação aos órgãos oficiais de saúde. Os dados geralmente são colhidos em um foco endêmico ou em uma pequena parte de uma área endêmica, tornando difícil a elaboração de um quadro preciso sobre a prevalência e distribuição da doença (BEATI e RAOULT, 1998).

Recomendações para prevenção da doença incluem o não acesso a áreas infestadas por carrapatos. Ao entrar em contato com o artrópode, uma rápida remoção previne a infecção, pois é necessária uma fixação de 5 a 20 horas para que ocorra a transmissão. Medidas de controle de populações de carrapatos no ambiente devem ser instituídas (COMER, 1991).

O diagnóstico indireto do agente é baseado em reações sorológicas (COMER, 1991). Incluem-se entre os testes utilizados: Weil-Felix, baseado em aglutinação de soro de antígenos de *Proteus* com anticorpos anti-rickettsiais; testes de proteção por vacinas em cobaias; fixação de complemento; testes de neutralização de toxinas riquetsias em ratos com anti-soros preparados em cobaias; aglutinação em látex; e principalmente a reação de imunofluorescência indireta, usada como diagnóstico padrão na maioria dos laboratórios. Contudo, esses testes não são capazes de distinguir a espécie de rickettsia dentre os isolados, devido à existência de reações cruzadas entre os membros de um mesmo grupo. (PHILLIP, 1978; MCDADE e NEWHOUSE, 1986; COMER, 1991). Devido à heterogeneidade das cepas e ao acúmulo dos isolados geneticamente não-classificados, um método denominado tipificação sorológica pela microimunofluorescência (TSM) foi desenvolvido para classificação das riquetsias (PHILLIP, 1978). Outro método de detecção indireta é a realização do teste de ELISA com anticorpos policlonais ou monoclonais (DOBSON *et al.*, 1989). Entretanto, esses anticorpos espécie-específicos são disponíveis apenas para um número limitado de riquetsias (REGNERY *et al.*, 1991). O *Western Blotting* é uma técnica mais específica, constituindo uma poderosa ferramenta

diagnóstica para estudos soro-epidemiológicos e confirmação dos resultados obtidos por testes sorológicos convencionais, (SCOLA e RAOULT, 1997).

O diagnóstico direto do agente pode ser feito através de reação de imunofluorescência direta (RIFD) (LEMOS *et al.*, 1996); da morfologia do agente, determinada por microscópio eletrônico; citopatogenicidade em cultura de células Vero; patogenicidade em cobaias e em ovos embrionados; composição protéica por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida; e composição de DNA (PHILLIP *et al.*, 1983). As riquetsias também podem ser visualizadas pelo teste de hemolinfa, promovendo uma rápida detecção do agente em carrapatos infectados (BURGDORFER, 1970). O isolamento do agente, a partir de amostras humanas ou de artrópodes, é realizado através de cultivo, principalmente em células Vero, associada ou não à técnica de centrifugação em “*shell vial*”, que permite a penetração das bactéria dentro da célula (PETER *et al.*, 1990).

Mais recentemente, a aplicação da reação em cadeia pela polimerase (PCR), que usa oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) e *Taq* DNA polimerase para sintetizar cópias quantitativas de uma simples amostra, tem se mostrado como uma técnica de valor para detecção e identificação de riquetsias patogênicas em vetores infectados, em amostras de tecidos ou sangue de indivíduos infectados. Essa técnica nos fornece um ensaio rápido, sensível e altamente específico para a detecção do agente (AZAD *et al.*, 1990). Com o desenvolvimento de seqüenciadores automáticos de nucleotídeos, a análise das seqüências de bases dos produtos amplificados pela PCR tornou-se rápida e sensível. Até o momento, vários genes foram

seqüenciados e, alguns deles têm sido propostos para uso na identificação das riquetsias (SCOLA e RAOULT, 1997). Análises de seqüências de nucleotídeos destes genes vêm se mostrando valiosas na identificação várias espécies ou cepas de riquetsias.

Usando “primers” de uma seqüência do gene do antígeno 17 kDa, comum aos dois grupos de riquetsias, é possível a identificação de agentes pertencentes ao gênero *Rickettsia* (AZAD *et al.*, 1990; WEBB *et al.*, 1990). A utilização de “primers” internos (*nested*-PCR) desse gene foi delineada com objetivo de aumentar a sensibilidade da reação (SCHRIEFER *et al.*, 1994). Um outro “primer”, comum aos dois grupos, foi derivado da seqüência do gene da citrato sintase, tornando-se importante ferramenta para o reconhecimento de quase todas as riquetsias conhecidas (REGNERY *et al.*, 1991; ROUX *et al.* 1997). Para a detecção de riquetsias do GFM, foram sintetizados “primers” a partir de seqüências do gene de proteínas externas de membranas (OmpA e OmpB), representando uma ferramenta para classificação e filogenia dentre esse grupo (REGNERY *et al.*, 1991; EREMEEVA *et al.*, 1994).

2 OBJETIVOS

Este trabalho foi realizado em três propriedades rurais do município de Pedreira, considerado endêmico para Febre Maculosa (FM) no estado de São Paulo, e tem como objetivos:

1. Colher e identificar carrapatos em fase de vida livre (larvas, ninfas e adultos), capturados ao longo de um ano;
2. Pesquisar a presença de riquetsias na hemolinfa dos carrapatos *Amblyomma cajennense* adultos, através da coloração de Gimenez;
3. Determinar a prevalência de infecção por riquetsias do Grupo da Febre Maculosa, em *Amblyomma cajennense* adultos, bem como nas larvas e ninfas de *Amblyomma* sp, através da técnica da reação em cadeia pela polimerase (PCR);
4. Determinar a presença de anticorpos anti-*R. rickettsii* em soros obtidos a partir de humanos, cães e eqüinos, através da reação de imunofluorescência Indireta.

3 MATERIAIS E MÉTODO

3.1 Área de Estudo

Este estudo foi realizado no município de Pedreira, considerado endêmico para Febre Maculosa (FM) no estado de São Paulo. O município apresenta uma área total de 110 Km², e está localizado a 130 Km da capital, conforme Fig. 1. Segundo estatísticas do censo de 2000, a população do município foi estimada em 35.219 habitantes (IBGE, 2000).

Figura 1 – Mapa do estado de São Paulo, indicando a posição do município de Pedreira em relação à capital, São Paulo.

Três propriedades rurais foram escolhidas para o desenvolvimento deste trabalho. A Fig. 2 esquematiza suas localizações dentro do município.

Seus nomes e respectivas localizações, obtidas através do uso de GPS (Garmin GPS 12XL/Garmin Corp.; 1998) estão listadas a seguir:

1 - Fazenda Duas Pontes (Latitude S22°41'14" e Longitude O46°53'17")

2 - Fazenda Monte Nilo (Latitude S22°44'19" e Longitude O46°55'27")

3 - Fazenda Quitandinha (Latitude S22°47'03" e Longitude O46°54'10")

Figura 2 – Mapa do município de Pedreira, estado de São Paulo, indicando as posições das fazendas estudadas.

As propriedades apresentam características comuns, como a presença de uma sede, área de pasto destinado à criação de animais (bovinos, eqüídeos), localização próxima a rios, que delimitam ou cortam

essas propriedades, presença de mata ciliar em toda margem desses rios, entre outras. Algumas características podem ser visualizadas na Fig. 3.

Figura 3 – Fazenda Quitandinha. a) sede; b) Rio Jaguari; c) mata ciliar; d) pasto; e) estrada. São Paulo - 2002.

As fazendas Monte Nilo e Quitandinha localizam-se às margens do Rio Jaguari. Toda a margem deste rio, que corta os municípios de Pedreira, Amparo e Jaguariúna, é considerada área endêmica para febre maculosa no estado de São Paulo. A fazenda Monte Nilo, em particular, está a menos de 100 m da antiga fábrica de cerâmica da Nadir Figueiredo, onde estudos prévios sobre febre maculosa foram realizados e a doença constatada (LEMOS *et al.*, 1996b; GUERCIO *et al.*, 1997; LEMOS *et al.*, 1997a). O turismo nessa área contribui sócio-economicamente com o desenvolvimento da região. Programas de conscientização da população são realizadas com

o objetivo de se prevenir a doença no local, conforme observado na Fig. 4. A fazenda Duas Pontes localiza-se às margens do Rio Camanducaia, afluente do Rio Jaguari.

Figura 4 – Placa fixada às margens do Rio Jaguari, no município de Pedreira/SP, alertando sobre a presença de vetores da febre maculosa. São Paulo - 2002.

3.2 Pesquisa da Presença de Riquétsias em Carrapatos

3.2.1 Cálculo da Amostragem:

Para o desenvolvimento do presente trabalho, estimou-se que a análise de 228 carrapatos possibilitaria o encontro de pelo menos um exemplar positivo para riquétsias do GFM em cada uma das propriedades. Esta estimativa foi calculada segundo THRUSFIELD (1995) e baseada em dados fornecidos por LEMOS *et al.*, (1994), que encontrou cerca de 1,3% dos carrapatos colhidos no estado de Minas Gerais, infectados por riquétsias do grupo da febre maculosa.

Desta forma, propôs-se a colheita de aproximadamente 228 carrapatos adultos por propriedade. Com relação às larvas e ninfas, buscou-se colher quantidades de três e duas vezes, respectivamente, o número de adultos, também por propriedade. Para esses últimos cálculos, levaram-se em consideração: os menores tamanhos dos imaturos, suas maiores densidades populacionais e ainda, suas menores chances de serem encontrados infectados por patógenos em decorrência do menor número de repastos previamente realizados.

3.2.2 Colheita de Carrapatos

Os carrapatos não alimentados foram colhidos, nas pastagens e/ou matas presentes nas três propriedades estudadas, as quais utilizam seus pastos para criação de eqüinos, principais hospedeiros do *A. cajennense* no Brasil. Larvas e ninfas foram colhidas pelo método de arraste de flanela,

enquanto que os adultos foram colhidos por armadilhas de dióxido de carbono (CO₂) segundo OLIVEIRA (1998).

O cronograma de captura dos carrapatos foi estabelecido segundo a variação sazonal da população desse vetor, observada por LABRUNA *et al.* (2002). As propriedades foram visitadas no mês de maio/2000 (predomínio da população de larvas), no mês de agosto/2000 (predomínio da população de ninfas), e entre os meses de dezembro/2000 e fevereiro/2001 (predomínio da população de adultos). Realizaram-se tantas viagens de colheitas quanto se fizeram necessárias até a obtenção do número proposto de exemplares a serem examinados.

3.2.3 Transporte e Identificação dos carrapatos

Imediatamente após a captura, os carrapatos ainda vivos foram colocados em frascos plásticos secos e vedados com tampas contendo pequenas perfurações para permitir a aeração dos vetores. Os frascos foram acondicionados em embalagens térmicas e transportados ao laboratório no mesmo dia da colheita. A seguir, os carrapatos adultos foram mantidos por pelo menos 24 horas em incubadora a 36°C e umidade relativa do ar de 90%. Este procedimento teve o objetivo de proporcionar a multiplicação das riquetsias no interior do carrapato. Em relação às larvas e ninfas, não foi realizada a incubação, por serem mais sensíveis em relação à variação de temperatura.

A identificação taxonômica dos carrapatos adultos foi realizada segundo ARAGÃO e FONSECA (1961).

Todos os carrapatos foram lavados com álcool 70%, seguido de água destilada, visando reduzir sua contaminação externa. As ninfas foram agrupadas em lotes de quatro indivíduos e as larvas em lotes de 10. A seguir, objetivando a viabilidade de eventuais riquetsias em seu organismo, as larvas e ninfas foram colocadas ainda vivas em “freezer” (-80°C). Os carrapatos adultos após a incubação anteriormente mencionada, foram submetidos ao teste de hemolinfa (item 3.2.4), acondicionados individualmente em microtubos de 1,5 mL, numerados e conservados à -80°C .

3.2.4 Teste de hemolinfa

Todos os carrapatos adultos *Amblyomma* sp colhidos foram submetidos ao teste de hemolinfa desenvolvido por BURGDORFER (1970), que consiste num método de triagem para detecção de carrapatos infectados por riquetsias, pertencentes ou não ao GFM.

No teste adotado, após a incubação dos carrapatos, a porção distal de uma das patas do carrapato foi cortada e uma a duas gotas de hemolinfa colhidas em lâminas de vidro, previamente limpas e desengorduradas. As lâminas foram fixadas por calor, coradas por corantes fucsina e verde malaquita, utilizando coloração de GIMENEZ (1964) e examinadas ao microscópio óptico, no aumento de 1200x.

Todos os carrapatos foram submetidos aos mesmos procedimentos padronizados, entretanto, foram observadas algumas diferenças entre as suas hemolinfas (quantidade, densidade da hemolinfa, concentração e

integridade dos hemócitos), nem sempre possibilitando uma leitura confiável. O material no qual a leitura não pôde ser realizada com segurança foi identificado como "perdido".

3.2.5 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

3.2.5.a. Extração de DNA

Adultos. Após descongelamento, cada carrapato adulto foi seccionado longitudinalmente, separando-se em duas metades: uma delas era retornada para o "freezer" (-80°C) e a outra processada visando estudos através da reação em cadeia pela polimerase (PCR).

A extração do DNA de carrapatos adultos foi testada por diferentes protocolos, utilizando técnicas de fervura; técnicas com utilização de fenol-clorofórmio, com variações de enzimas, como proteinase K, RNase, etc. (REGNERY *et al.*, 1991; CHOMCZYNSKI, 1993; BEATI *et al.*, 1994; EREMEEVA *et al.*, 1994; GAGE *et al.*, 1994; ROUX *et al.*, 1996).

A adaptação do protocolo descrito por CHOMCZYNSKI (1993), foi a que gerou melhores resultados. Cada carrapato adulto foi triturado em um tubo de 1,5 mL, com o auxílio de um micropistilo. Ao tubo foi adicionado 150 μL de TE (10 mM Tris HCl; 1mM EDTA, pH 8,0) e 450 μL de isotiocianato de guanidina, seguindo-se uma homogeneização. À mistura, acrescentou-se 100 μL de clorofórmio, submetendo-a à centrifugação (12.000 g, 5 minutos). À fase aquosa, adicionou-se 400 μL de propanol, seguindo-se um descanso por 2 horas (-20°C). Após centrifugação (12.000 g, 5 minutos), ao sedimento foi adicionado 800 μL etanol 70%, seguido de uma nova centrifugação

(12.000 rpm, 5 minutos). Após desprezar o sobrenadante, secou-se à temperatura ambiente e ressuspendeu-se o sedimento com 30 µl de TE, em banho Maria (56°C, 15 minutos). O material extraído foi armazenado no “freezer” (-20°C).

Larvas e Ninfas. Os carrapatos foram macerados individualmente em cápsulas de porcelana com auxílio de pistilo, previamente lavados com detergente neutro, água destilada, HCl (0,1 N), e aquecidos a uma temperatura de 250°C, visando a descontaminação por DNA. Após a maceração das larvas/ninfas, acrescentou-se TE, utilizando-se o protocolo de extração por fervura (DUPONT *et al.*, 1994). O material macerado foi incubado (100°C, 20 minutos) e a seguir congelado (-20°C). Optou-se por este procedimento por se tratar de indivíduos de tamanhos reduzidos, correndo-se o risco de perda de material caso a extração de DNA fosse realizada pelo método adotado para os adultos.

3.2.5.b. PCR

Nas reações, foram utilizados como iniciadores (“primers”), os oligonucleotídeos listados no Quadro 1.

Quadro 1 - Oligonucleotídeos (“primers”) utilizados para identificação genotípica de espécies e amostras de riquetsias do Grupo da Febre Maculosa. São Paulo – 2002.

Pares de “Primer”	Espécie de origem	Gene	Seqüência de nucleotídeo (5'-3')	Tamanho do produto amplificado (bp)
BG 1-21	<i>R. rickettsii</i>	OmpB 135-kDa	GGCAATTAATATCGCTGACGG	650
BG 2-20			GCATCTGCACTAGCACTTTC	
Rr 190.70p	<i>R. rickettsii</i>	OmpA 190-kDa	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA	532
Rr 190.602n			AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT	
Rp CS.877p	<i>R. prowazekii</i>	Citrato Sintase	GGGGGCCTGCTCACGGCGG	381
RpCS.1258n			ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA	
-	<i>R. rickettsii</i>	17 kDa	GCTCTTGCAACTTCTATGTT CATTGTTTCGTCAGGTTGGCG	434
-	<i>R. typhi</i>	17 kDa - Nested	CATTACTTGGTTCTCAATTCGGT GTTTTATTAGTGGTTACGTAACC	230

O par de “primers” gênero específico para *Rickettsia*, do gene da citrato sintase, foi utilizado para amplificação do fragmento de DNA que codifica para a enzima citrato sintase. Esse par de “primers” foi utilizado na PCR para amplificação de DNA extraído a partir de carrapatos adultos. Outro par de “primers”, também gênero específico, que amplifica uma região do gene que codifica uma proteína interna de membrana de 17 kDa (AZAD *et al.*, 1990), foi utilizado nas PCR com DNA extraído tanto de adultos quanto de larvas e ninfas. O uso desses últimos “primers” permite a realização da técnica “nested-PCR”, de maior sensibilidade (SCHRIEFER *et al.*, 1994).

Os materiais positivos para os “primers” gênero-específicos, foram submetidos à outra PCR utilizando-se nucleotídeos que amplificam o

fragmento de DNA que codifica a proteína externa de superfície de 190 kDa (OmpA), possibilitando a detecção de riquetsias do GFM. Adicionalmente, para detectar riquetsias do GFM que não puderam ser identificadas utilizando-se do par de “primers” acima, empregou-se o nucleotídeos que amplificam uma região do gene de uma proteína externa de membrana, de 135 kDa (OmpB).

O preparo dos reagentes da solução a ser utilizada na reação de amplificação do DNA extraído foi realizado conforme adaptação de técnicas retiradas da literatura (WEBB *et al.*, 1990; REGNERY *et al.*, 1991; EREMEEVA *et al.*, 1994; SCHRIEFER *et al.*, 1994), e estão esquematizados no Quadro 2.

Quadro 2 - Concentração de reagentes empregados na reação em cadeia pela polimerase (PCR), segundo o gene pesquisado. São Paulo – 2002.

REAGENTES	CITRATO SINTASE	17 kDa	17 kDa NESTED-PCR	OmpA 190 kDa	OmpB 135 kDa
Tampão Buffer 10X	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Nucleotídeos trifosfatados (dNTP 1,25 mM)	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl
MgCl ₂ (50mM)	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl
Primer #1 10 (pmoles/µl)	3,0 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
Primer #2 10 (pmoles/µl)	3,0 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
Taq (5000 U/mL)	0,5 µl	0,25 µl	0,30 µl	0,30 µl	0,5 µl
H ₂ O miliQ q.s.p 50 µl	21,0 µl	25,25 µl	20,20 µl	25,20µl	21,00 µl
Glicerol	-	-	5 µl	-	-
Amostra	8 µl	5 µl	5 µl	5 µl	8 µl

A reação de amplificação foi realizada diferentemente para cada tipo de “primer”, conforme adaptação da técnica descrita na literatura (WEBB *et al.*, 1990; REGNERY *et al.*, 1991; EREMEEVA *et al.*, 1994; SCHRIEFER *et al.*, 1994). As reações estão esquematizadas no Quadro 3.

Quadro 3 – Condições de amplificação das diferentes reações, conforme o gene pesquisado. São Paulo – 2002.

ETAPAS	CITRATO SINTASE	17 kDa	17 kDa NESTED- PCR	OmpA 190 kDa	OmpB 135 kDa
Desnaturação inicial	95°C – 5 min	94°C – 3 min	94°C – 3 min	94°C – 5 min	95°C – 5 min
Número de ciclos	35	35	25	35	35
Desnaturação	95°C - 20 seg	94°C - 45 seg	94°C - 45 seg	95°C - 40 seg	95°C - 20 seg
Anelamento	48°C – 30 seg	56°C – 30 seg	56°C – 30 seg	58°C – 30 seg	48°C – 30 seg
Extensão	60°C – 2 min	72°C – 90 seg	72°C – 90 seg	65°C – 45 seg	60°C – 2 min
Extensão final	60°C – 10 min	72°C – 10 min	72°C – 10 min	72°C – 10 min	60°C – 10 min

Para confirmação de DNA amplificado, 10 µl do produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2% (Sigma), em cuba horizontal com tampão de corrida TBE 0,5 x (0,045 M Tris-borato e 0,001 M EDTA, pH 8,0), sob voltagem de 100 volts por aproximadamente uma hora e

posteriormente corado por brometo de etídio a 0,5 µg/mL por 15 minutos. A visualização das bandas foi realizada junto a um transiluminador ultravioleta (SAMBROOK *et al.*, 1989). Estas 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 (Rochester, New York).

Os adultos foram analisados por corridas individuais de PCR. As larvas e ninfas foram analisadas por reações em “pools”, constituídos por alíquotas de DNA extraídos individualmente (item 3.2.5.a). Em caso de “pool” positivo, constituído de carrapatos de campo, realizaram-se PCRs individuais das cinco larvas que o compunham.

Previamente, foram realizadas reações testes para validar o procedimento proposto. Para estas reações, constituiu-se um “pool” de DNA contendo alíquotas extraídas de cinco larvas: uma positiva (F1 de fêmeas infectadas com riquétsias no laboratório) e quatro negativas, empregando-se os “primers” selecionados. Resultados positivos confirmaram serem os procedimentos adotados adequados para a detecção de riquétsias em “pools” de carrapatos.

3.2.5.c. Obtenção de Controles positivos

Adultos. Visando maior confiabilidade dos procedimentos adotados, carrapatos infectados por riquétsias foram utilizados nos testes de adequação dos protocolos. Para tanto, carrapatos *A. cajennense* adultos

criados em laboratório, foram infectados experimentalmente com *R. parkeri*¹, pertencente ao grupo da febre maculosa, porém não patogênica. Para inoculação dos carrapatos, cada adulto foi imobilizada em decúbito dorsal sobre fita dupla face. Através de uma seringa de insulina e agulha (13 x 0,4mm), uma gota do inóculo foi inserida na cavidade celomática do carrapato, introduzindo-se a agulha na articulação coxa-trocanter do quarto par de patas. Esta inoculação foi feita com o auxílio de um microscópio estereoscópico. Paralelamente, carrapatos provenientes da mesma colônia foram inoculados com uma gota de PBS (pH 7,0), compondo-se o grupo controle do experimento. Os carrapatos inoculados foram imediatamente retirados da fita de dupla face, colocados dentro de um frasco e acondicionados em uma estufa (35° C, UR>95%, 72 horas). Após incubação dos artrópodes, realizou-se teste de hemolinfa, tal como descrito para as amostras de campo (item 3.2.4). Os carrapatos positivos foram utilizados para a validação dos protocolos de maceração, extração de DNA e PCR. Alíquotas de DNA extraídos destes exemplares foram preservadas para a utilização como controle positivo nos ensaios com amostras de campo.

Larvas e ninfas. Para validar o protocolo de extração de DNA pelo método de fervura, eleito para ensaios com larvas e ninfas, foram realizados os seguintes experimentos:

a) DNA de larvas e ninfas de carrapatos *A. cajennense* foram extraídos pelo método da fervura e amplificadas para o gene do ITS2 (segundo espaçador interno transcrito do DNA ribossômico de artrópodes),

¹ Cepa fornecida pelo Dr. David H. Walker, Universidade do Texas, EUA.

empregado como instrumento para distinção de espécies e populações de artrópodes, entre eles o carrapato (FUKUNAGA *et al.*, 2000). Os resultados positivos comprovaram que não houve nenhum tipo de inibição na utilização do método.

b) Fêmeas infectadas experimentalmente no laboratório com *R. parkeri* foram incubadas (37°C, 48 horas) e a seguir, alimentadas em coelho, juntamente com alguns machos. Após seu total ingurgitamento, foram colocadas em placa de petri e mantidas em estufa B.O.D. (37°C), onde realizaram a postura dos ovos. Após a eclosão, as larvas foram colhidas e congeladas (-80°C). Posteriormente, extraiu-se o DNA de algumas das larvas pelo protocolo de fervura e, através do nested-PCR (“primers” 17Kda), foram detectados alguns exemplares positivos. Estes exemplares foram preservados para a utilização como controle positivo dos ensaios com larvas de campo.

3.2.5.e. Sequenciamento de DNA.

Os fragmentos de DNA de tamanhos esperados, amplificados pela PCR (item 3.2.5.b), foram purificados utilizando um “*kit*” comercial, seguindo as instruções do fabricante (CONCERT Rapid Gel Extraction System, Gibco).

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).

Para a reação de sequenciamento automático, foi utilizado “kit” comercial BigDye™ Terminator – *Cycle Sequencing Ready Reaction* – Applied Biosystems. Foi utilizado o sequenciador de DNA modelo ABI Prism 310 *Genetic Analyser* (Applied Biosystems/Perkin Elmer), segundo seu manual de instruções (“Automated DNA Sequencing”, 1998).

As seqüências obtidas foram alinhadas com auxílio do pacote de programas “Bioedit®” (HALL, 1999).

3.3 Pesquisa de Riquetsias em Humanos e Animais

3.3.1 Colheita de Sangue

As colheitas de sangue de humanos e de animais foram realizadas nos mesmos dias das visitas nas propriedades para colheita de carrapatos adultos.

A colheita de sangue dos humanos foi realizada por uma profissional de enfermagem, através de venopunção da veia cefálica ou radial. Para cada indivíduo, foram anotados dados relativos ao nome, sexo, idade e propriedade.

Foram colhidas amostras de sangue venoso de eqüídeos e caninos. Logo após a contenção física, procedeu-se à colheita do sangue, através de venopunção da veia cefálica (cães) e jugular (eqüídeos). Para cada indivíduo foram anotados dados relativos à espécie, raça, sexo, idade e propriedade.

O sangue colhido foi colocado em tubo de vidro estéril e mantido em temperatura ambiente. No laboratório, as amostras foram centrifugadas

(1500 g por 10 minutos) para a obtenção do soro, os quais foram estocados em microtubos de polipropileno (tipo *ependorf*), devidamente identificados. A seguir, os soros foram estocados a -20°C até o momento de sua utilização.

3.3.2 Reação de Imunofluorescência indireta

Todos os soros de humanos e de animais domésticos, colhidos nas fazendas estudadas, foram submetidos à reação de imunofluorescência indireta (GALVÃO, 1996), sob supervisão do Dr. Márcio A. M. Galvão². As lâminas contendo antígeno específico de *R. rickettsii* foram fornecidas pelo Dr. David H. Walker³.

Uma alíquota de soro foi diluída em PBS (solução fosfato tamponada) e a seguir depositada sobre a lâmina contendo o antígeno de riquetsia. Após incubação em estufa (37°C, 30 minutos) a lâmina foi lavada com PBS, seguido de água destilada, ficando em repouso até sua secagem total. À cada lâmina, foi adicionado o conjugado específico 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 (WALKER *et al.*, 1992). A leitura da lâmina foi realizada em microscópio de imunofluorescência epifluorescente, marca Nikon®, modelo Eclipse E600. Foram considerados positivos os soros com títulos ≥ 64 .

² Universidade Federal de Ouro Preto/Minas Gerais

³ Universidade do Texas/E.U.A.

4 RESULTADOS

4.1 Colheita e Identificação dos Carrapatos

Nas três fazendas estudadas pertencentes ao município de Pedreira/SP, foram selecionadas e identificadas um total de aproximadamente 9000 larvas (maio/2000), 3000 ninfas (agosto/2000) e 850 adultos (dezembro 2000 a fevereiro 2001) de carrapatos pertencentes ao gênero *Amblyomma* sp. A Tab. 2 apresenta o número de carrapatos da espécie *A. cajennense*, nos diferentes estádios de desenvolvimento, segundo as localidades de estudo.

Tabela 1 - Quantidade de carrapatos *Amblyomma cajennense* colhidos em propriedades do município de Pedreira/SP. São Paulo – 2002.

PROPRIEDADE	LARVA	NINFA	ADULTO
Fazenda Duas Pontes	3000	1000	213
Fazenda Monte Nilo	3000	1000	353
Fazenda Quitandinha	3000	1000	244
Total	9000	3000	810

A identificação taxonômica dos carrapatos adultos, realizada segundo ARAGÃO e FONSECA (1961), determinou a existência de duas espécies do gênero *Amblyomma* nas pastagens das três propriedades, sendo no total, 810 *A. cajennense* (95,4%) e 40 *A. cooperi* (4,6%). Do total de 40

indivíduos de *A. cooperi*, 19 (47,5%) foram colhidas na fazenda Duas Pontes, 6 (15%) na fazenda Monte Nilo e 15 (37,5%) na fazenda Quitandinha.

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 nestas visitas, havia sido constatada a presença destas duas espécies de carrapatos (dados não publicados). Sendo assim, as larvas capturadas durante o estudo foram examinadas em microscópio estereoscópico, e comparadas com larvas das duas espécies, das colônias de laboratório. Como as dimensões de larvas de *A. cooperi* são nitidamente maiores que as de larvas de *A. cajennense*, as duas espécies foram facilmente diferenciadas, apesar da grande maioria das larvas pertencerem à espécie *A. cajennense*. Com relação às ninfas, não foi possível uma diferenciação taxonômica pela morfologia. No entanto, em cada colheita de ninfas a campo, 10% dos carrapatos foram colocados para se alimentar em coelhos no laboratório, com o objetivo de criá-los até o estágio adulto, para identificação da espécie em questão. Em todas as infestações realizadas, os carrapatos adultos obtidos a partir de ninfas ingurgitadas, foram sempre *A. cajennense*, sugerindo um grande predomínio ou até mesmo uma exclusividade desta espécie, nas ninfas de *Amblyomma* sp capturadas.

4.2 Teste de Hemolinfa

Os resultados do teste de hemolinfa em carrapatos adultos *Amblyomma cajennense* colhidos em Pedreira/SP, estão sumarizados na Tab. 2; e aqueles referentes a *A. cooperi*, na Tab. 3.

Tabela 2 - Teste de hemolinfa em *Amblyomma cajennense* adulto, segundo a propriedade de origem. Pedreira/SP. São Paulo - 2002

PROPRIEDADE	POSITIVO n (%)	NEGATIVO n (%)	PERDA n (%)	TOTAL N
Duas Pontes	9 (4,23)	185 (86,85)	19 (8,92)	213
Monte Nilo	3 (0,85)	215 (60,91)	135 (38,24)	353
Quitandinha	31 (12,70)	191 (78,28)	22 (9,02)	244
Total	43 (5,31)	591 (72,96)	176 (21,73)	810

A Fig. 5 apresenta uma lâmina positiva de carrapato *A. cajennense*.

Figura 5 – Teste de hemolinfa em *Amblyomma cajennense*.

a) organismos semelhantes à *Rickettsia*,
corados por fucsina; b) hemócitos; 1000x.

Tabela 3 - Teste de hemolinfa em adultos de *Amblyomma cooperi*, segundo a propriedade de origem. Pedreira/SP. São Paulo – 2002.

PROPRIEDADE	POSITIVO n (%)	NEGATIVO n (%)	PERDA n (%)	TOTAL n
Duas Pontes	6 (31,58)	12 (63,16)	1 (5,26)	19
Monte Nilo	1 (16,67)	1 (16,67)	4 (66,67)	6
Quitandinha	6 (40,0)	6 (40,0)	3 (20,0)	15
Total	13 (32,5)	19 (47,5)	8 (20,0)	40

A Fig. 6 apresenta uma lâmina positiva de carrapato *A. cooperi*.

Figura 6 – Teste de hemolinfa em *Amblyomma cooperi*

a) organismos semelhantes a *Rickettsia*, corados por fucsina; b) hemócitos; 1000x.

4.3 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

4.3.1 *Amblyomma cajennense*

Citrato sintase. Todos os adultos foram testados individualmente para o gene da citrato sintase apresentaram resultados foram negativos.

17kDa. nested-PCR

Os resultados da PCR realizada através de *nested*-PCR estão representados na Tab. 4.

Tabela 4 - Reação em Cadeia pela Polimerase para pesquisa de riquetsias em carrapatos *Amblyomma cajennense* colhidos em propriedades do município de Pedreira/SP. São Paulo – 2002.

FAZENDA	ADULTO		LARVA		NINFA		TOTAL	
	n ¹	PCR ² (%)	n ¹	PCR ² (%)	n ¹	PCR ² (%)	n ¹	PCR ² (%)
Duas Pontes	213	7 (3,29)	685	2 (0,29)	460	0 (0)	1.358	9 (0,66)
Monte Nilo	229	9 (3,93)	685	18 (2,63)	460	0 (0)	1.374	27 (1,96)
Quitandinha	244	18 (7,38)	685	2 (0,29)	460	0 (0)	1.389	20 (1,44)
Total	686	34 (4,96)	2.055	22 (1,07)	1.380	0 (0)	4.121	56 (1,36)

¹ número total de carrapatos *Amblyomma cajennense* examinados;

² número total de carrapatos positivos pela PCR, para presença de riquetsias empregando oligonucleotídeos que amplificam gene que codifica proteína 17 kDa.

OmpA e OmpB.

Amostras positivas no *nested*-PCR foram subsequêntemente testadas com os “primers” 190 kDa e 135 kDa, e tiveram resultados negativos.

4.3.2 *Amblyomma cooperi*

O DNA extraído do exemplar de *A. cooperi* da fazenda Duas Pontes, positivo no teste de hemolinfa, apresentou PCR positivo quando da utilização do par de “primers” do gene da citrato sintase. Nas reações empregando os demais “primers” para o GFM (OmpA e OmpB), os resultados foram negativos.

4.4 Sequenciamento de DNA

4.4.1 Adultos

Fragmentos de DNA de riquétsias extraídas a partir de dois indivíduos adultos *A. cajennense* (amostras A1 e A2) foram sequenciados e apresentaram, à análise do fragmento de 230 pb, junto ao GenBank, 100% de similaridade com *R. felis*.

O grau de identidade entre as seqüências de nucleotídeos entre as amostras de adultos estudadas e as seqüências obtidas no GenBank, variou de 0,870 a 1,000, podendo ser esquematizada na Tab. 5.

Tabela 5 - Grau de identidade calculado para cada par de seqüências de nucleotídeos, entre as amostras de adultos estudadas 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. amblyomii</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. peacockii</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.

Fragmentos de DNA de riquetsias extraídas a partir de um indivíduo adulto de *A. cooperi* foi sequenciado e apresentou, à análise do fragmento de 381 pb, do gene da citrato sintase, junto ao GenBank, 100% de similaridade com *Rickettsia bellii*.

4.4.2 Larvas

Fragmentos de DNA de riquetsias extraídas a partir de quatro larvas (amostras L1, L2, L3 e L4) foram seqüenciais e apresentaram, à análise do fragmento de 230 pb, do gene 17 kDa junto às riquetsias presentes no GenBank, similaridade com *R. rickettsii*, *R. conorii*, *R. parkeri* e *R. peacockii*, com porcentagem de 100% (amostras L2, L3 e L4) e 99,4% (amostra L1).

O grau de identidade entre as seqüências de nucleotídeos entre as amostras de larvas estudadas e as seqüências obtidas no GenBank, variou de 0,887 a 1,000, podendo ser esquematizada na Tab. 6.

Tabela 6 - Grau de identidade calculado para cada par de seqüências de nucleotídeos, entre as amostras de larvas estudadas 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>	L1	L2	L3	L4
<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	0,994	1,000	1,000	1,000
<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	0,951	0,956	0,956	0,956
<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	0,989	0,994	0,994	0,994
<i>R. japonica</i>	—	—	—	1,000	0,978	0,983	0,983	0,887	0,956	0,924	0,903	0,983	0,983	0,978	0,983	0,983	0,983
<i>R. montanensis</i>	—	—	—	—	1,000	0,994	0,983	0,903	0,967	0,930	0,908	0,983	0,983	0,978	0,983	0,983	0,983
<i>R. rhipicephali</i>	—	—	—	—	—	1,000	0,989	0,897	0,973	0,935	0,913	0,989	0,989	0,983	0,989	0,989	0,989
<i>R. rickettsii</i>	—	—	—	—	—	—	1,000	0,887	0,962	0,924	0,903	1,000	1,000	0,994	1,000	1,000	1,000
<i>R. typhi</i>	—	—	—	—	—	—	—	1,000	0,881	0,897	0,870	0,887	0,887	0,881	0,887	0,887	0,887
<i>R. amblyommii</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000	0,908	0,897	0,962	0,962	0,956	0,962	0,962	0,962
<i>R. cooley</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000	0,913	0,924	0,924	0,919	0,924	0,924	0,924
<i>R. felis</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000	0,903	0,903	0,897	0,903	0,903	0,903
<i>R. peacockii</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000	1,000	0,994	1,000	1,000	1,000
<i>R. conorii</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000	0,994	1,000	1,000	1,000
Amostra L1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000	0,994	0,994	0,994
Amostra L2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000	1,000	1,000
Amostra L3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000	1,000
Amostra L4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,000

Os valores grafados em vermelho referem-se a seqüências idênticas. Os valores grafados em azul referem-se aos maiores valores de similaridade da amostra L1.

4.5 Colheita de Sangue

Como resultado das colheitas de sangue realizadas nas três propriedades estudadas, foram obtidas 50 amostras de humanos e 42 de animais (22 cavalos, quatro jumentos, 16 cães).

4.6 Reação de Imunofluorescência Indireta

A Tab. 7 apresenta o número de amostras de soro colhidas e submetidas à reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Nela podem ser observados os percentuais de amostras positivas, segundo a localidade e o grupo de doadores.

Tabela 7 - Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para pesquisa de riquetsias do grupo da febre maculosa em soros de humanos e de animais. Pedreira/SP. São Paulo – 2002.

SORO	FAZENDA DUAS PONTES		FAZENDA MONTE NILO		FAZENDA QUITANDINHA		TOTAL	
	n ¹	RIFI ² (%)	n ¹	RIFI ² (%)	n ¹	RIFI ² (%)	n ¹	RIFI ² (%)
Humano	20	0 (0)	9	0 (0)	21	0 (0)	50	0 (0)
Eqüino	10	9 (90)	5	4 (80)	7	4 (57,14)	22	17 (77,27)
Asinino	0	-	0	-	4	0 (0)	4	0 (0)
Canino	4	1 (25)	6	0 (0)	6	4 (66,67)	16	5 (31,25)
Total	34	10 (29,41)	20	4 (20)	38	8 (21,05)	92	22 (23,91)

¹ número total de amostras de soro colhidas e testadas

² número de amostras positivas, com títulos ≥ 64 , para riquetsias do grupo da febre maculosa, testadas pela RIFI, empregando antígeno de *R. rickettsii*.

Nenhuma das 50 amostras de soro de humano apresentou sorologia positiva para *R. rickettsii*.

Das 16 amostras de soro de cães, cinco (31,25%) foram positivas, com títulos ≥ 64 . Destas, dois animais apresentaram títulos finais iguais a 64, um com título de 256 e dois com título de 512. A Tab. 8 mostra a procedência dos caninos e seus títulos de anticorpos anti-*R. rickettsii*.

Tabela 8 - Diluição final do soro canino através da RIFI, segundo a propriedade estudada, Pedreira/SP. São Paulo – 2002.

FAZENDA	NÃO REAGENTE	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	TOTAL
Duas Pontes	4	-	-	-	-	-	-	4
Monte Nilo	5	-	-	1	-	-	-	6
Quitandinha	2	2	-	1	1	-	-	6
TOTAL	11	2	-	2	1	-	-	16

A Fig. 7 mostra uma lâmina de RIFI positiva, com antígeno anti-*R. rickettsii*, realizada em um soro canino, na diluição de 1/64.

Figura 7 – Soro canino positivo, anti-*Rickettsia rickettsii*, através da Reação de Imunofluorescência Indireta, na diluição de 1/64. 400x.

Das 22 amostras de cavalos analisadas, 17 (77,27%) foram positivas para *R. rickettsii*. Destas, um animal apresentou título final igual a 128, dois com título 256, cinco com título 512, seis com título 1024, um animal título 2048 e um com título 4096. Nenhum jumento apresentou sorologia positiva para *R. rickettsii*. A Tab. 9 mostra a procedência dos eqüinos e seus respectivos títulos de anticorpos anti-*R. rickettsii*.

Tabela 9 - Diluição final do soro eqüino através da RIFI, segundo a propriedade estudada, Pedreira/SP. São Paulo – 2002.

FAZENDA	NÃO REAGENTE	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096	TOTAL
Duas Pontes	1	-	-	-	3	5	1	-	10
Monte Nilo	1	-	-	1	1	1	-	1	5
Quitandinha	3	-	1	1	1	-	1	-	7
TOTAL	5	-	1	2	5	6	2	1	22

5 DISCUSSÃO

Em todas as propriedades estudadas no município de Pedreira, São Paulo, foram encontrados, carrapatos das espécies *Amblyomma cajennense* (95,4%) e *Amblyomma cooperi* (4,6%). Ambas já foram citadas como vetores de riquetsias (DIAS e MARTINS, 1939). A maior prevalência de *A. cajennense* em áreas endêmicas para febre maculosa já foi relatada anteriormente na literatura (LEMOS *et al.*, 1997a; LEMOS *et al.*, 1997b). O carrapato *A. cajennense* possui como hospedeiro principal os eqüinos, e sua sazonalidade é conhecida em várias regiões do país. Devido a sua baixa especificidade, é comum encontrá-lo parasitando diversos grupos de vertebrados (ARAGÃO e FONSECA, 1953; LABRUNA *et al.*, 2002). O carrapato *A. cooperi* parasita principalmente capivaras (LEMOS *et al.*, 1996a), porém os aspectos biológicos desse vetor são pouco conhecidos, assim como sua sazonalidade.

As capivaras são incriminadas como reservatórios da doença na região. Em trabalho experimental, foi comprovado que esses animais são capazes de manter riquetsias circulantes, sem manifestações clínicas da doença (TRAVASSOS e VALLEJO, 1942). Entretanto, seu papel na epidemiologia da doença não está bem estabelecido. O fato de *A. cooperi* colhidos na mesma região, terem sido encontrados infectados por *Rickettsia* sp do GFM (LEMOS *et al.*, 1996a), e por *R. bellii* no presente trabalho, aponta para a possibilidade de coexistência dessas duas espécies no mesmo vetor. É possível que a competição entre as bactérias num mesmo

vetor possa determinar épocas distintas de predomínio de um ou outro agente, explicando a sazonalidade da doença verificada na região. Estudos experimentais realizados nos EUA, comprovam a diminuição da transmissão vertical no carrapato de uma cepa patogênica, quando em competição com outra cepa não patogênica (MCDADE e NEWHOUSE, 1986).

Teste de Hemolinfa. O teste é rápido e barato, sendo freqüentemente utilizado em levantamentos epidemiológicos preliminares. Um fator determinante para seu sucesso, é a incubação prévia dos carrapatos. Quanto maior o tempo que permanecerem na estufa, maior a replicação das bactérias em seu interior, facilitando sua visualização nos esfregaços de hemolinfa.

A utilização de corantes de diferentes marcas comerciais pode conduzir a diferenças na qualidade dos resultados, tornando-se necessário a realização de testes para uma adequada escolha dos produtos. A relação de resultados considerados como “perdidos”, isto é, aqueles nos quais a leitura não pôde ser realizada com segurança devido a à qualidade das hemolinfas, foi muito grande, em torno de 20,9%, restringindo nossas observações.

Embora a morfologia do gênero *Rickettsia* se apresente, via de regra, semelhante à bacilos (MCDADE e NEWHOUSE, 1986), no presente trabalho foi considerado como resultado positivo no teste de hemolinfa, a presença de estruturas intracelulares, variando de cocos a bacilos, coradas pela fucsina, segundo metodologia de BURGDORFER (1970). Estas formas foram consideradas, pois, segundo POLICASTRO *et al.* (1997), as riquetsias

podem apresentar variabilidade de forma, de acordo com mudanças de temperatura. A técnica cora também, outras bactérias gram negativas, pertencentes a outras famílias, fato que reduz a confiabilidade do teste (BURGDORFER, 1970).

Em relação aos resultados positivos dos carrapatos adultos, foram observados dois padrões diferentes de estruturas nas hemolinfas, relacionados às espécies de ixodídeos analisadas. Em *A. cajennense*, foi possível visualizar estruturas com formas de coco-bacilos, coradas de rosa pela fucsina (padrão 1). Em *A. cooperi*, observamos estruturas em formato de bastonetes, semelhantes às formas de riquetsias registradas na literatura (padrão 2), o que permitiu sugerir a presença de *Rickettsia* em todas as hemolinfas consideradas positivas.

Por outro lado, somente um exemplar de *A. cajennense* foi encontrado positivo pelo teste de hemolinfa (fazenda Quitandinha), apresentando bactérias com morfologia compatível com o padrão 2. Todos os outros exemplares apresentaram o padrão 1 de positividade, não sendo possível afirmar com segurança, a presença de bactérias do gênero *Rickettsia*.

Dos carrapatos *A. cajennense*, positivos pelo teste de hemolinfa, somente quatro (9,3%), apresentaram-se também positivos na PCR, indicando uma baixa sensibilidade do teste.

Em resumo, o teste de hemolinfa se apresentou como uma técnica insatisfatória como instrumento de triagem, aquém do esperado.

Reação em Cadeia pela Polimerase. Embora não seja usual a inclusão de carrapatos infectados como controle positivo na reação em cadeia pela polimerase (PCR), optou-se por esse procedimento buscando-se mimetizar as condições na natureza.

Nosso trabalho visando a obtenção de controle positivo, através da infecção artificial em carrapatos, além de comprovar a eficácia da metodologia e dos “primers” utilizados, permitiu caracterizar, pela primeira vez, a transmissão transovariana de *Rickettsia parkeri* em uma espécie de carrapato (*A. cajennense*), através da técnica de PCR. A taxa de transmissão obtida na infecção experimental foi de 50%, incluindo-se dentro da faixa esperada de 30% a 100% (MCDADE e NEWHOUSE, 1986), e exatamente igual à taxa observada por BURGDORFER (1962). A espécie *R. parkeri* foi descrita apenas em carrapatos da espécie *Amblyomma maculatum*, nos Estados Unidos (KRIEG e HOLT, 1984), mas sua transmissão transovariana em carrapatos nunca havia sido relatada até o presente momento.

Para a PCR, foi necessária a adequação das técnicas de maceração e de extração de DNA para cada um dos estádios não alimentados, em função de suas diferenças morfológicas, como por exemplo tamanho, quantidade de hemolinfa e resíduos alimentares carregados de estádios precedentes (ninfas e adultos). Nossos testes preliminares indicaram que a maceração em microtubos foi mais adequada aos adultos, enquanto que a maceração de larvas e ninfas gerou melhores resultados com auxílio de cápsulas de porcelana e pistilos. A extração de DNA dos adultos foi feita

segundo CHOMKZYNSKI (1993), enquanto que a extração por fervura foi mais eficaz para os estádios imaturos (DUPONT *et al.*, 1994). Numa eventual opção de se trabalhar com carrapatos recuperados em situação de parasitismo, visando uma maior detecção sem interferência de quaisquer tipos de contaminantes, poderia ser realizada PCR a partir de patas ou da hemolinfa (GAGE *et al.*, 1992).

Após análise de todos os carrapatos adultos, através da PCR do gene da citrato sintase, verificou-se que 100% se apresentaram negativos, contrariando os resultados dos testes de hemolinfa. Optou-se, então, pela utilização de outros pares de “primers”, com realização do *nested*-PCR, cujo limiar de detecção é mais alto quando comparado com a simples PCR, tornando-a uma técnica mais sensível. Utilizando “primers” referidos na literatura (SCHRIEFER *et al.*, 1994), vários testes foram realizados. Constatou-se uma troca de duas pares de bases em um dos “primers” internos do gene 17 kDa. Foi necessária a confecção de um novo par de “primers”, visando uma maior eficácia de funcionamento do método.

Os adultos apresentaram uma prevalência maior de positivos (4,7%) quando comparada às larvas (1,1%). Podemos explicar esse fato devido ao maior número de vezes que o adulto se alimentou em sua vida. O encontro de larvas, não alimentadas, evidencia o fenômeno da transmissão transovariana desses carrapatos na natureza. Ricketts, em 1909, observou pela primeira vez a transmissão transovariana e transtadial de riquetsias em carrapatos. MONTEIRO (1932), comprovou a transmissão transovariana de *Rickettsia* sp em *A. cajennense*, através de inoculação de extrato de ovos

de carrapatos infectados em cobaias, sendo essa transmissão uma das características que explicam o caráter endêmico da doença.

A ausência de ninfas positivas na *nested*-PCR representou um resultado surpreendente. Esperava-se uma maior prevalência de ninfas positivas, pois, o maior número de casos de febre maculosa coincide com a época de pico das ninfas na região estudada (LIMA *et al.*, 1995; LEMOS *et al.*, 1997a). Além disso, a ninfa tendo sido alimentada uma vez em seu estágio anterior, enquanto larva, tem sua chance de infecção aumentada. Ou então, a hipótese de que a riquetsia tenha um efeito letal no carrapato (NIEBYLSKI *et al.*, 1999), fazendo com que a prevalência seja menor neste estágio. Uma possível causa da negatividade dos resultados poderia se atribuída à amostragem insuficiente. Entretanto, o número de indivíduos analisados foi estatisticamente calculado. O cálculo baseado em informações anteriores, mostrou-se adequado, permitindo o encontro de adultos e larvas infectadas. Desta forma, nos inclinamos a atribuir ao acaso a ausência de ninfas positivas em nosso trabalho. Esse fato não reduz a importância deste estágio de desenvolvimento no ciclo das riquetsias, pois as ninfas podem transmitir transestadialmente estes organismos para adultos, como pudemos constatar ao encontrar adultos não alimentados infectados. Para se comprovar a existência de ninfas infectadas, poderia se trabalhar com “pools” maiores de indivíduos, aumentando assim o número de amostras.

Ao analisar a porcentagem total dos carrapatos infectados detectados pela PCR (1,36%), chegou-se à mesma prevalência encontrada em Minas

Gerais por LEMOS *et al.* (1994), através da reação de imunofluorescência direta (RIFD).

Sequenciamento de DNA. Os fragmentos amplificados do gene 17 kDa (230 bp) de riquetsias de dois carrapatos adultos e de quatro larvas foram sequenciadas. As seqüências obtidas foram comparadas com outras disponíveis no GenBank. No entanto, não foi possível uma adequada classificação das riquetsias obtidas através da utilização desse fragmento.

Pela análise de matriz de identidade, foi possível a constatação das riquetsias estudadas como pertencentes ao GFM, uma vez que apresentou valores de similaridade muito baixos para o grupo do tifo (GT).

Em larvas, as seqüências apresentaram similaridade com *R. rickettsii*, *R. conorii*, *R. parkeri* e *R. peacockii*, com porcentagem de similaridade de 100% (três amostras) e 99,4% (uma amostra). Contudo, no fragmento estudado, as bactérias disponíveis no GenBank apresentam similaridade entre si de 100%. Isso não permite concluir sobre a identidade específica dos agentes investigados, tornando necessárias novas caracterizações, através de sequenciamento de fragmentos de outros genes.

Em adultos, de forma inesperada, as amostras foram apresentaram 100% de similaridade com *R. felis*. Essa bactéria não foi descrita em carrapatos. Não podemos concluir que se trata dessa espécie, pois o sequenciamento de outros fragmentos é necessário para uma maior diferenciação. Em recente trabalho, através de reações sorológicas, realizado a partir de soros de pacientes brasileiros com sintomatologia

clínica compatível com a febre maculosa, constatou-se a presença de títulos positivos quando testados frente ao antígeno *R. felis*, sugerindo a presença do agente no local do estudo (RAOULT *et al.*, 2001). A epidemiologia da doença causada pela *R. felis* não está bem estabelecida, assim como sua virulência frente aos animais e humanos.

Em um estudo paralelo, foram colhidas pulgas (*Ctenocephalides felis felis*) em cães da propriedade Quitandinha. Foi realizada PCR das amostras, resultando na amplificação de fragmentos dos genes 17kDa e OmpA. O sequenciamento dos nucleotídeos do fragmento amplificado para o gene OmpA, específico para GFM, apresentou 100% de similaridade com *R. felis*. O fragmento de DNA analisado distingue bem essas riquetsias de outras do mesmo grupo, o que permite concluir que a bactéria encontrada na pulga foi adequadamente caracterizada.

A espécie *R. felis* foi anteriormente caracterizada também a partir de pulgas, sendo estas consideradas seu principal vetor (HIGGINS *et al.*, 1996; BOUYER *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2002). Para a região estudada, pode-se sugerir a ocorrência da mesma espécie de *Rickettsia*, no caso *R. felis*, tanto nos carrapatos quanto nas pulgas. A infecção no carrapato por essa bactéria, ocorreria de forma acidental, não sendo uma associação natural. Esse fato poderia explicar também a baixa quantidade de riquetsia encontradas nos ixodídeos examinados.

Uma vez indicada, através do sequenciamento, que todas as bactérias isoladas dos carrapatos, pertencem ao GFM, os resultados negativos na PCR com os “primers” para o gene OmpA (específicos para

GFM), não eram esperados. Uma hipótese para o ocorrido é a baixa concentração de DNA de riquetsias na amostra, fazendo com que a técnica não apresente sinais na amplificação dos fragmentos esperados.

Neste estudo, uma riquetsia foi detectada em *A. cooperi*, carrapato de capivara, apresentando 100% de similaridade com a espécie *R. bellii*. Este foi o primeiro sequenciamento realizado em laboratório brasileiro de DNA riquetsial extraído a partir de um carrapato. A *R. bellii* não se enquadra em nenhum dos grupos de *Rickettsia*, GFM e GT (STOTHARD *et al.*, 1994). Uma outra riquetsia do GFM, foi identificada a partir de *A. cooperi*, a partir de RIFD (LEMOS *et al.*, 1996a).

Reação de Imunofluorescência Indireta. A ausência de humanos soropositivos pode ser justificada pelo papel de hospedeiro acidental que estes assumem frente ao vetor, o que ocasiona uma baixa prevalência da doença, mesmo em se tratando de área endêmica (LIMA *et al.*, 2001). Além disso, sabe-se que um carrapato infectado necessita estar fixado à pele do hospedeiro por várias horas, para que haja a transmissão efetiva da bactéria (DIAS e MARTINS, 1939). Esta necessidade biológica do agente minimiza os riscos de transmissão da doença em humanos.

Os dados sobre a sorologia dos potenciais hospedeiros fornecem maiores elementos para a interpretação do ciclo epidemiológico da Febre Maculosa nas áreas de estudo. A prevalência de soros positivos encontrada em cavalos (77,3%), e em cães (31,2%) condizem com estudos efetuados nas mesmas espécies de animais nesse mesmo município, realizados por

LEMOS *et al.* (1996b). Os cães também foram estudados em Minas Gerais, apresentando uma prevalência variável de 13,7% (LEMOS *et al.*, 1994) e 25% (GALVÃO, 1996).

Embora existam reações cruzadas entre as espécies dentro de um mesmo grupo (SCOLA e RAOULT, 1997), altos títulos de anticorpos frente a um antígeno específico, sugerem a existência do agente em questão, circulando nas áreas investigadas (MELLES *et al.*, 1992). Desta forma, os títulos elevados de equinos (128 a 4096) registrados no presente trabalho, indicam que esses animais entraram em contato, pelo menos uma vez na vida, com bactérias do GFM, possivelmente com *R. rickettsii*, uma vez que o antígeno utilizado na RIFI foi *R. rickettsii*.

Condizentes com os títulos anti-*R. rickettsii*, os eqüinos possivelmente apresentaram uma grande riquetsemia. Neste caso, poderiam constituir um papel de fonte de infecção para os carrapatos. Desta forma, os eqüinos passam a constituir um dos principais elos na cadeia de circulação das riquetsias pois, também, são responsáveis pela alta densidade populacional de *A. cajennense*. Conseqüentemente, os eqüinos podem ser indicados como animais sentinelas para a infecção humana, em uma determinada região (LEMOS *et al.*, 1996b).

Os asininos são mais resistentes que os equinos à infestação por *A. cajennense* (CASTAGNOLLI, 2002). Este fato pode explicar a sorologia negativa dos jumentos, frente à *R. rickettsii*.

O papel dos cães no ciclo não está bem estabelecido. Os cães não são hospedeiros primários do *A. cajennense*, sendo menos freqüentemente

atacados por esses carrapatos. Este fato pode explicar a menor prevalência de cães positivos em relação aos equinos. Os menores títulos frente ao antígeno testado podem sugerir a ocorrência de reação cruzada com outra riquetsia.

Os cães são o principais hospedeiros de pulgas *Ctenocephalides* spp, o que pode ser constatado nos animais presentes nas propriedades. É possível que a *R. felis*, encontrada em pulgas nessa região como anteriormente mencionado, seja a real responsável pela produção de anticorpos nos cães, justificando os baixos títulos encontrados em nosso estudo, frente ao antígeno *R. rickettsii*. Para resolver essa questão pode-se realizar testes sorológicos mais específicos, como *Western Blotting*.

Considerações finais. Nossos estudos contribuíram para o esclarecimento de alguns aspectos epidemiológicos da febre maculosa brasileira. Detectou-se diferentes riquetsias do GFM, patogênicas ou não, circulando na região de Pedreira/SP. Excetuando-se *R. bellii* e *R. felis* que foram caracterizadas através da análise de DNA, não foi possível a adequada identificação das demais riquetsias. Maiores estudos sobre potenciais reservatórios e vetores poderão favorecer a obtenção de isolados em condições favoráveis para um melhor entendimento sobre o ciclo da doença no Brasil.

6 CONCLUSÕES

Através deste trabalho, realizado em três propriedades rurais do município de Pedreira, no estado de São Paulo:

- a) Constatou-se presença de duas espécies de carrapato do gênero *Amblyomma*: *A. cajennense* e *A. cooperi*;
- b) Confirmou-se uma sazonalidade de *A. cajennense*, com um predomínio das populações de larvas, ninfas e adultos, respectivamente nos meses de maio, agosto e janeiro;
- c) Constatou-se que a técnica de pesquisa de riquetsias na hemolinfa dos carrapatos apresentou resultados insatisfatórios, mostrando-se menos sensível do que o esperado;
- d) Constatou-se a ocorrência natural do fenômeno da transmissão transovariana de riquetsias do grupo da febre maculosa (GFM) em carrapatos *A. cajennense*, pelo encontro de larvas não alimentadas infectadas, analisadas pela metodologia da reação em cadeia pela polimerase (PCR);

- e) Observou-se, através da PCR, que a prevalência de infecção por riquetsias do GFM em *A. cajennense* adultos foi maior que a encontrada nas larvas;
- f) Observou-se, pela análise parcial de seqüências de nucleotídeos amplificados pela PCR, a presença de carrapatos *A. cajennense* infectados por pelo menos duas distintas riquetsias do GFM;
- g) Confirmou-se a presença de cães e eqüinos infectados ou com história de infecção por riquetsias do GFM, através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), com emprego de antígenos *Rickettsia rickettsii*;
- h) Constatou-se a presença na região, de *R. rickettsii* ou bactéria antigenicamente similar, em função dos resultados da análise pela RIFI dos soros de eqüinos, que apresentaram títulos elevados (128 a 4096) frente ao antígeno *R. rickettsii*.

7 REFERÊNCIAS

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

ARAGÃO, H & FONSECA, F. Notas de Ixodologia. VIII Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 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**. p. 557–563. 1990.

BEATI, L.; HUMAIR, P. F.; AESCHLIMANN, A. RAOULT, D. Identification of Spotted Fever Group Rickettsiae isolated from *Dermacentor marginatus* and *Ixodes ricinus* ticks collected in Switzerland. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, n. 2, p. 138-148, 1994.

BEATI, L., RAOULT, D., Mediterranean Spotted Fever and other Spotted Fever Group Rickettsiae. In: PALMER, S. R., SOULSBY, L., SIMPSON, D. I. H. **Zoonoses**, Ed: 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**, v. 35, n. 4, p. 474-478, Jul. 1998.

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

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. **American Journal of Hygiene**, v. 76, p. 293-301, 1962.

BURGDORFER, W. Hemolymph test. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 19, n. 6, p. 1010-1014, 1970.

CASTAGNOLLI, K. C. Carrapato *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787) em eqüídeos: resistência e aspectos imunopatológicos da reação dos hospedeiros. 2002. 80f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal.

CHOMKZYNSKI, P. A. 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.

GUERCIO, V. M. F. D.; 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, Jan. Fev. 1997.

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

DOBSON, M. E.; AZAD, A. F.; DASCH, G. L.; WEBB, L. OLSON, J. G. Detection of murine typhus infected fleas with an enzyme-linked immunosorbent assay. **American Journal Tropical Medicine and Hyiene**, v. 40, p. 521-528, 1989.

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

DYER, R. E. Relationship between Rocky Mountain Spotted Fever and "Exanthematic typhus of S. Paulo. **U. S. Public Health Reports**, v. 48, n. 20, p. 521, 1933.

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

EREMEEVA, M. E.; DASCH, G. A. *Rickettsiae*. In: LEDERBERG, J. **Encyclopedia of Microbiology**, New York. v. 4, 2a. ed. Academic Press. p. 140-180. 2000.

FUKUNAGA, M.; YABUKI, M.; HAMASE, A.; OLIVER, J. H. Jr.; NAKAO, M. Molecular phylogenetic analysis of Ixodid ticks based on the ribossomal DNA spacer, internal transcribed spacer 2, sequences. **Journal of Parasitology**, v. 86, p.38-43, 2000.

GAGE, K. L.; GILMORE, R. D.; KARSTERN, R. H.; SCHWAN, T. Detection of *Rickettsia rickettsii* in saliva, hemolymph and triturated tissues of infected *Dermacentor andersoni* ticks by polymerase chain reaction. **Molecular and Cellular Probes**, v. 6, p. 333–341. 1992

GAGE, K. L.; SCHRUMPF, M. E.; KARSTENS, R. H.; BURGDORFER, W.; SCHWAN, T. G. DNA Typing of Rickettsiae in naturally Infected ticks using a polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism system. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, n. 2, p. 247–260, 1994.

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

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 periurbano. 1996. 114f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical). Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Belo Horizonte, Belo Horizonte.

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

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.

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

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/default.php>>

KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v.1, Williams and Wilkins, Baltimore, 1984, 963 p.

LABRUNA, M. B.; HORTA, M. C.; SOARES, R. M.; PINTER, A.; VIANNA, M. C. 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, São Paulo. Resumos, p. 33. **XV Congresso Latino-Americano de Parasitologia**. São Paulo. Brasil. Out. 2001.

LABRUNA, M. B.; KASAI, N.; FERREIRA, F.; FACCINI, J. 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.

LEMOS, E. R. S.; MACHADO, R. D.; COURA, J. R. Rocky Mountain Spotted Fever in an endemic area in Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 4, p. 497-501, Out./Dez. 1994.

LEMOS, E. R. S.; MELLES, H. H. B.; COLOMBO, S.; MACHADO, R. D.; COURA, J. R.; GUIMARÃES, M. A. A.; SANSEVERINO, S. R.; MOURA, A. Primary isolation of spotted Fever Group Rickettsiae from *Amblyomma cooperi* collected from *Hydrochaeris hydrochaeris* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 91, n. 3, p. 273-275, Mai. Jun. 1996.

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

LEMOS, E. R. S.; MACHADO, R. D.; COURA, J. R.; GUIMARÃES, M. A. A.; FREIRE, N. M. S.; AMORIM, M.; GAZETA, G. S. 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, Mai. Jun. 1997.

LEMOS, E. R. S.; MACHADO, R. D.; PIRES, F. D. A.; MACHADO, S. L.; COSTA, L. M. C.; COURA, J. R. Rickettsiae-infected ticks in an endemic area of Spotted Fever in the State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 4, p. 477-481, Jul. Ago. 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, Abr. Mai. Jun. 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. A situação da febre maculosa na região administrativa de Campinas – SP. In: **I Simpósio sobre Doenças Transmitidas por Carrapatos**. Campinas, São Paulo, Brasil. Mai. 2001.

MAGALHÃES, O. Contribuição ao conhecimento das doenças do grupo do tifo exanthematico. **Monografias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 6, p. 51-72, Rio de Janeiro. 1952.

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

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

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

MONTEIRO, J. L. Vaccina contra o “typho exanthematico” de S. Paulo. Novas correlações entre esta infecção e a febre maculosa das montanhas rochosas. **Memórias do Instituto Butantã**, v. 8, p. 11-20, 1933.

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**, v. 8, p. 41-47, 1933.

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, Fev. 1999.

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

OLIVEIRA, P. R. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae): Avaliação de técnicas para o estudo de dinâmica populacional e biotecnologia. 1998. 97f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PARKER, R. R.; DAVIS, G. E. Protective value of convalescent sera of São Paulo exanthematic typhus against virus of Rocky Mountain Spotted Fever. **U. S. Public Health Reports**, v. 48, n. 19, p. 501. 1933.

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. Jul. 1990.

PHILLIP, R. N.; CASPER, E. A.; BURGDORFER, W.; GERLOFF, R. K.; HUGHES, L. E.; BELL, E. J. Serologic typing of rickettsiae of the spotted fever group by microimmunofluorescence. **The Journal of Immunology**, v. 121, n. 5, p. 1961-1968, Nov. 1978.

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

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.

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

PRICE, W. H. The epidemiology of Rocky Mountain Spotted Fever - II. Studies on the biological survival mechanism of *Rickettsia rickettsii*. **American Journal of Hygiene**, v. 60, p. 292-319, 1954.

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

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.

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

ROUX, V.; FOURNIER, P. E.; RAOULT, D. Differentiation of Spotted Fever Group Rickettsiae by sequencing and analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA of the gene encoding the protein rOmpA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 9, p. 2058-2065, 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. Abr. 1997.

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

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, Abr. 1994.

SCOLA, B. L. & 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. Nov. 1997.

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. **Journal of Medical Entomology**, v. 37, n. 5, p. 707–713, 2000.

STOTHARD, D. R.; CLARK, J. B.; FUERST, P. Ancestral divergence of *Rickettsia bellii* from the spotted fever and typhus groups of Rickettsia and antiquity of the genus Rickettsia. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, n. 4, p. 798-804, Out. 1994.

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

THRUSFIELD, M. Surveys *In*: THRUSFIELD, M. **Veterinary Epidemiology**. Second Edition. Blackwell Science. p. 178-198. 1995.

WALKER, D. H.; HERRERO, J. I. H.; BELTRÀN, R. R.; SOPELANA, A. B.; HIDALGO, A. R. The pathology of fatal Mediterranean spotted fever. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 37, p. 669-672, 1987.

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

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