NICOLE OLIVEIRA DE MOURA

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR
DE RIQUETSIAS EM POTENCIAIS VETORES
PROCEDENTES DE FOCOS ATIVOS DE FEBRE MACULOSA
DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2011

NICOLE OLIVEIRA DE MOURA

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE RIQUÉTSIAS
EM POTENCIAIS VETORES PROCEDENTES DE FOCOS ATIVOS
DE FEBRE MACULOSA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

Dissertação apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Profa. Dra. Teresinha Tizu Sato Schumaker

Versão corrigida: Versão original se encontra arquivada no Serviço de Comunicações do ICB

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Moura, Nicole Oliveira de.

Detecção e caracterização molecular de riquetsias em potenciais vetores procedentes de focos ativos de febre maculosa do Estado do Rio de Janeiro / Nicole Oliveira de Moura. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Teresinha Tizu Sato Schumaker.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Biodiversidade de potenciais vetores e reservatórios de riquetsias.

Versão do título para o inglês: Detection and molecular characterization of *Rickettsia* in potencial vectors from active focuses of spotted fever in the State of rio de Janeiro

Descritores: 1. Carrapato 2. *Rickettsia* 3. Febre maculosa 4. Epidemiologia molecular I. Schumaker, Teresinha Tizu Sato II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0203/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Nicole Oliveira de Moura.

Título da Dissertação: Detecção e caracterização molecular de riquetsias em potenciais vetores procedentes de focos ativos de febre maculosa do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador(a): Teresinha Tizu Sato Schumaker.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a ...../...../.....,

( ) Aprovado(a)

( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome completo: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome completo: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome completo: .....
Instituição: .....

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **034** nas fls. **44** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de **Teresinha Tizu Sato Schumaker** Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Pesquisa de agentes infecciosos em potenciais vetores e reservatórios**" do qual participou(ar) o(s) alunos **Flávia Souza Gherke e os pesquisadores Gilberto Sales Gazeta e Eliana Rodrigues Souza**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em **27.03.2007**.

São Paulo, 28 de março de 2007.

Prof. Dr. CARLOS PELLESCI TABORDA
Vice - Coordenador da
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária da
CEEA - ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Decl. CEUA.010/2010

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 034/07/CEEA, datado de 27.03.07 e por solicitação da Profa. Dra. Teresinha Tizu Sato Schumaker, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Nicole Oliveira de Moura** ao Projeto de Pesquisa "*Pesquisa de agentes infecciosos em potenciais vetores e reservatórios*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 08 de março de 2010.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEEA
ICB/USP

Aos meus amores:
Diego, Elisa, Grace e Theodoro
pela paciência, incentivo, apoio e confiança.
Obrigada!

AGRADECIMENTOS

A Professora Dra. Teresinha Tizu Sato Schumaker pela orientação, por ter me acolhido em seu laboratório com entusiasmo e confiança, pela compreensão e paciência principalmente nos momentos mais difíceis, pelas discussões e pelas divertidas conversas.

Ao Professor Dr. Gilberto Salles Gazêta pela co-orientação, incentivo, confiança, cuidado, paciência, amizade e principalmente, por me aguentar nesses nove (nove!!!!) anos, com muuuuuuito bom humor e otimismo!

A Dra. Flávia de Sousa Gehrke por ter toda a paciência do universo comigo durante os ensaios moleculares e também pelo companheirismo e amizade “fora do lab”, ensinando wii, culinária e incluindo a carioca até nos eventos de família!

A Professora Dra. Andréa Cristina Fogaça pela colaboração durante os ensaios do novo amigo “Real Time” e pela generosa dedicação em ajudar a todo tempo.

A mestrandia Karen Medeiros Cardoso por ser mais do que uma amiga, mais do que uma roommate, mas uma irmã que dividiu comigo essa estranha jornada de morar em São Paulo, pelos PCR's (!), pela sua amizade 24 horas por dia, pelos PCR's (!!), pelas conversas do passado, do presente e do futuro, pelos PCR's (!!!), pelos nossos seriados com gargalhadas, pelos PCR's (!!!!) e pela força, sem ela não teria conseguido.

Ao professor Carlos Augusto Gomes Soares e ao doutorando Erik Machado Ferreira pelo auxílio em uma fase tão importante do trabalho, por estarem sempre disponíveis para auxiliar nas minhas dúvidas (todas devidamente anotadas) e pelas conversas tão divertidas.

A Professora Dra. Marinete Amorim por ser mais do que professora dedicada, mas uma amiga carinhosa sempre disposta a ouvir, ajudar, me incentivar a seguir em frente e pelo cuidado (de perto e de longe) com a minha formação profissional e vida pessoal.

Ao Professor Dr. Nicolau Maués Serra-Freire por sempre ter uma palavra de ânimo, pela confiança, cuidado e carinho dedicados em todos esses anos, pelos tão valiosos ensinamentos ministrados e por ser um exemplo de profissional e ser humano.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por terem concedido bolsa de Mestrado (FAPESP 2010/03554-9; CNPQ 131700/2010-3) e auxílio financeiro para a realização do trabalho.

Aos colegas da Secretaria de Estado de Saúde (SES– RJ) pela parceria, durante as coletas de campo e notificações de casos de FM no estado.

Aos amigos do Laboratório de Parasitologia Experimental e Aplicada (LPEA-USP) e do Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsias (LIRN-FIOCRUZ) pelo companheirismo e “ajudas” durante a realização deste estudo.

As queridas amigas e “dindas” Bárbara Gadelha, Fernanda Souza Cruz, Flavia Valsangiácomo, Monique Leite, Monique Paixão e Priscilla Alvim, pela amizade de tantos anos, pelo apoio, pelas conversas, risadas e e-mails inacreditavelmente divertidos.

Aos queridos tios Lilian e Lúcio Moura pela generosa amizade e carinho intensificados nesses dois anos, pelo suporte e cuidado, por ouvirem (com interesse!) meus papos sobre carrapatos, por compartilharem meus momentos de desespero e também de alegria e pelos incontáveis finais de semana tão divertidos em Aldeia!

Ao meu noivo Diego pelo carinho, cuidado, dedicação, pela inacreditável paciência comigo (principalmente naqueles momentos mais estressantes da realização da dissertação!!), por me fazer cada dia mais feliz, pelas bobagens e risadas, pela ajuda nas discussões do trabalho, sempre me incentivando e torcendo pelo meu sucesso, pois no final vai dar tudo certo, né?!

Aos meus pais Grace e Theodoro e à minha irmã Elisa pelas indescritíveis alegrias, risadas, cantorias e pelas conversas também nos momentos difíceis, por sempre estarem “disponíveis” no skype, por serem meu porto seguro, meus exemplos de amor, respeito, integridade e sabedoria.

A Deus por ser a razão da minha vida, pelo amor incondicional e infinita bondade.

"The fear of the Lord is the beginning of wisdom"
Proverbs 1:7

RESUMO

MOURA, N. O. **Detecção e caracterização molecular de riquetsias em potenciais vetores procedentes de focos ativos de febre maculosa do estado do Rio de Janeiro.** 2011. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A Febre Maculosa Brasileira (FMB) causada por riquetsias do Grupo da Febre Maculosa (RGFM), transmitidas por carrapatos, ocorre no Brasil, principalmente na Região Sudeste, onde óbitos são registrados. Pesquisas indicam que pelo menos três espécies patogênicas veiculadas por pulgas ou carrapatos, circulam em ecótopos dos estados de São Paulo e Minas Gerais. No estado do Rio de Janeiro, a letalidade da FMB é alta, mas só recentemente iniciaram-se investigações epidemiológicas em algumas localidades, indicando a participação de novas espécies de ectoparasitas na circulação das riquetsias. O objetivo geral deste projeto foi avaliar riquetsias em ectoparasitos coletados em áreas de casos humanos de FMB, suspeitos, compatíveis ou confirmados, em outros diferentes municípios do estado em focos recentemente comunicados. Especificamente, objetivaram-se: a) detecção de riquetsias em possíveis vetores, carrapatos e pulgas, coletados sobre animais domésticos, domesticados bem como livres no ambiente; b) análise sobre frequência mínima de ectoparasitas infectados (FMVI) e; c) identificação, através de metodologia molecular, das espécies de riquetsias detectadas. As amostras foram coletadas no período de 2008-2009 em localidades que carecem de informações sobre a manutenção do ciclo de transmissão de riquetsias: Noroeste Fluminense (Porciúncula e Itaperuna), Serrana (Trajano de Moraes e São José do Vale do Rio Preto) e Médio Paraíba (Barra do Piraí, Piraí e Volta Redonda). Os 2076 ectoparasitos coletados e identificados foram processados individualmente ou reunidos em grupos de acordo com sexo, estágio de desenvolvimento e processo de ingurgitamento, constituindo 301 amostras. O DNAg de todas as amostras foi extraído e submetido à pesquisa de genes de organismos do gênero *Rickettsia* (*gltA*) e de RGFM (*ompA*) através de reação em cadeia pela polimerase (PCR). Foram obtidas 16 amostras positivas dos sete municípios investigados. Destas, 15 amplificaram o fragmento do gene *ompA*, indicando ampla distribuição geográfica de RGFM no estado. A FMVI foi calculada para cada espécie e por foco investigado. Como metodologia adicional para detecção de riquetsias em potenciais vetores foram realizados ensaios de PCR quantitativa em 231 amostras, totalizando 1483 artrópodes analisados. Dessas, 144 amostras amplificaram o gene *gltA* para *Rickettsia* sp. Os fragmentos amplificados na PCR convencional foram clonados e as sequências nucleotídicas foram analisadas. Sequências com 99 e 100% de identidade com *Rickettsia rickettsii*, causadora da FMB, foram diagnosticadas em *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma dubitatum*, *Boophilus microplus*, *Ctenocephalides canis* e *Ctenocephalides felis*; e pela primeira vez nos municípios de São José do Vale do Rio Preto, Trajano de Moraes, Volta Redonda, Porciúncula e Itaperuna. Em *A. dubitatum* foi registrado pela primeira vez presença de sequências com 99% de identidade com *Rickettsia bellii*, para estado do Rio de Janeiro, e 100% de identidade com *R. rickettsii*, para o Brasil. Da mesma forma, em amostra de *C. canis* foi obtida sequência com 99% de identidade com *Rickettsia felis* para o estado do Rio de Janeiro, e 99% de identidade com *R. rickettsii* para o Brasil. O presente trabalho revela a ampla distribuição geográfica de RGFM, incluindo *R. rickettsii* causadora da febre maculosa no Brasil, no estado do Rio de Janeiro.

Palavras-chave: Carrapato. Pulga. *Rickettsia*. Febre Maculosa.

ABSTRACT

MOURA, N. O. **Detection and molecular characterization of *Rickettsia* in potential vectors from active focuses of spotted fever in the State of Rio de Janeiro.** 2011. 78p. Master's thesis (Parasitology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The Brazilian Spotted Fever (BSF) caused by Spotted Fever Group rickettsiae (SFGR) transmitted by ticks, occurs in Brazil, particularly in the southeast, where deaths are registered. Research indicates that at least three pathogenic species, transmitted by fleas or ticks, circulate in ecotopes of the states of São Paulo and Minas Gerais. In the State of Rio de Janeiro, the lethality of the BSF is high, but only recently epidemiological investigations began in some locations, indicating the participation of new species of ectoparasites in rickettsiae circulation. The objective of this project is to evaluate rickettsiae in ectoparasites collected in areas of suspected, compatible or confirmed BSF human cases in other different cities in the state in recently reported outbreaks. Specifically, the objectives are: a) detection of *Rickettsia* in possible vectors, ticks and fleas, collected on domestic animals, domesticated and also free environment; b) analysis of Minimum Frequency of Infected Vectors (MFIV) and c) identification, by molecular methods, *Rickettsia* species detected. Samples were collected between 2008-2009 in locations that lack of information on the maintenance of the transmission cycle of rickettsiae: Noroeste Fluminense (Porciúncula and Itaperuna), Serrana (Trajano de Moraes and São José do Vale do Rio Preto) and Médio Paraíba (Barra do Piraí, Piraí and Volta Redonda). The 2076 identified ectoparasites were collected and processed individually or in groups according to sex, stage of development and degree of engorgement, totalizing 301 samples. The genomic DNA of all samples was extracted and subjected to the search for genes of organisms of the genus *Rickettsia* (*gltA*) and SFGR (*ompA*) by polymerase chain reaction (PCR). We obtained 16 positive samples of the seven cities surveyed. Of these, 15 amplified *ompA* gene fragment, indicating broad geographic distribution of SFGR in the state. The MFIV was calculated for each species investigated and focus. As additional methodology for detection of rickettsiae in potential vectors, we performed quantitative PCR assays in 231 samples totalizing 1483 analyzed arthropods. Of these, 144 samples amplified *gltA* gene for *Rickettsia* sp. The conventional PCR amplicons were cloned and sequences were analyzed. Sequences with 99 and 100% identity with *Rickettsia rickettsii*, which causes the BSF were diagnosed in *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma dubitatum*, *Boophilus microplus*, *Ctenocephalides canis* and *Ctenocephalides felis*, and for the first time in the cities of São José do Vale do Rio Preto, Trajano de Moraes, Volta Redonda, Itaperuna and Porciúncula. In *A. dubitatum* was first recorded presence of sequences with 99% identity with *Rickettsia bellii* to the state of Rio de Janeiro, and 100% identity with *R. rickettsii* to Brazil. Similarly, in *C. canis* sample was obtained sequence with 99% identity with *Rickettsia felis* in the state of Rio de Janeiro, and 99% identity with *R. rickettsii* in Brazil. This work reveals the wide geographical distribution of SFGR, including *R. rickettsii* causes BSF in Rio de Janeiro' State.

Key words: Tick. Flea. *Rickettsia*. Spotted Fever.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Mapa do estado do Rio de Janeiro, com destaque para os municípios de coleta de potenciais vetores de riquetsias..... **24**
- Figura 2** – Gel de agarose da PCR para fragmento do gene *gltA* (CS2 – 401pb)..... **34**
- Figura 3** – Filodendograma da comparação das sequências parciais do gene *gltA* (CS2 – 401pb), utilizando o método *Neighbor-Joining* e distâncias evolutivas determinadas pelo algoritmo Kimura 2 parâmetros..... **48**
- Figura 4** – Filodendograma da comparação das sequências parciais do gene *gltA* (CS4 – 834pb), utilizando o método *Neighbor-Joining* e distâncias evolutivas determinadas pelo algoritmo Kimura 2 parâmetros..... **50**
- Figura 5** – Filodendograma da comparação das sequências parciais do gene *ompA*, utilizando o método *Neighbor-Joining* e distâncias evolutivas determinadas pelo algoritmo Kimura 2 parâmetros..... **51**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados para identificação genotípica de espécies de riquetsias.....	26
Tabela 2 – Espécies de vetores de riquetsias coletados, em hospedeiro e município investigados para Febre Maculosa Brasileira, no estado do Rio de Janeiro, no período de outubro de 2008 a novembro de 2009.....	30
Tabela 3 – Frequência absoluta de vetores coletados sobre seis espécies de hospedeiros e em vida livre nos municípios investigados para Febre Maculosa Brasileira, no estado do Rio de Janeiro, no período de outubro de 2008 a novembro de 2009.....	32
Tabela 4 – Frequência absoluta e relativa de potenciais vetores de riquetsias coletados em hospedeiro e em vida livre, nos municípios investigados para Febre Maculosa Brasileira, no estado do Rio de Janeiro, no período de outubro de 2008 a novembro de 2009.....	32
Tabela 5 – Frequência absoluta de vetores de riquetsias coletados em hospedeiros e em vida livre segundo espécie nos municípios investigados para Febre Maculosa Brasileira, no estado do Rio de Janeiro, no período de outubro de 2008 a novembro de 2009.....	33
Tabela 6 – Identificação de genes riquetsiais em potenciais vetores de riquetsias, coletados em hospedeiros e em vida livre, nos municípios investigados para Febre Maculosa Brasileira, na região Serrana, do estado do Rio de Janeiro, no período de outubro de 2008 a novembro de 2009.....	35
Tabela 7 – Identificação de genes riquetsiais em potenciais vetores de riquetsias, coletados em hospedeiros e em vida livre, nos municípios investigados para Febre Maculosa Brasileira, na região do Médio Paraíba, do estado do Rio de Janeiro, no período de outubro de 2008 a novembro de 2009.....	37
Tabela 8 – Identificação de genes riquetsiais em potenciais vetores de riquetsias, coletados em hospedeiros e em vida livre, nos municípios investigados para Febre Maculosa Brasileira, na região do Noroeste Fluminense, do estado do Rio de Janeiro, no período de outubro de 2008 a novembro de 2009.....	40
Tabela 9 – Frequência mínima de vetores infectados com riquetsias (%) para cada espécie de artrópodes analisados e por município do estado do Rio de Janeiro, no período de outubro de 2008 a novembro de 2009.....	43
Tabela 10 – Espécies de riquetsias detectadas por análise de sequências de nucleotídeos de fragmento do gene <i>gltA</i> (CS2 e CS4) em potenciais vetores coletados em hospedeiro e em vida livre, nos municípios investigados para Febre Maculosa Brasileira, no estado do Rio de Janeiro, no período de outubro de 2008 a novembro de 2009.....	45

Tabela 11 – Espécies de riquetsias detectadas por análise de sequências de nucleotídeos de fragmento do gene <i>OmpA</i> em potenciais vetores coletados em hospedeiro e em vida livre, nos municípios investigados para Febre Maculosa Brasileira, no estado do Rio de Janeiro, no período de outubro de 2008 a novembro de 2009.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – Graus Celsius

µg – Micrograma

µL – Microlitro

µM – Micromolar

10X – 10 vezes concentrado(a)

DNA – *Desoxyribonucleic Acid* - Ácido Desoxirribonucléico

dNTP – *Deoxynucleotides triphosphates* – Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

g – Aceleração de gravidade ($9,8 \text{ m/s}^2$)

h – Hora

HCl – Ácido Clorídrico

mg – Miligrama

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

min – Minuto

ml – Mililitro

mM – Milimolar

N₂ – Nitrogênio

NaCl – Cloreto de Sódio

pB – Pares de base

pH – Potencial hidrogeniônico

qsp – Quantidade suficiente para

SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate* - Dodecil Sulfato de Sódio

TE – Tris-EDTA

Tris – Tris (hidroxi) metil amino metano

U – Unidade

s – segundos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Objetivos.....	22
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
2.1 Área de estudo.....	23
2.2 Coleta de material.....	23
2.3 Identificação taxonômica dos artrópodes.....	23
2.4 Pesquisa do bioagente.....	25
2.4.1 Extração de DNAg.....	25
2.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	25
2.5 Frequência Mínima de Vetores Infectados (FMVI).....	26
2.6 Clonagem e Sequenciamento.....	26
2.7 Análise das sequências.....	27
2.8 Análise filogenética.....	27
2.9 PCR quantitativa (qPCR).....	27
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
3.1 Artrópodes coletados e identificados.....	29
3.2 Artrópodes infectados com riquetsias (PCR).....	33
3.3 Frequência Mínima de Vetores Infectados (FMVI).....	42
3.4 Análise das sequências.....	44
3.5 Análise filogenética.....	47
3.6 PCR quantitativa (qPCR).....	53
4 CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS.....	55
ANEXO A – Figura 1 – Identidade A.....	62
ANEXO B – Figura 2 – Identidade B.....	63
ANEXO C – Figura 3 – Identidade D.....	64
ANEXO D – Figura 4 – Identidade F.....	65
ANEXO E – Figura 5 – Identidade G.....	66
ANEXO F – Tabela 1 – Pesquisa de genes riquetsiais (pela Reação em Cadeia da Polimerase – PCR) em potenciais vetores investigados para Febre Maculosa Brasileira, no município de Trajano de Moraes do estado do Rio de Janeiro.....	67

ANEXO F – Tabela 2 – Pesquisa de genes riquetsiais (pela Reação em Cadeia da Polimerase – PCR) em potenciais vetores investigados para Febre Maculosa Brasileira, no município de São José do Vale do Rio Preto do estado do Rio de Janeiro.....	70
ANEXO F – Tabela 3 – Pesquisa de genes riquetsiais (pela Reação em Cadeia da Polimerase – PCR) em potenciais vetores investigados para Febre Maculosa Brasileira, no município de Barra do Piraí do estado do Rio de Janeiro.....	72
ANEXO F – Tabela 4 – Pesquisa de genes riquetsiais (pela Reação em Cadeia da Polimerase – PCR) em potenciais vetores investigados para Febre Maculosa Brasileira, no município de Piraí do estado do Rio de Janeiro.....	73
ANEXO F – Tabela 5 – Pesquisa de genes riquetsiais (pela Reação em Cadeia da Polimerase – PCR) em potenciais vetores investigados para Febre Maculosa Brasileira, no município de Porciúncula do estado do Rio de Janeiro	74
ANEXO F – Tabela 6 – Pesquisa de genes riquetsiais (pela Reação em Cadeia da Polimerase – PCR) em potenciais vetores investigados para Febre Maculosa Brasileira, no município de Itaperuna do estado do Rio de Janeiro.....	75
ANEXO F – Tabela 7 – Pesquisa de genes riquetsiais (pela Reação em Cadeia da Polimerase – PCR) em potenciais vetores investigados para Febre Maculosa Brasileira, no município de Volta Redonda do estado do Rio de Janeiro.....	76

1 INTRODUÇÃO

Riquetsias do gênero *Rickettsia* são bactérias Gram negativas e pleomórficas e podem se localizar no citoplasma e/ou núcleo da célula hospedeira. Nos vetores, podem ser encontradas principalmente nas glândulas salivares, ovários, intestino e hemolinfa, entretanto, com relação aos mamíferos, infectam principalmente células endoteliais (EREMEEVA; DASCH, 2000).

A ordem Rickettsiales está formada por duas famílias: Anaplasmataceae, que abriga espécies dos gêneros *Neorickettsia*, *Wolbachia*, *Ehrlichia* e *Anaplasma* – que ocupam o compartimento intravacuolar; e Rickettsiaceae, que abriga as espécies dos gêneros *Rickettsia* e *Orientia* – que ocupam o compartimento intracitoplasmático nas células hospedeiras infectadas (DUMLER et al., 2001).

As riquetsioses causadas por organismos do gênero *Rickettsia*, são zoonoses presentes em todos os continentes e estão associadas a diversos grupos de artrópodes (AZAD; BEARD, 1998; RAOULT; ROUX, 1997). São mantidas em focos endêmicos, porém podem causar surtos epidêmicos na população humana. Essas doenças apresentam característica febril e aguda, podem conduzir o indivíduo infectado à morte se não forem tratadas precocemente.

As espécies do gênero *Rickettsia* encontram-se distribuídas entre as subdivisões: Grupo Tifo (GT) – composto por *Rickettsia prowazekii* transmitida por piolhos (Tifo Epidêmico) e *Rickettsia typhi* veiculada por pulgas (Tifo Murino), de ampla distribuição mundial; Grupo Ancestral (GA) – composto por bactérias de patogenicidade desconhecida, que inclui *Rickettsia canadensis* e *Rickettsia belli*; e, Grupo Febre Maculosa (GFM) (ROUX; RAOULT, 2000; ROUX et al., 1997; STOTHARD; CLARK; FUERST, 1994).

Até o início do presente século, apenas nove espécies de Riquetsias do Grupo Febre Maculosa (RGFM) eram consideradas patogênicas para o homem. Com o advento de técnicas moleculares, atualmente são reconhecidas 30 espécies e sabe-se que pelo menos 15 espécies são responsáveis pelas riquetsioses verificadas no mundo: *Rickettsia aeschlimannii*, *Rickettsia africae*, *Rickettsia akari*, *Rickettsia australis*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia felis*, *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia honei*, *Rickettsia japonica*, *Rickettsia marmionii*, *Rickettsia mongolotimonae*, *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia sibirica*, *Rickettsia slovaca*. As espécies de riquetsias GFM registradas apenas em vetores são referidas como de patogenicidade desconhecida. Entretanto, quando diagnosticadas em humanos e associadas a algum tipo de patogenia são integradas no grupo de riquetsias GFM patogênicas. Um exemplo

é *R. parkeri* mais recentemente responsabilizada pela febre maculosa ganglionar (PADDOCK et al., 2004).

Febre aguda, mal estar e cefaléia, acompanhados ou não de manifestações cutâneas são os sintomas mais comuns das riquetsioses do GFM. Entretanto, estes sintomas são comuns a várias outras doenças como gripe, dengue, leptospirose, hepatite viral, salmonelose, encefalite, malária, dentre outras, dessa forma, faz-se necessário a realização do diagnóstico diferencial (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010c).

As denominadas Febres Maculosas (FM) podem receber diferentes denominações conforme agente e/ou região. Por exemplo: Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (FMMR) (*R. rickettsii*), Febre Maculosa Mediterrânea ou Febre Botonosa (*R. conorii*), Febre da Picada do Carrapato (*R. africae*), Febre Maculosa Oriental (*R. japonica*) e Riquetsiose felis (*R. felis*). Com exceção de *R. akari* e *R. felis* transmitidas, respectivamente, por pequenos ácaros e pulgas, todas as demais são veiculadas por carrapatos (BROUQUI et al., 2004; PAROLA; DAVOUS; RAOULT, 2005; RAOULT; ROUX, 1997).

Carrapatos pertencentes a diferentes gêneros podem ser observados naturalmente infectados por riquetsias do Grupo Febre Maculosa (GFM) (*Amblyomma* spp, *Aponoma* spp, *Dermacentor* spp, *Haemaphysalis* spp, *Hyalomma* spp, *Ixodes* spp, *Rhipicephalus* spp) em diferentes partes do mundo (PAROLA; DAVOUS; RAOULT, 2005). O artrópode pode permanecer infectado durante toda sua vida e manter a circulação da bactéria, através da transmissão transovariana e/ou transestadial, atuando como reservatório natural. Durante seu repasto, pode transmitir as riquetsias para uma grande diversidade de mamíferos. O homem se infecta acidentalmente (GOODMAN; DENIS; SONENSHINE, 2005). Os carrapatos homoxenos apresentam grande importância na manutenção do ciclo enzoótico da FM, já os carrapatos heteroxenos e antropofílicos destacam-se pelo seu potencial na formação de ciclos epidêmicos da doença.

Febre Maculosa Brasileira (FMB) é um agravo conhecido no Brasil desde o início do século XX (DIAS; MARTINS, 1939). *Amblyomma cajennense*, popularmente conhecido como carrapato do cavalo, carrapato estrela (fase adulta), micuim, carrapatinho e carrapato pólvora (larva) (SERRA-FREIRE, 1991), apresenta hábito alimentar eclético e pode parasitar mamíferos em geral, incluindo-se o homem. Experimentalmente, comprovou-se que estes carrapatos podem transmitir *R. rickettsi* para animais de laboratório e, de forma transovariana, para sua prole (MONTEIRO; FONSECA, 1932). Desta forma, estes artrópodes foram incriminados como responsáveis pela transmissão da FMB (DIAS; MARTINS, 1939; GALVÃO et al., 2005).

Em muitos estudos, a incriminação de certas espécies como vetores em um determinado foco é baseada em dados sobre aspectos epidemiológicos dos carrapatos ali presentes. Isto é, a partir do encontro de numerosos exemplares de espécies com conhecido potencial de transmissão da bactéria e da associação entre sua atividade e a sazonalidade da doença. A estes dados, alguns estudos associam uma pesquisa laboratorial do agente diretamente na hemolinfa do carrapato ou em células de cultura semeadas com triturados dos potenciais vetores. A pesquisa pode indicar a presença de organismos semelhantes a riquetsias (coloração de Gimenez) ou de riquetsias do GFM (reação de Imunofluorescência). Entretanto, este tipo de pesquisa apresenta vários inconvenientes e limitações: é laboriosa, passível de reações cruzadas, de difícil interpretação e, ainda, exige condições de biossegurança raramente disponíveis. A utilização de métodos moleculares na pesquisa do agente em vetores, realizadas na última década, impulsionou de forma significativa os conhecimentos sobre diagnóstico e epidemiologia das riquetsias no país.

Desde o início dos estudos sobre FMB, observações epidemiológicas têm incriminado *A. cajennense* como seu principal vetor. De fato, a detecção molecular de genes de riquetsias do GFM, foi constatada em espécimes colhidos no Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (GAZÊTA et al., 2009; HORTA, 2002; NASCIMENTO, 2003). Porém a confirmação da espécie *R. rickettsii*, através de análise de sequência de nucleotídeos, infectando *A. cajennense* só pode ser confirmada em alguns poucos exemplares procedentes do Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (GEHRKE, 2010; GUEDES, 2009; GUEDES et al., 2005).

O conhecimento sobre a epidemiologia da riquetsiose causada pela *R. felis* ainda é incipiente no Brasil, bem como a relação desta espécie com casos de febre maculosa originadas por outras riquetsias e sua interação com outras bactérias e vetores, além disso, a sua transmissão aos humanos também precisa ser melhor estudada (HORTA, 2006). A doença está incluída no grupo das febres maculosas pela análise filogenética do agente (GALVÃO et al., 2005).

A riquetsiose felis foi diagnosticada no país em 2001, no Estado de Minas Gerais, através da detecção de *R. felis* em sangue de pacientes com sinais clínicos compatíveis com FMB (RAOULT et al., 2001). Esta riquetsia foi detectada e caracterizada utilizando técnicas moleculares, em pulgas, coletadas em cães, de área com casos suspeitos de FMB (OLIVEIRA et al., 2002). Carrapatos *Amblyomma* spp, provenientes de áreas endêmicas para FMB dos estados de Minas Gerais e São Paulo, também demonstraram a presença de *R. felis* (CARDOSO et al., 2006; HORTA, 2002, 2006; PINTER, 2003; VIANNA, 2002).

A forma da infecção da *R. felis* (contato com secreções salivares ou através da picada do artrópode, ou através de restos celulares e/ou fezes de vetores infectados) ainda é discutida (AZAD; BEARD, 1998). Amostras de macerados de fezes de pulgas infectadas foram analisadas pela PCR e apresentaram resultado positivo para *R. felis*, porém este resultado demonstra que o DNA encontrado estava no intestino da pulga, mas não esclarece como a infecção se estabelece na mesma. Além disso, foi estudada a transmissão horizontal de *R. felis* (pela alimentação de larvas de pulgas com fezes de vetor infectado), contudo não foram obtidos resultados positivos neste estudo (WEDINCAMP; FOIL, 2002). Assim, apesar de *R. rickettsii* ser reconhecida como principal agente FMB há várias décadas, inclusive com seu diagnóstico molecular no sangue de pacientes (GEHRKE, 2010; NASCIMENTO et al., 2005; LAMAS et al., 2008; ROZENTAL et al., 2006), estudos realizados em áreas endêmicas no Estado de São Paulo e Rio de Janeiro que apresentaram presença de *R. felis* em pulgas e carrapatos (GEHRKE, 2010; HORTA, 2006), podem indicar a possível participação de mais uma espécie de riquetsia na etiologia da doença.

No Brasil, diferentes estudos objetivando caracterização genotípica de riquetsias do GFM, patogênicas ou de patogenicidade desconhecida, vêm apontando outros artrópodes como vetores relevantes no ciclo enzoótico e epidêmico desses bioagentes. Assim, em Rondônia, *Amblyomma longirostre* foi assinalado como vetor de RGFM e *A. cajennense* de *Rickettsia amblyommii* (LABRUNA et al., 2004a,c); Em Minas Gerais *Rhipicephalus sanguineus*, *Ctenocephalides felis* e *Ctenocephalides* spp. também foram relatados carreando RGFM (CARDOSO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2002). Igualmente, *Amblyomma dubitatum*, *R. sanguineus* e *C. felis* foram incriminados como transmissores de RGFM no estado do Espírito Santo (OLIVEIRA et al., 2008). Em São Paulo, Pinter e Labruna (2006) apontaram *Amblyomma aureolatum* como o vetor de RGFM em área de foco, chamando a atenção para esse ixodídeo como um importante transmissor de *R. rickettsii* para o Brasil. Além disso para este mesmo estado, em 2007, Silveira et al. relataram *R. parkeri* isolada de *Amblyomma triste*, em um município onde não existem registros de riquetsioses. Da mesma forma, Labruna et al. (2007) relataram *R. bellii* do GA e *R. rhipicephali* do GFM, de patogenicidade desconhecida, isolados de *Haemaphysalis juxtakochi*.

O estado do Rio de Janeiro destaca-se por apresentar uma das maiores densidades populacionais do país, possuir um grande fluxo turístico e, ainda, por apresentar grandes áreas rurais e de Unidades de Conservação. A FM é relatada desde a década de 40 no Estado, sem confirmação vetorial da maioria dos casos. No período de 2005 a 2009, foram confirmados 50

casos da doença, levando a 14 óbitos (MS, 2010b). Entretanto, pouco se sabe sobre doenças vetoradas por carrapatos a humanos.

O Centro de Vigilância Epidemiológico/RJ vem investigando óbitos humanos suspeitos ocorridos no Estado, mas, a maioria deles não pode ser confirmada devido a ausência de amostras coletadas durante o período mórbido e pela impossibilidade de investigação *post mortem*.

As pesquisas realizadas com vetores presentes nos focos investigados podem permitir inferências sobre o diagnóstico probabilístico ou presuntivo. Assim, recentemente foi realizado um estudo por pesquisadores da Universidade de São Paulo e Fiocruz/RJ, no estado do Rio de Janeiro em áreas de ocorrência de casos de FMB de três regiões: Serrana (Petrópolis), Médio Paraíba (Barra do Piraí, Barra Mansa, Resende, Valença) e Metropolitana (Mangaratiba e Queimados). Animais domésticos (cães, equinos e bovinos) foram investigados quanto à infecção por riquetsias através de pesquisa de anticorpos (reação de imunofluorescência) e presença de genes riquetsiais (reação em cadeia pela polimerase – PCR). A prevalência de animais soro-reagentes foi elevada, e pela primeira vez no Brasil foi diagnosticado (por PCR e sequenciamento) *R. rickettsii* em cães e cavalos naturalmente infectados em foco de ocorrência da FMB, ressaltando a importância destes animais na manutenção do ciclo em áreas peridomiciliares (GAZÊTA et al., 2009). As frequências mínimas de carrapatos ixodídeos infectados por riquetsias apresentaram valores superiores em relação aos registrados em outras regiões do país. A pesquisa também detectou exemplares de *Ornithodoros* sp. infectados por riquetsia GFM indicando possível participação de carrapatos argasídeos no ciclo da riquetsiose no sítio de ocorrência do caso FMB (GAZÊTA et al., 2009). A pesquisa possibilitou o diagnóstico de *R. rickettsii* infectando espécimes de *A. aureolatum*, *A. cajennense*, *Anocentor nitens*, *Boophilus microplus*, *C. felis* e *R. sanguineus*. *R. felis* foi detectada em *C. felis* e, com menor frequência, em *A. cajennense* (GEHRKE, 2010; GEHRKE et al., 2009). A ausência da espécie não patogênica *R. belli*, pertencente ao Grupo Ancestral e assinalada em quase todos os estudos realizados no país (ESTRADA et al., 2006; LABRUNA et al., 2007) indica a ocorrência de eventos particulares nos sítios estudados. Por outro lado, a constatação de *R. rickettsii* em algumas das espécies constitui contribuição inédita revelando vias alternativas de manutenção do ciclo da riquetsia na natureza. Em alguns focos, *R. sanguineus* constituiu a única espécie presente e a constatação de exemplares infectados pela bactéria sugeriu possível envolvimento destes carrapatos na transmissão para humanos (GEHRKE et al., 2009). No Brasil, esta espécie de carrapato é a segunda espécie mais comum de Ixodidae que parasita humano (SERRA-FREIRE, 2010;

SERRA-FREIRE; SENA; BORSOI, 2011), e na Europa é a responsável pela transmissão da *R. conorii* agente da Febre Maculosa do Mediterrâneo.

Em outro trabalho, em desenvolvimento em outras regiões do estado do Rio de Janeiro, ao contrário do esperado, a análise preliminar de algumas amostras de *A. cajennense* coletados em focos de ocorrências recentes (2007-2009), não possibilitou a detecção de riquetsias (MOURA et al., 2009). Desta forma, o exame de um maior número de exemplares de *A. cajennense*, bem com de outras espécies de ectoparasitas, presentes nestes focos ativos se torna necessário para o melhor entendimento sobre a circulação do agente e, conseqüentemente, medidas de controle específicas poderão ser delineadas.

1.1 Objetivos

O objetivo geral deste projeto foi avaliar riquetsias em ectoparasitas coletados em áreas de casos humanos de FM, suspeitos, compatíveis ou confirmados, de diferentes municípios do Estado do Rio de Janeiro. De forma específica, objetivaram-se:

- a) a detecção de riquetsias em possíveis vetores coletados sobre animais domésticos, domesticados, bem como livres no ambiente;
- b) a análise sobre frequência mínima de ectoparasitas infectados;
- c) a identificação, através de metodologia molecular, das espécies de riquetsias detectadas nos ectoparasitas analisados.

2 MATERIAL E MÉTODO

2.1 Área de estudo

A pesquisa foi realizada em regiões com casos humanos e animais, suspeitos, compatíveis ou confirmados de FM no estado do Rio de Janeiro, no período de setembro de 2008 a novembro de 2009. Foram selecionadas as regiões (CIDE/2006): Noroeste fluminense (Porciúncula e Itaperuna), Serrana (Trajano de Moraes e São José do Vale do Rio Preto) e Médio Paraíba (Barra do Piraí, Piraí e Volta Redonda) por abrigarem a maioria dos casos recentes (2005-2009) da doença no estado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010a; SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE – RJ, 2009 – Banco de dados não publicados), compreendendo áreas com características fisiogeográficas distintas e propiciando focos que necessitam de informações sobre as formas de manutenção e transmissão de riquetsias (Figura 1).

2.2 Coleta de material

As coletas de campo foram realizadas em uma parceria entre equipes do Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses (LIRN) IOC – FIOCRUZ e das Secretarias Municipais e Estadual de Saúde. Os ectoparasitos foram coletados sobre cães, gatos, bois e cavalos presentes na localidade de provável infecção humana, bem como no ambiente. A técnica de obtenção de carrapatos nos hospedeiros foi por torção em torno do próprio eixo longitudinal do idiossoma e no ambiente a coleta foi realizada seguindo a técnica de arrasto de flanela e busca ativa.

Os artrópodes coletados foram acondicionados em potes plásticos estéreis contendo isopropanol PA e encaminhados para o LIRN para identificação.

2.3 Identificação taxonômica dos artrópodes

Os ectoparasitos foram identificados seguindo o Procedimento Operacional Padrão para Identificação Taxonômica de Vetores das Riquetsias (POP-LIRN-017) elaborado e implementado pelo LIRN, utilizando chaves dicotômicas apropriadas.

Todos os artrópodes foram encaminhados para pesquisa de bioagentes (ICB/USP). Os procedimentos adotados constam do protocolo aprovado pela Comissão de Ética para Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas/USP (034, fls44, livro 2).

Figura 1 – Mapa do estado do Rio de Janeiro, com destaque para os municípios de coleta de potenciais vetores de riquetsias

VR - Volta Redonda, BP – Barra do Piraí, PI – Piraí, RP – São José do Vale do Rio Preto, TM – Trajano de Moraes, PO – Porciúncula, IP – Itaperuna;
FONTE: MOURA, T. S., 2011.

2.4 Pesquisa do bioagente

Os ixodídeos e sifonápteros foram processados individualmente ou reunidos em grupos (de dois a 45 indivíduos) de acordo com sexo, estágio de desenvolvimento (adulto, larva e ninfa), processo de ingurgitamento e hospedeiro, constituindo as amostras dos vetores.

Os ectoparasitos foram submetidas à extração de DNA genômico (DNAg), PCR e sequenciamento visando à caracterização de cepas e/ou espécies de riquetsias.

2.4.1 Extração de DNAg

O DNAg de carrapatos e pulgas foi obtido pela técnica de extração por NaCl (ALJANABI; MARTINEZ, 1997) e armazenado a -20°C . Os artrópodes foram triturados em banho de N_2 , e ressuspensos em um volume máximo de 400 μl de solução 1 (NaCl 0,4 M; EDTA 2 mM pH 8,0; Tris HCl 10 mM pH 8,0). Em seguida foi adicionado SDS 2% e 0,4 mg/ml Proteinase K (Promega, Madison, EUA) e o material incubado em banho - maria a $56-60^{\circ}\text{C}$ por 1 à 2 h. Após esta incubação, à mistura foi acrescentada de 2,57 mM de NaCl, homogeneizada e centrifugada 10.000 g por 30 min; o sobrenadante foi precipitado em igual volume de isopropanol. O DNAg foi ressuspensado em 50 μl de TE e quantificado em espectrofotômetro GeneQuant (Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, Londres).

2.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Todas as amostras foram processadas utilizando oligonucleotídeos gênero-específicos CS2 e CS4 (gene *gltA*) para detecção de *Rickettsia* spp e oligonucleotídeos grupo-específicos, para detecção de riquetsias GFM (gene *ompA*) (Tabela 1). O preparo das soluções e as condições das corridas de PCR foram adequados para cada tipo de gene pesquisado (LABRUNA et al., 2004b; REGNERY; SPRUILL; PLIKAYTIS, 1991). Nas reações de PCR foram utilizados 10 pmoles de cada oligonucleotídeo; 200 μM de cada dNTP; 1X de tampão 10X (Tris-HCl 200 mM pH 8,4; KCl 500 mM); 1,5 mM MgCl_2 ; 1,25 U de *Taq* DNA polimerase e água deionizada (qsp 25 μl). Como controle positivo, foi utilizado DNAg de *R. rickettsii* e como controle negativo água deionizada. Para a visualização do fragmento de DNA amplificado, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2 %, coradas por brometo de etídeo e observadas em luz de ultravioleta (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

Tabela 1 – Oligonucleotídeos utilizados para identificação genotípica de espécies de riquétsias.

Gene	Oligonucleotídec	Sequência de nucleotídeo (5'-3')	Fragmento (pb)
<i>ompA</i> ⁱ	<i>Rr</i> 190.70p <i>Rr</i> 190.602n	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT	532
<i>gltA</i>			
1 ^a	CS2-78 CS2-323	GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT	401
2 ^b	CS4-239 CS4-1069	GCTCTTCTCATCCTATGGCTATTAT CAGGGTCTTCGTGCATTTCTT	834
3 ^c	CS-5 CS-6	GAGAGAAAATTATATCCAAATGTTGAT AGGGTCTTCGTGCATTTCTT	147

FONTE: ^a REGNERY; SPRUILL; PLIKAYTIS, 1991; ^b LABRUNA et al., 2004a; ^c LABRUNA et al., 2004b;

2.5 Frequência Mínima de Vetores Infectados (FMVI)

O valor da frequência mínima de vetores infectados (FMVI) permite inferir, com segurança, a frequência mínima de vetores infectados de uma dada espécie em uma determinada área. A FMVI para cada espécie foi calculada utilizando como base os resultados sobre a infecção dos ectoparasitas obtidos por PCR, empregado a fórmula segundo Burket et al. (1998):

$$FMVI = \frac{\text{nº de amostras positivas para cada espécie}}{\text{nº total de vetores de cada espécie}} \times 100$$

2.6 Clonagem e Sequenciamento

O produto da PCR foi purificado com NucleoSpin Extract II *kit* (Macherey Nagel, Düren, Colônia, Alemanha), ligado ao plasmídeo vetor InstaClone™ PCR Cloning *Kit* (Fermentas, Vilnius, Vilnius County, Lituânia) e a seguir clonado utilizando bactéria *Escherichia coli* (linhagem DH5α) competente (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). As amostras foram submetidas à reação de sequenciamento, utilizando BigDye™ Terminator–Cycle Sequencing Ready Reaction *kit* (Applied Biosystems, Carlsbad, Califórnia, EUA). Para cada reação foi utilizado 100 a 200 ng de plasmídeo, 5 pmol de oligonucleotídeo *sense* ou *antisense*, Big Dye (0,75 µl), tampão Save Money (3,25 µl) e água deionizada (qsp 10 µl). As reações foram submetidas ao termociclador sendo 25 ciclos de 10 s a 96 °C, 5 s a 50 °C e 4 min a 60 °C. Após, as amostras foram precipitadas com isopropanol 66% (90 µl), lavadas

com etanol 70% (150 µl), ressuspendidas em formamida (10 µl) e aplicadas em um sequenciador automático ABI Prism 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Carlsbad, Califórnia, EUA), para otimização da clonagem, algumas amostras foram submetidas a replicação do DNAg, com emprego do REPLI-g® Mini/Midi Handbook Kit (QIAGEN, Hilden, Düsseldorf, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante.

2.7 Análise das sequências

As seqüências obtidas foram editadas manualmente empregando-se o programa SeqMan™ II, Expert Sequence Analysis Software 5.00® 1989-2001, do pacote DNASTAR Inc. A avaliação da similaridade das seqüências de nucleotídeo foi obtida através da análise comparativa com as seqüências existentes no banco de dados GenBank com o auxílio do programa BLASTN (NACIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2011). Para os alinhamentos, foram utilizadas seqüências espécies de riquetsias existentes no GenBank, e realizado com o software Clustal W 2.1 (EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE, 2011; LARKIN et al., 2007). Para visualização dos alinhamentos foi empregado o programa Boxshade (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY - EMBnet, 2011).

2.8 Análise filogenética

Os filodendogramas foram construídos pelos métodos de Distância (*Neighbor Joining*) e Máxima Parcimônia com auxílio do programa MEGA 5.0 (TAMURA et al., 2011), o cálculo de distância foi realizado através do algoritmo kimura 2 parâmetros. O suporte dos ramos das árvores filogenéticas foi calculado, utilizando um bootstrap de 1000 réplicas.

2.9 PCR quantitativa (qPCR)

As reações foram realizadas, utilizando os *primers* CS-5 e CS-6 (Tabela 1) e a sonda interna fluorogênica (5' - 56 FAM - CAT TGT GCC ATC CAG CCT ACG GT - BHQ 1 - 3'), de acordo com protocolo já estabelecido (LABRUNA et al., 2004b). As reações foram realizadas utilizando o QuantiMix Easy Probes kit (Biotools, Madri, Madri, Espanha), de acordo com o procedimento descrito pelo fabricante. O programa térmico utilizado foi de 2 min a 95 °C seguidos de 50 ciclos de 15s a 95 °C, 15s a 55 °C e 20s a 68 °C, realizado por um termociclador para qPCR, modelo Mastercycler® ep *realplex*² (Eppendorf, Hamburgo,

Hamburgo, Alemanha). Todas as amostras foram analisadas em triplicata. Como controle negativo, as reações foram realizadas na ausência de DNA. Como controle positivo, foi utilizado DNA plasmidial contendo o fragmento do gene *gltA* de *R. rickettsii* ($5,3 \times 10^7$ a $5,3 \times 10^2$ cópias).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Artrópodes coletados e identificados

Um total de 2076 ectoparasitas foi coletado, em áreas de ocorrência de caso humano e/ou animal de FMB, compreendendo sete municípios do estado do Rio de Janeiro: Porciúncula, Itaperuna, Trajano de Moraes, São José do Vale do Rio Preto, Barra do Piraí, Piraí e Volta Redonda (Figura 1).

Na Tabela 2 estão resumidos os resultados obtidos nas coletas de campo, dessa forma, estão discriminados os dados sobre os hospedeiros examinados (espécie e número) e os vetores coletados (espécie, número, estágio de desenvolvimento e sexo) sobre eles ou livres no meio ambiente, em cada município. No total, foram capturados 2076 potenciais vetores sobre bois ($n=4$), cães ($n=78$), cavalos ($n=13$), gatos ($n=1$), humanos ($n=1$) e no meio ambiente, compondo 301 amostras.

Na Tabela 3 está a frequência absoluta de carrapatos e pulgas coletados em cada espécie de hospedeiro, segundo o município. A distribuição dos 2076 vetores coletados sobre os hospedeiros foi: 35 em bois, 440 em cães, 229 em cavalos, seis em gatos, três em humanos e 1363 livres no ambiente. Do total, 1932 artrópodes eram carrapatos (93,06%) e 144 pulgas (6,94%). As frequências absolutas e relativas de carrapatos e pulgas segundo hospedeiro examinado constam na Tabela 4.

Tabela 2 – Espécies de vetores de riquetsias coletados, em hospedeiro e município investigados para Febre Maculosa Brasileira, no estado do Rio de Janeiro, no período de outubro de 2008 a novembro de 2009

REG	MUNICÍPIO	HOSPEDEIRO (n)	VETOR					TOTAL
			ESPÉCIE	M	F	N	L	
Noroeste Fluminense	Porciúncula	Livre no ambiente	<i>Amblyomma cajennense</i>	0	1	73	161	235
			<i>Amblyomma dubitatum</i>	0	2	0	0	2
			<i>Ctenocephalides felis</i>	1	2	0	0	3
			Sub Total	1	5	73	161	240
	Itaperuna	Livre no ambiente	<i>Amblyomma cajennense</i>	0	0	1	235	236
			<i>Canis familiaris</i> (1)	1	1	0	0	2
			Sub Total	1	1	1	235	238
Serrana	Trajano de Moraes	Livre no ambiente	<i>Amblyomma cajennense</i>	12	5	706	2	725
			<i>Canis familiaris</i> (29)	1	5	176	0	182
			<i>Amblyomma aureolatum</i>	0	1	0	0	1
			<i>Ctenocephalides felis</i>	26	69	0	0	95
			<i>Ctenocephalides canis</i>	0	1	0	0	1
			<i>Equus caballus</i> (2)	4	5	19	1	29
			<i>Anocentor nitens</i>	21	22	12	0	55
			<i>Homo sapiens sapiens</i> (1)	3	0	0	0	3
			Sub Total	67	108	913	3	1091
	São José do Vale do Rio Preto	Livre no ambiente	<i>Amblyomma cajennense</i>	2	5	0	79	86
			<i>Canis familiaris</i> (3)	1	0	0	0	1
			<i>Ctenocephalides felis</i>	2	7	0	0	9
			<i>Amblyomma cajennense</i>	7	6	2	0	15
			<i>Boophilus microplus</i>	0	1	0	0	1
		<i>Bos taurus</i> (4)	<i>Amblyomma cajennense</i>	1	2	0	0	3
			<i>Boophilus microplus</i>	1	31	0	0	32
			Sub Total	14	52	2	79	147

Continua

REG: Região; (n): número de hospedeiros examinados para coleta de vetores; M: macho; F: fêmea; N: ninfa e L: larva. FONTE: MOURA, N. O., 2011.

Tabela 2 – Espécies de vetores coletados, segundo hospedeiro e município investigados para Febre Maculosa Brasileira, no estado do Rio de Janeiro

Continuação								
REG	MUNICÍPIO	HOSPEDEIRO (n)	VETOR					
			ESPÉCIE	M	F	N	L	TOTAL
Médio Paraíba	Barra do Pirai	Livre no ambiente	Amblyomma cajennense	0	1	6	0	7
		Canis familiaris (4)	Amblyomma cajennense	0	1	0	0	1
			Ctenocephalides felis	3	6	0	0	9
		Equus caballus (4)	Amblyomma cajennense	5	9	1	0	15
			Anocentor nitens	0	5	0	0	5
			Sub Total	8	22	7	0	37
	Pirai	Livre no ambiente	Amblyomma cajennense	1	1	3	0	5
		Canis familiaris (8)	Amblyomma cajennense	1	1	8	0	10
			Amblyomma aureolatum	1	0	0	0	1
			Rhipicephalus sanguineus	1	1	2	0	4
			Ctenocephalides felis	6	5	0	0	11
		Equus caballus (1)	Amblyomma cajennense	1	4	0	0	5
		Felis catus (1)	Ctenocephalides felis	1	5	0	0	6
			Sub Total	12	17	13	0	42
	Volta Redonda	Livre no ambiente	Amblyomma cajennense	0	1	37	26	64
		Canis familiaris (33)	Rhipicephalus sanguineus	51	44	8	0	103
			Ctenocephalides felis	0	10	0	0	10
		Equus caballus (2)	Amblyomma cajennense	1	1	97	5	104
			Sub Total	52	56	142	31	281
		TOTAL	155	261	1151	509	2076	

Conclusão

REG: Região; (n): número de hospedeiros examinados para coleta de vetores; M: macho; F: fêmea; N: ninfa e L: larva. FONTE: MOURA, N. O., 2011.

Tabela 3 – Frequência absoluta de vetores coletados sobre seis espécies de hospedeiros e em vida livre nos municípios investigados para Febre Maculosa Brasileira, no estado do Rio de Janeiro, no período de outubro de 2008 a novembro de 2009

MUNICÍPIO	<i>Homo sapiens</i>		<i>Canis familiaris</i>		<i>Equus caballus</i>		<i>Bos taurus</i>		<i>Felis catus</i>		Vida Livre		TOTAL
	C	P	C	P	C	P	C	P	C	P	C	P	
Porciúncula	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	237	3	240
Itaperuna	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	236	0	238
Trajano de Moraes	3	0	183	96	84	0	0	0	0	0	725	0	1091
São José do Vale do Rio Preto	0	0	1	9	16	0	35	0	0	0	86	0	147
Barra do Pirai	0	0	1	9	20	0	0	0	0	0	7	0	37
Pirai	0	0	15	11	5	0	0	0	0	6	5	0	42
Volta Redonda	0	0	103	10	104	0	0	0	0	0	64	0	281
TOTAL	3	0	305	135	229	0	35	0	0	6	1360	3	2076

C: carrapatos; P: pulgas; FONTE: MOURA, N. O., 2011.

Tabela 4 – Frequência absoluta e relativa de potenciais vetores de riquetsias coletados em hospedeiro e em vida livre, nos municípios investigados para Febre Maculosa Brasileira, no estado do Rio de Janeiro, no período de outubro de 2008 a novembro de 2009

HOSPEDEIRO	CARRAPATOS		PULGAS		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%
<i>Bos taurus</i>	35	1,81	0	0	35	1,69
<i>Homo sapiens</i>	03	0,16	0	0	03	0,14
<i>Canis familiaris</i>	305	15,79	135	93,75	440	21,19
<i>Equus caballus</i>	229	11,85	0	0	229	11,03
<i>Felis catus</i>	0	0	06	4,17	06	0,29
Vida livre	1360	70,39	03	2,08	1363	65,66
TOTAL	1932	100	144	100	2076	100

n: frequência absoluta; % frequência relativa de carrapatos e pulgas coletados nos municípios de Porciúncula, Itaperuna, Trajano de Moraes, São José do Vale do Rio Preto, Barra do Pirai, Pirai e Volta Redonda. FONTE: MOURA, N. O., 2011.

A frequência absoluta de indivíduos de cada espécie de ectoparasito identificada em cada um dos municípios consta da Tabela 5. Foram encontradas as seguintes espécies (entre parênteses o número coletado): *A. aureolatum* (n=2); *A. cajennense* (n=1723); *A. dubitatum* (n=2); *A. nitens* (n=63); *B. microplus* (n=33); *Ctenocephalides canis* (n=1); *C. felis* (n=143); *R. sanguineus* (n=109).

Tabela 5 – Frequência absoluta de vetores de riquetsias coletados em hospedeiros e em vida livre segundo espécie nos municípios investigados para Febre Maculosa Brasileira, no estado do Rio de Janeiro, no período de outubro de 2008 a novembro de 2009

LOCALIDADE VETOR	NOROESTE FLUMINENSE		SERRANA		MÉDIO PARAÍBA			TOTAL
	PO	IP	TM	RP	BP	PI	VR	
<i>Amblyomma aureolatum</i>	0	0	1	0	0	1	0	2
<i>Amblyomma cajennense</i>	235	236	936	105	23	20	168	1723
<i>Amblyomma dubitatum</i>	2	0	0	0	0	0	0	2
<i>Anocentor nitens</i>	0	0	58	0	5	0	0	63
<i>Boophilus microplus</i>	0	0	0	33	0	0	0	33
<i>Ctenocephalides canis</i>	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>Ctenocephalides felis</i>	3	0	95	9	9	17	10	143
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	0	2	0	0	0	4	103	109
TOTAL	240	238	1091	147	37	42	281	2076

PO: Porciúncula; IP: Itaperuna; TM: Trajano de Moraes; RP: São José do Vale do Rio Preto; BP: Barra do Piraí; PI: Piraí; VR: Volta Redonda; FONTE: MOURA, N. O., 2011.

Estas espécies encontradas são as mesmas já relatadas em outros estudos desenvolvidos no estado do Rio de Janeiro, visando a investigação de riquetsias em potenciais vetores (GAZÊTA et al., 2009; GEHRKE, 2010; ROZENTAL et al., 2002; SOUZA, 2009), com exceção de *A. dubitatum* e *C. canis* que não são encontrados com tanta frequência, provavelmente pelo desenvolvimento de estudos que não realizam investigação em locais e/ou hospedeiros de maior incidência.

3.2 Artrópodes infectados com riquetsias (PCR)

Como ilustração, a Figura 2 apresenta foto do gel obtido de corrida de PCR (utilizando o oligonucleotídeo CS2, para o gene *gltA*) do DNAg extraído de 13 amostras, dos sete municípios fluminenses investigados. As amostras 2987B, 2936A, 2991C, 3171B, 2820 e 070 não amplificaram fragmentos do gene pesquisado, já as amostras 2988A, 2988B, 2989A, 2932B, 2813, 078 e 178 apresentaram resultado positivo para o CS2.

Figura 2 – Gel de agarose da PCR para fragmento do gene *gltA* (CS2 – 401pb)

PM: Peso Molecular de 100pb; 1: 2987B; 2: 2988A; 3: 2988B; 4: 2989A; 5: 2932B; 6: 2936A; 7: 2991C; 8: 3171B; 9: 2813 ; 10: 2820; 11: 070; 12: 078; 13: 178; C-: Controle negativo; C+: Controle positivo; FONTE: MOURA, N. O., 2011.

Os 2076 ectoparasitas analisados (100% dos indivíduos coletados) formaram 301 amostras, todas foram processadas por PCR, utilizando os três oligonucleotídeos para detecção dos genes *gltA* e *ompA*. Foi possível amplificar fragmento de pelo menos um dos genes riquetsiais em 16 amostras (5,31%). As porcentagens de amostras positivas, por município foram: Porciúncula (25,00%), Itaperuna (14,29%), Trajano de Moraes (2,70%), São José do Vale do Rio Preto (10,00%), Barra do Piraí (4,00%), Piraí (7,41%) e Volta Redonda (1,45%). Destes municípios, apenas em Barra do Piraí alguns estudos epidemiológicos sobre FMB foram realizados previamente (GEHRKE, 2010) porém os sítios investigados no presente trabalho são distintos e pertencentes a focos ativos recentemente notificados.

Nas Tabelas 6, 7 e 8 estão discriminados os resultados sobre os vetores examinados, por PCR convencional (*ompA* e *gltA*), segundo espécie, hospedeiro, número de amostras compostas por estes vetores, código das amostras positivas, gene amplificado, segundo município investigado, em cada região do estudo.

Para a realização dos ensaios moleculares da PCR, os 147 vetores procedentes de São José do Vale do Rio Preto (*A. cajennense*, *B. microplus* e *C. felis*) foram divididos em 50 amostras. Destas, cinco amostras (*A. cajennense* coletado em cavalo e *B. microplus* em cavalo e boi) amplificaram pelo menos um dos genes riquetsiais (Tabela 6).

De forma semelhante, os 1091 vetores procedentes de Trajano de Moraes (*A. cajennense*, *A. aureolatum*, *A. nitens*, *C. felis* e *C. canis*) foram divididos em 111 amostras. Destas, três amostras (*A. cajennense* e *C. canis* em cão) amplificaram pelo menos um dos genes pesquisados, sendo este o primeiro relato de riquetsia detectada na pulga *C. canis* no Rio de Janeiro, bem como o primeiro relato da ocorrência de *Rickettsia* sp para estes dois municípios da região Serrana (Tabela 6).

Tabela 6 – Identificação de genes riquetsiais em potenciais vetores de riquetsias, coletados em hospedeiros e em vida livre, nos municípios investigados para Febre Maculosa Brasileira, na região Serrana, do estado do Rio de Janeiro, no período de outubro de 2008 a novembro de 2009

MUN	HOSPEDEIRO (n)	VETOR												
		ESPÉCIE	M	F	N	L	TOTAL	AMOSTRA						
								(n)*	POS(n)	CÓDIGO	gltA*	gltA**	ompA	POS %
Trajano de Moraes	Livre no ambiente	A. cajennense	12	5	706	2	725	33	0					0
		A. cajennense	1	5	176	0	182	21	2	2813	+	-	+	9,52
	Canis familiaris (29)		2820	-	-	+								
		A. aureolatum	0	1	0	0	1	1	0					0
		C. felis	26	69	0	0	95	23	0					0
		C. canis	0	1	0	0	1	1	1	178	+	+	+	100
	Equus caballus (2)	A. cajennense	4	5	19	1	29	9	0					0
		An. nitens	21	22	12	0	55	22	0					0
	Homo sapiens (1)	An. nitens	3	0	0	0	3	1	0					0
		Sub Total		67	108	913	3	1091	111	3				
São José do Vale do Rio Preto	Livre no ambiente	A. cajennense	2	5	0	79	86	10	0					0
		A. cajennense	1	0	0	0	1	1	0					0
	Canis familiaris (3)													
		C. felis	2	7	0	0	9	4	0					0
	Equus caballus (4)	A. cajennense	7	6	2	0	15	11	2	2988A	+	-	+	18,18
										2988B	+	-	+	
		B. microplus	0	1	0	0	1	1	1	2987B	-	-	+	100,00
	Bos taurus (4)	A. cajennense	1	2	0	0	3	3	0					0
		B. microplus	1	31	0	0	32	20	2	2989A	+	-	+	
										2991C	-	-	+	0
	Sub Total		14	52	2	79	147	50	5					10,00
	TOTAL		81	160	915	82	1238	161	8					4,97

MUN: município; (n): número de hospedeiros examinados para coleta de vetores; (n)*: números de amostras compostas para as análises utilizando Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR); POS(n): número de amostras amplificadas para pelo menos um dos genes riquetsiais; gltA*: resultado da PCR, utilizando o oligonucleotídeo CS2; gltA**: resultado da PCR, utilizando o oligonucleotídeo CS4; ompA: resultado da PCR para o gene *ompA*; POS%: porcentagem de amostras amplificadas; FONTE: MOURA, N. O., 2011.

Os 37 vetores procedentes de Barra do Piraí (*A. cajennense*, *A. nitens* e *C. felis*) foram divididos em 25 amostras. Destas amostras, uma (*A. cajennense* coletado em cavalo) amplificou um dos genes riquetsiais (Tabela 7).

Da mesma forma, foram coletados 42 vetores em Piraí (*A. cajennense*, *A. aureolatum*, *R. sanguineus* e *C. felis*) e estes foram divididos em 27 amostras. Destas, duas amostras (*C. felis* coletado em cão e gato) amplificaram pelo menos um dos genes investigados. Anteriormente, em 2002, Rozental et al. evidenciaram a presença de organismos riquetsialike (utilizando coloração de Gimenez) em *Amblyomma* sp e em *R. sanguineus*, bem como a presença de riquetsias do GFM (através da Reação de Imunofluorescência Indireta – RIFI) para esta última espécie, no município de Piraí (Tabela 7). Entretanto, o presente trabalho constitui a primeira demonstração da presença de genes riquetsiais em vetores para o município de Piraí.

Ainda para a região do Médio Paraíba, os 281 vetores procedentes de Volta Redonda (*A. cajennense*, *R. sanguineus* e *C. felis*) foram divididos em 69 amostras. Destas, uma (*C. felis* em cão) amplificou um dos genes riquetsiais. Este é o primeiro relato da ocorrência de riquetsia para este município (Tabela 7).

Tabela 7 – Identificação de genes riquetsiais em potenciais vetores de riquetsias, coletados em hospedeiros e em vida livre, nos municípios investigados para Febre Maculosa Brasileira, na região do Médio Paraíba, do estado do Rio de Janeiro, no período de outubro de 2008 a novembro de 2009

MUN	HOSPEDEIRO (n)	VETOR													
		ESPÉCIE	M	F	N	L	TOTAL	AMOSTRA							
								(n)*	POS (n)	CÓDIGO	gltA*	gltA**	ompA	POS %	
Barra do Pirai	Livre no ambiente	A. cajennense	0	1	6	0	7	3	0						0
	Canis familiaris (4)	A. cajennense	0	1	0	0	1	1	0						0
		C. felis	3	6	0	0	9	5	0						0
	Equus caballus (4)	A. cajennense	5	9	1	0	15	11	1	3171B	-	-	+	9,09	
		A. nitens	0	5	0	0	5	5	0						0
		Sub Total		8	22	7	0	37	25	1					
Pirai	Livre no ambiente	A. cajennense	1	1	3	0	5	3	0						0
	Canis familiaris (8)	A. cajennense	1	1	8	0	10	7	0						0
		A. aureolatum	1	0	0	0	1	1	0						0
		R. sanguineus	1	1	2	0	4	3	0						0
		C. felis	6	5	0	0	11	6	1	181A	+	-	-	16,66	
	Equus caballus (1)	A. cajennense	1	4	0	0	5	5	0						0
	Felis catus (1)	C. felis	1	5	0	0	6	2	1	182B	+	+	+	50,00	
	Sub Total		12	17	13	0	42	27	2						7,41

Continua

MUN: município; (n): número de hospedeiros examinados para coleta de vetores; (n)*: números de amostras compostas para as análises utilizando Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR); POS(n): número de amostras amplificadas para pelo menos um dos genes riquetsiais; gltA*: resultado da PCR, utilizando o oligonucleotídeo CS2; gltA**: resultado da PCR, utilizando o oligonucleotídeo CS4; ompA: resultado da PCR para o gene *ompA*; POS%: porcentagem de amostras amplificadas; FONTE: MOURA, N. O., 2011.

Tabela 7 – Identificação de genes riquetsiais em potenciais vetores de riquetsias, coletados em hospedeiros e em vida livre, nos municípios investigados para Febre Maculosa Brasileira, na região do Médio Paraíba, do estado do Rio de Janeiro, no período de outubro de 2008 a novembro de 2009

Continuação

MUN	HOSPEDEIRO (n)	VETOR												
		ESPÉCIE	M	F	N	L	TOTAL	AMOSTRA						
								(n)*	POS (n)	CÓDIGO	<i>gltA</i> *	<i>gltA</i> **	<i>ompA</i>	POS %
Volta Redonda	Livre no ambiente	<i>A. cajennense</i>	0	1	37	26	64	4	0					0
	<i>Canis familiaris</i> (33)	<i>R. sanguineus</i>	51	44	8	0	103	54	0					0
		<i>C. felis</i>	0	10	0	0	10	5	1	078	+	+	+	20,00
	<i>Equus caballus</i> (2)	<i>A. cajennense</i>	1	1	97	5	104	6	0					0
		Sub Total	52	56	142	31	281	69	1					1,45
	TOTAL	72	95	162	31	360	121	4					3,31	

Conclusão

MUN: município; (n): número de hospedeiros examinados para coleta de vetores; (n)*: números de amostras compostas para as análises utilizando Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR); POS(n): número de amostras amplificadas para pelo menos um dos genes riquetsiais; gltA*: resultado da PCR, utilizando o oligonucleotídeo CS2; gltA**: resultado da PCR, utilizando o oligonucleotídeo CS4; ompA: resultado da PCR para o gene *ompA*; POS%: porcentagem de amostras amplificadas; FONTE: MOURA, N. O., 2011.

Já para a região do Noroeste Fluminense, foram coletados 238 vetores procedentes de Itaperuna (*A. cajennense* e *R. sanguineus*) que foram divididos em sete amostras. Destas, uma (*A. cajennense* coletado livre no ambiente) amplificou ambos genes riquetsiais investigados (Tabela 8).

Os 240 vetores coletados livres no ambiente em Porciúncula (*A. cajennense*, *A. dubitatum* e *C. felis*) foram divididos em 12 amostras. Destas, três (*A. cajennense*, *A. dubitatum* e *C. felis*) amplificaram pelo menos um dos genes pesquisados. Este é o primeiro relato de riquetsia detectada em *A. dubitatum* no estado do Rio de Janeiro, bem como da ocorrência de *Rickettsia* para esta região do estado (Tabela 8).

Tabela 8 – Identificação de genes riquetsiais em potenciais vetores de riquetsias, coletados em hospedeiros e em vida livre, nos municípios investigados para Febre Maculosa Brasileira, na região do Noroeste Fluminense, do estado do Rio de Janeiro, no período de outubro de 2008 a novembro de 2009

MUN	HOSPEDEIRO (n)	VETOR												
		ESPÉCIE	M	F	N	L	TOTAL	AMOSTRA						
								(n)*	POS(n)	CÓDIGO	<i>gltA</i> *	<i>gltA</i> **	<i>ompA</i>	POS %
Porciúncula	Livre no ambiente	<i>A. cajennense</i>	0	1	73	161	235	9	1	2936A	-	-	+	11,11
		<i>A. dubitatum</i>	0	2	0	0	2	1	1	2937A	+	+	+	100,0
		<i>C. felis</i>	1	2	0	0	3	2	1	077	+	-	+	50,00
		Sub Total	1	5	73	161	240	12	3					25,00
Itaperuna	Livre no ambiente	<i>A. cajennense</i>	0	0	1	235	236	5	1	2932B	+	-	+	20,00
	<i>Canis familiaris</i> (1)	<i>R. sanguineus</i>	1	1	0	0	2	2	0					
		Sub Total	1	1	1	235	238	7	1					14,29
		TOTAL	2	6	74	396	478	19	4					21,05

MUN: município; (n): número de hospedeiros examinados para coleta de vetores; (n)*: números de amostras compostas para as análises utilizando Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR); POS(n): número de amostras amplificadas para pelo menos um dos genes riquetsiais; gltA*: resultado da PCR, utilizando o oligonucleotídeo CS2; gltA**: resultado da PCR, utilizando o oligonucleotídeo CS4; ompA: resultado da PCR para o gene *ompA*; POS%: porcentagem de amostras amplificadas; FONTE: MOURA, N. O., 2011.

De forma resumida, o presente estudo demonstra pela primeira vez o registro de riquetsias nos municípios de São José do Vale do Rio Preto, Trajano de Moraes, Volta Redonda, Porciúncula e Itaperuna, indicando a ampla distribuição geográfica de *Rickettsia* sp. no Rio de Janeiro.

É importante ressaltar que dentre as 16 amostras positivas, 15 amostras amplificaram o fragmento do gene *ompA*, portanto, 93,75% das amostras positivas, corresponderam a RGFM. Apesar da possível presença de riquetsias não patogênicas ou de patogenicidade desconhecida no GFM, existe grande possibilidade destas RGFM serem patogênicas, uma vez que a presença de *R. rickettsii* já foi demonstrada em vários municípios do estado (GAZÊTA et al., 2009; GEHRKE, 2010; LAMAS et al., 2008; ROZENTAL et al., 2006; SOUZA, 2009; SOUZA et al., 2005).

Estes resultados contribuem para o mapeamento de áreas endêmicas e para o entendimento da circulação e epidemiologia das riquetsias no estado do Rio de Janeiro.

Souza et al. (2006) pesquisaram no município de Petrópolis (região Serrana), onde casos humanos fatais foram registrados, a presença de riquetsias em potenciais vetores, por PCR. Neste estudo as espécies *A. cajennense*, *A. aureolatum*, *R. sanguineus*, *A. nitens*, *B. microplus*, *Ornithodoros* sp. e *C. felis* demonstraram a presença de RGFM. A presença de *B. microplus* e *Ornithodoros* sp. infectados com RGFM em áreas de foco, sugere possível participação destas espécies no ciclo enzoótico.

O encontro de numerosos exemplares de *A. cajennense* e *R. sanguineus* nas áreas de estudo, parece ser comum para as regiões de foco de FMB no estado do Rio de Janeiro. *R. sanguineus* está adaptado a ambiente antrópico em todo o Brasil, é relativamente específico a canídeos e importante na manutenção do ciclo enzoótico de bioagentes entre canídeos, principalmente cães domésticos. No estado do Rio de Janeiro, *R. sanguineus* já foi encontrado infectado com *R. rickettsii* na região do Médio Paraíba (GEHRKE et al., 2009) e com RGFM na região Serrana (SOUZA et al., 2006).

Segundo Gazêta et al. (2009), *A. cajennense* foi a segunda espécie com maior dominância na região do Médio Paraíba, com valores próximos àqueles encontrados para *R. sanguineus*, (espécie com maior coeficiente de dominância nesta região). Dados epidemiológicos, baseados na análise por PCR, sugerem que na porção oriental do Vale do Paraíba o vetor mais importante é *R. sanguineus* (grande potencial de risco em áreas urbanizadas) e na porção ocidental, *A. cajennense*, (vetor de maior importância no ciclo epidêmico da FM em diferentes regiões do estado) sendo potencialmente os responsáveis pela epizootia dos casos observados na região (GAZÊTA et al., 2009).

A espécie de carrapato *A. nitens* geralmente não parasita humanos, porém apresenta potencial para manter o ciclo enzoótico de riquetsias em equinos (SOUZA, 2009). Apesar de *A. nitens* não ter demonstrado a presença de riquetsias neste estudo, espécimes deste ixodídeo foram encontrados infectados com *R. rickettsii* nos municípios de Barra Mansa, Valença, Queimados e Petrópolis (GEHRKE, 2010) e apresentaram resultado positivo para RGFM em Queimados (região Metropolitana), onde teve a segunda maior frequência e dominância, apontando para seu possível papel como mantenedor do ciclo enzoótico de riquetsias em equinos (SOUZA, 2009).

A espécie de pulga *C. felis*, também bastante comum em ambiente antrópico, ocorre em áreas similares às de *R. sanguineus*, em foco de FM no estado do Rio de Janeiro e apresenta importância epidemiológica semelhante no estudo das riquetsioses (GAZÊTA et al., 2009; GEHRKE et al., 2009; SOUZA et al., 2006).

Em resumo, os resultados do presente estudo em adição aos trabalhos de vigilância de ambiente conduzido pela Secretaria Estadual de Saúde, do Rio de Janeiro, em parceria com o LIRN, e os estudos desenvolvidos em diferentes regiões (GAZÊTA et al., 2009; GEHRKE, 2010; GEHRKE et al., 2009; PINTO, 2009; ROZENTAL et al., 2002; SOUZA, 2009) indicam que a associação entre vetores e hospedeiros infectados com *R. rickettsii* e/ou *R. felis* mostra que *R. sanguineus*, *A. aureolatum* e *C. felis* em cães, e *A. nitens* e *A. cajennense* em cavalos, são importantes na manutenção de ciclo enzoótico de RGFM. O mesmo pode ser ressaltado com relação ao peridomicílio, cães, cavalos e seus ectoparasitas potencialmente, são responsáveis pela epizootia de casos observados.

3.3 Frequência Mínima de Vetores Infectados (FMVI)

As FMVI foram calculadas a partir dos resultados de PCR e determinadas por município, para cada espécie de vetor encontrada (Tabela 9).

Tabela 9 – Frequência mínima de vetores infectados com riquetsias (%) para cada espécie de artrópodes analisados e por município do estado do Rio de Janeiro, no período de outubro de 2008 a novembro de 2009

LOCALIDADE VETOR	NOROESTE FLUMINENSE		SERRANA		MÉDIO PARAÍBA			TOTAL
	PO	IP	TM	RP	BP	PI	VR	
<i>Amblyomma cajennense</i>	0,43	0,42	0,22	1,90	4,35	0	0	0,41
<i>Amblyomma aureolatum</i>	-	-	0	-	-	0	-	0
<i>Amblyomma dubitatum</i>	50,00	-	-	-	-	-	-	50,00
<i>Anocentor nitens</i>	-	-	0	-	0	-	-	0
<i>Boophilus microplus</i>	-	-	-	9,09	-	-	-	9,09
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	-	0	-	-	-	0	0	0
<i>Ctenocephalides canis</i>	-	-	100,00	-	-	-	-	100,00
<i>Ctenocephalides felis</i>	33,33	-	1,05	0	0	11,76	10,00	3,50

PO: Porciúncula; IP: Itaperuna; TM: Trajano de Moraes; RP: São José do Vale do Rio Preto; BP: Barra do Pirai; PI: Pirai; VR: Volta Redonda; -: Ausente; FONTE: MOURA, N. O., 2011.

Os espécimes de *A. cajennense* apresentaram valor de FMVI de 0,41%. Em estudo anterior realizado para o estado do Rio de Janeiro, a frequência demonstrada foi de 7,15% (GEHRKE, 2010). Da mesma forma, as frequências de 9,2 e 27% foram demonstradas para o estado de Rondônia (GEHRKE, 2002; LABRUNA et al., 2004c) e de 1,28% para o estado de Minas Gerais (GUEDES et al., 2005). Apesar de, neste estudo, o valor da FMVI de *A. cajennense*, ser relativamente baixo, o hábito alimentar eclético destes carrapatos, sua capacidade de transmissão de riquetsias para sua prole (comprovação laboratorial), bem como o diagnóstico de *R. rickettsii* nestes carrapatos, realizado anteriormente para o Rio de Janeiro (GEHRKE, 2010), sugere que esta espécie possui papel importante no ciclo de riquetsias nos municípios presentemente investigados.

O valor da FMVI apresentada para a espécie *A. dubitatum* foi de 50%. Anteriormente estudo, realizado no estado de São Paulo, apontou frequência de 8,7% (HORTA, 2006) para esta espécie. Já a espécie de *B. microplus*, a FMVI foi de 9,09%, este valor é superior ao valor de 3,97% anteriormente indicado para o estado do Rio de Janeiro (GEHRKE, 2010) e de 1,1% relatado para Rondônia (GEHRKE, 2002).

A FMVI obtida para pulgas *C. felis* foi de 3,50%. Em relato anterior, também para o estado do Rio de Janeiro (GEHRKE, 2010), a frequência obtida foi de 14,50 para *R. rickettsii*, além da *R. felis* – comumente registrada nestes sifonápteros. Em São Paulo, já foram demonstradas frequências de 42 e 45,8% em pulgas infectadas com *R. felis* (HORTA, 2006).

A frequência de *C. canis* infectada riquetsias registrada no estado de São Paulo foi de 29,2% (HORTA et al., 2006). No presente estudo apenas um espécime de *C. canis* foi capturado, e teve resultado positivo na PCR, dessa forma a FMVI desta espécie foi de 100%.

A maior parte dos estudos epidemiológicos moleculares nacionais concernentes a FMVI utilizam os resultados da PCR para o gene *gltA* como base para o cálculo da frequência (GEHRKE, 2002; HORTA, 2006; LABRUNA et al., 2004c). Os resultados podem, portanto, representar espécies do gênero *Rickettsia* não pertencentes ao GFM. O presente estudo também incluiu os resultados da PCR realizadas para detecção do gene *ompA*, presente nas RGFM, onde 15 das 16 amostras positivas amplificaram o gene *ompA*. Dessa forma, as FMVI presentemente calculadas expressam, com maior probabilidade, a presença de riquetsias potencialmente patogênicas.

3.4 Análise das sequências

Foi possível sequenciar fragmento do gene *gltA* de 11 amostras diferentes, procedentes dos municípios investigados, correspondendo a 73,33% das amostras positivas pela PCR para este gene. Como foram utilizados dois oligonucleotídeos para este gene, no total, foram obtidas 15 sequências. Já o fragmento do gene *OmpA*, foi possível ser sequenciado a partir de 6 amostras, que correspondem a 37,50% das amostras positivas para este gene. Sobre as amostras clonadas, foram utilizadas sequências de pelo menos três clones.

Sequências do gene *gltA* de riquetsias, detectadas em cinco amostras de carrapatos e duas de pulgas, apresentaram 99% ou 100% de identidade com *R. rickettsii* das cepas Iowa (CP000766.2), Sheila Smith (CP000848.1), Bitterroot (U59729.1), 1994CO2 (DQ150686.1), 1991CO3 (DQ150683.1), 1989CO1 (DQ150680.1), disponíveis no GenBank. Ainda para esse gene, riquetsias detectadas em quatro amostras de pulgas (uma para os dois oligonucleotídeos – CS2 e CS4), apresentaram identidade de 99 ou 100% com *R. felis* das cepas URRWXC12 (CP000053.1) e California 2 (AF210692.1). Da mesma forma, riquetsia detectada em uma amostra de carrapato (para os dois oligonucleotídeos – CS2 e CS4) apresentou 99% de identidade com *R. bellii* RML369-C (CP000087.1) e 369L42-1 (U59716.1) (Tabela 10).

Larvas não alimentadas e infectadas pela riquetsia indicam, em campo, a transmissão transovariana da bactéria na população de *A. cajennense* (amostra 2932B, Tabela 10).

Tabela 10 – Espécies de riquetsias detectadas por análise de sequências de nucleotídeos de fragmento do gene *gltA* (CS2 e CS4) em potenciais vetores coletados em hospedeiro e em vida livre, nos municípios investigados para Febre Maculosa Brasileira, no estado do Rio de Janeiro, no período de outubro de 2008 a novembro de 2009

LOCAL	HOSPEDEIRO	VETOR			
		ESPÉCIE	AMOSTRA	OLIGO	IDENTIDADE
IP	Livre no ambiente	<i>A. cajennense</i>	2932B (22L)	CS2	<i>R. rickettsii</i> 342/343 (99%)*
RP	<i>Equus caballus</i>	<i>A. cajennense</i>	2988A (1M)	CS2	<i>R. rickettsii</i> 375/376 (99%)*
RP	<i>Equus caballus</i>	<i>A. cajennense</i>	2988B (1F)	CS2	<i>R. rickettsii</i> 377/378 (99%)*
RP	<i>Bos taurus</i>	<i>B. microplus</i>	2989A (2F)	CS2	<i>R. rickettsii</i> 377/378 (99%)*
TM	<i>Canis familiaris</i>	<i>C. canis</i>	178 clo (1F)	CS2	<i>R. rickettsii</i> 400/401 (99%)*
TM	<i>Canis familiaris</i>	<i>A. cajennense</i>	2813 (2N)	CS2	<i>R. rickettsii</i> 380/381 (99%)*
VR	<i>Canis familiaris</i>	<i>C. felis</i>	078 (2F)	CS2	<i>R. rickettsii</i> 400/401 (99%)*
PI	<i>Canis familiaris</i>	<i>C. felis</i>	181A (1F)	CS2	<i>R. felis</i> 397/401 (99%)**
PI	<i>Felis catus</i>	<i>C. felis</i>	182B (5F)	CS2	<i>R. felis</i> 345/345 (100%)**
PI	<i>Felis catus</i>	<i>C. felis</i>	182B (5F)	CS4	<i>R. felis</i> 835/836 (99%)**
PO	Livre no ambiente	<i>C. felis</i>	077 (2F)	CS2	<i>R. felis</i> 383/384 (99%)**
VR	<i>Canis familiaris</i>	<i>C. felis</i>	078 (2F)	CS4	<i>R. felis</i> 818/818 (100%)**
PO	Livre no ambiente	<i>A. dubitatum</i>	2937Aclo (1F)	CS2	<i>R. bellii</i> 387/392 (99%)**
PO	Livre no ambiente	<i>A. dubitatum</i>	2937A (1F)	CS4	<i>R. bellii</i> 818/821 (99%)**

OLIGO: Oligonucleotídeo; IP: Itaperuna; PI: Pirai; PO: Porciúncula; RP: São José do Vale do Rio Preto; TM: Trajano de Moraes; VR: Volta Redonda; F: Fêmea; L: larva; M: Macho; N: Ninfia; *Identidade com sequências de *Rickettsia rickettsii* depositadas no GenBank cepas: Iowa (CP000766.2), Sheila Smith (CP000848.1), Bitterroot (U59729.1), 1994CO2 (DQ150686.1), 1991CO3 (DQ150683.1), 1989CO1 (DQ150680.1); **Identidade com sequências de *Rickettsia felis* depositadas no GenBank cepas: URRWXC2 (CP000053.1) e California 2 (AF210692.1); ***Identidade com sequências de *Rickettsia bellii* depositadas no GenBank cepas: RML369-C (CP000087.1) e 369L42-1 (U59716.1). FONTE: MOURA, N. O., 2011.

Já as sequências do gene *OmpA*, de três amostras detectadas em pulgas, apresentaram 99 ou 100% de identidade, com *R. felis* LSU-Lb (HM636635.1), Seropedica (FJ425917.1), ompA (EU012496.1), (DQ408668.1), (AY727036.1), (AJ563398.1), (AF191026.1), scc50 (DQ102710.1), URRWXC2 (CP000053.1) e *Rickettsia* sp. Io123 (AB114821.1), Hf187 (AB114814.1), California 2 (AF210694.1); outras três sequências de riquetsias detectadas em carrapatos apresentaram 99 ou 100% de identidade com as sequências *R. rickettsii* Iowa (CP000766.2), Sheila Smith (CP000848.1), ai103.2 (GU723479.1), ai101.2 (GU723478.1); Panama-2004 (DQ164838.1), Case 1(JF912515.1), R1286N (HM195101.1), 0506-2G12 (HM446487.1), 0506-1F3 (HM446486.1), ARV5606 (GU117905.1), LHR_BR (FJ959382.1), Do295 (EU109179.1), *OmpA* (DQ002504.1), 1995HO2 (DQ150693.1), 1991HO1 (DQ150690.1), 1994CO2 (DQ150687.1), 1991CO3 (DQ150684.1), 1989CO1 (DQ150681.1), *rOmpA* (U43804.1), disponíveis no GenBank (Tabela 11).

Tabela 11 – Identificação de riquetsias detectadas por análise de sequências de nucleotídeos de fragmento do gene *OmpA*

LOCAL	HOSPEDEIRO	VETOR		
		ESPÉCIE	AMOSTRA	IDENTIDADE
PI	<i>Felis catus</i>	<i>Ctenocephalides felis</i>	182B (5F)	<i>Rickettsia felis</i> 418/418 (100%)*
PO	Livre no ambiente	<i>Ctenocephalides felis</i>	077 (2F)	<i>Rickettsia felis</i> 396/396 (100%)*
TM	<i>Canis familiaris</i>	<i>Ctenocephalides canis</i>	178 (1F)	<i>Rickettsia felis</i> 391/392 (99%)*
PO	Livre no ambiente	<i>Amblyomma cajennense</i>	2936A (1N)	<i>Rickettsia rickettsii</i> 239/239 (100%)*
PO	Livre no ambiente	<i>Amblyomma dubitatum</i>	2937A (1F)	<i>Rickettsia rickettsii</i> 376/376 (100%)*
RP	<i>Equus caballus</i>	<i>Amblyomma cajennense</i>	2988B (1F)	<i>Rickettsia rickettsii</i> 405/408(99%)*

PI: Piraí; PO: Porciúncula; RP: São José do Vale do Rio Preto; TM: Trajano de Moraes; F: Fêmea; N: Ninfa; *Identidade com sequências de *Rickettsia felis* depositadas no GenBank cepas: LSU-Lb (HM636635.1), Seropedica (FJ425917.1), ompA (EU012496.1), (DQ408668.1), (AY727036.1), (AJ563398.1), (AF191026.1), scc50 (DQ102710.1), URRWXC2 (CP000053.1) e *Rickettsia* sp. Io123 (AB114821.1), Hf187 (AB114814.1), California 2 (AF210694.1); **Identidade com sequências de *Rickettsia rickettsii* depositadas no GenBank cepas: Iowa (CP000766.2), Sheila Smith (CP000848.1), ai103.2 (GU723479.1), ai101.2 (GU723478.1); *** Identidade com sequências de *Rickettsia rickettsii* descritas em **, em adição a: Panama-2004 (DQ164838.1), Case 1(JF912515.1), R1286N (HM195101.1), 0506-2G12 (HM446487.1), 0506-1F3 (HM446486.1), ARV5606 (GU117905.1), LHR_BR (FJ959382.1), Do295 (EU109179.1), *OmpA* (DQ002504.1), 1995HO2 (DQ150693.1), 1991HO1 (DQ150690.1), 1994CO2 (DQ150687.1), 1991CO3 (DQ150684.1), 1989CO1 (DQ150681.1), *rOmpA* (U43804.1). FONTE: MOURA, N. O., 2011.

Apenas a obtenção de sequências com valores de 99 e 100% de identidade com espécies do gênero *Rickettsia*, para os dois genes analisados, não caracteriza a espécie da bactéria encontrada, entretanto constitui um indicativo potencial da presença da espécie de *Rickettsia* no artrópode.

A infecção de pulgas *C. felis* por *R. rickettsii* foi recentemente notificada (GEHRKE et al., 2011a,b), mas o real valor epidemiológico deste tipo de inseto no ciclo da FMB merece ser mais bem investigado. A infecção por *R. felis* é mantida por transmissão transovariana, sem necessidade de um reservatório vertebrado, o que pode justificar a alta incidência dessas bactérias nesses vetores (WEDINCAMP; FOIL, 2002). Além disso, as infecções por *R. felis* não são letais para seus vetores naturais, diferente do que acontece com a *R. prowazekii* em piolhos (AZAD et al., 1997) e a *R. rickettsii* em carrapatos (NIEBYLSKI; PEACOCK; SCHWAN, 1999).

Riquetsias do GFM já foram detectadas em *A. dubitatum*, no estado de São Paulo (LEMONS; MELLES; COLOMBO, 1996). Além disso, sequências de *R. bellii*, *Rickettsia* GFM denominada COOPERI e *Rickettsia tamurae* em carrapatos *A. dubitatum* já foram registradas em estudo realizado em áreas endêmicas para FMB no estado de São Paulo

(ESTRADA et al., 2006; GUEDES, 2009; HORTA, 2006; LABRUNA et al., 2004b; PACHECO, 2007). Os resultados do presente estudo constituem o primeiro relato de sequência com 99% de identidade com *R. bellii* em *A. dubitatum* no estado do Rio de Janeiro, e de sequência com 100% de identidade com *R. rickettsii* neste carrapato, para o Brasil. Em áreas endêmicas para FMB no Estado de São Paulo, as capivaras exercem o potencial papel de reservatórios naturais de *R. rickettsii* (LABRUNA et al., 2004b). A maior parte dos casos de FMB nestas áreas está associada ao aumento populacional das capivaras, que são os hospedeiros primários de *A. dubitatum*.

Da mesma forma, Horta et al. (2006) também indicaram a presença de *R. felis* em pulga *C. canis*, no estado de São Paulo. Assim, os resultados obtidos nas análises desta espécie de pulga, indicam pela primeira vez sequências de 99% de identidade com *R. felis*, para o estado do Rio de Janeiro, e sequência de 99% de identidade com *R. rickettsii* em *C. canis* para o Brasil.

3.5 Análise filogenética

A análise dos alinhamentos demonstrados nos Anexos A e B, processados no programa “Boxshade” para melhor visualização, evidencia a elevada identidade entre as sequências relativas às amostras 2988A, 2989A, 178(clone), 2988B, 2813, 2932B e 078 (Identidade A – Anexo A), e às amostras 182B, 077 e 181A (Identidade B – Anexo B), obtidas utilizando o oligonucleotídeo CS2 (*gltA*).

Para análise das sequências do *gltA* (CS2 – 401pb) de *Rickettsia* sp., foram empregadas as sequências de *R. africae* (U59733), *R. sibirica* (U59734), *R. parkeri* (U59732), *R. japonica* (U59724), *R. slovacica* (U59725), *R. aeschlimannii* (DQ235776), *R. conorii* (U59730), *R. peacockii* (DQ100162), *R. rhipicephali* (U59721), *R. massiliae* (U59719), *R. rickettsii* (CP000848), *R. monacensis* (DQ100163), *R. felis* (CP000053), *R. australis* (U59718), *R. akari* (U59717), *R. prowazekii* (U59715), *R. typhi* (U59714) e *R. bellii* (U59716), disponíveis no banco de dados do GenBank. Como grupo externo foi incluída a sequência do *gltA* de *Coxiella burnetii* (NC009727) e *Anaplasma marginale* (CP001079) (Figura 3).

Análises realizadas por máxima parcimônia apresentaram árvores filogenéticas com topologias semelhantes (dados não mostrados), dessa forma são demonstrados, neste estudo, os filodendogramas analisados por *Neighbor Joining*.

Figura 3 – Filodendograma da comparação das sequências parciais do gene *gltA* (CS2 – 401pb), utilizando o método *Neighbor-Joining* e distâncias evolutivas determinadas pelo algoritmo Kimura 2 parâmetros

Os valores de *bootstrap* superiores a 70% estão demonstrados. FONTE: MOURA, N. O., 2011.

O alinhamento demonstrado no Anexo C, processado no programa “Boxshade” para melhor visualização, evidencia a elevada identidade entre as sequências relativas às amostras 182B e 078 (Identidade D) obtidas utilizando o oligonucleotídeo CS4 (*gltA*).

Para análise das sequências do *gltA* (CS4 – 834pb) de *Rickettsia* sp., foram empregadas as sequências de *R. africae* (U59733), *R. sibirica* (U59734), *R. parkeri* (U59732), *R. japonica* (U59724), *R. slovacae* (U59725), *R. aeschlimannii* (DQ235776), *R. conorii* (U59730), *R. peacockii* (DQ100162), *R. rhipicephali* (U59721), *R. massiliae* (U59719), *R. rickettsii* (CP000848), *R. monacensis* (DQ100163), *R. felis* (CP000053), *R. australis* (U59718), *R. akari* (U59717), *R. prowazekii* (U59715), *R. typhi* (U59714) e *R. bellii* (U59716), disponíveis no banco de dados do GenBank. Como grupo externo foi incluída a sequência do *gltA* de *Coxiella burnetii* (NC009727) e *Anaplasma marginale* (CP001079) (Figura 4).

Figura 4 – Filodendograma da comparação das sequências parciais do gene *gltA* (CS4 – 834pb), utilizando o método *Neighbor-Joining* e distâncias evolutivas determinadas pelo algoritmo Kimura 2 parâmetros

Os valores de *bootstrap* superiores a 70% estão demonstrados. FONTE: MOURA, N. O., 2011.

Da mesma forma, a análise dos alinhamentos, demonstrados nos Anexos D e E, processado no programa “Boxshade” para melhor visualização, evidencia a elevada identidade entre as sequências relativas às amostras 182B, 178 e 077 (Identidade F – Anexo D), e às amostras 2988B, 2936A e 2937A (Identidade G – Anexo E), obtidas para o gene *ompA*.

Para análise das sequências do *ompA* de *Rickettsia* GFM, foram empregadas as sequências de *R. felis* (DQ408668, AF191026, EU012496, AY727036 e AY394853), *R. massiliae* (U43793), *R. rhipicephali* (U43803), *R. aeschlimannii* (DQ379980), *R. japonica* (U43795), *R. conorii* (U43794), *R. slovacae* (U43808), *R. rickettsii* (U43804), *R. sibirica* (U43807), *R. parkeri* (U43802) e *R. africae* (HQ335137), disponíveis no banco de dados do GenBank. Como grupo externo foi incluída a sequência do *gltA* de *R. akari* (L01461) (Figura 5).

Figura 5 – Filodendograma da comparação das sequências parciais do gene *ompA*, utilizando o método *Neighbor-Joining* e distâncias evolutivas determinadas pelo algoritmo Kimura 2 parâmetros

Os valores de *bootstrap* superiores a 70% estão demonstrados. FONTE: MOURA, N. O., 2011.

A amostra 2937A (*A. dubitatum*, coletado em vida livre no ambiente em Porciúncula) amplificou os três fragmentos dos genes pesquisados (*gltA* e *ompA*). As sequências obtidas em todos os clones analisados para o fragmento de 401pb do gene *gltA* (CS2), apresentaram 99% de identidade com sequências de *R. belli* depositadas no GenBank (Tabela 10). Esta é a única amostra que compõe a “Identidade C”, do filodendograma demonstrado na Figura 3.

Para um melhor entendimento das sequências de riquetsias presentes nessa amostra, foi realizada a análise do fragmento de maior número de pares de bases (834pb do gene *gltA* - CS4), portanto mais informativo, e todas as sequências obtidas dos clones apresentaram 99% de identidade com sequências de *R. bellii* depositadas no GenBank (Tabela 10). Esta é a única amostra que compõe a “Identidade E”, do filodendograma demonstrado na Figura 4.

Curiosamente, as sequências obtidas ao analisar o gene *ompA* de 532pb (que somente as riquetsias do GFM possuem), apresentaram 100% de identidade com sequências de *R.*

rickettsii, depositadas no GenBank (Tabela 11), esta sequência está incluída na “Identidade G” (Anexo E), ver filodendograma *ompA* (Figura 5). Dessa forma, faz-se necessário um estudo mais profundo, utilizando outros genes riquetsiais, para entender essa diferença de posição nos filodendogramas, uma vez que, segundo Burgdorfer et al. (1981), um carrapato infectado por uma espécie de *Rickettsia* torna-se refratário à infecção por uma segunda espécie deste gênero.

Analisando as amostras de pulgas, a mesma duplicidade de diagnóstico específico pôde ser observada com a amostra 178 (*C. canis*, coletado sobre *Canis familiaris* em Trajano de Moraes), que pela PCR, também amplificou os três fragmentos dos genes pesquisados (*gltA* e *ompA*). A sequência obtida com o fragmento de 401pb do gene *gltA* (CS2) apresentou 99% de identidade com sequências de *R. rickettsii* depositadas no GenBank (Tabela 10), esta sequência está incluída no grupo “Identidade A” (Anexo A, Figura 3). Porém, as sequências obtidas ao analisar o gene *ompA* de 532pb apresentaram 99% de identidade com sequências de *R. felis* depositadas no GenBank (Tabela 11), esta sequência está incluída no grupo “Identidade F” (Anexo D, Figura 5).

Da mesma forma, a amostra 078 (*C. felis*, coletado em *Canis familiaris* em Volta Redonda) também amplificou os três fragmentos dos genes pesquisados (*gltA* e *ompA*). As sequências obtidas analisando o fragmento de 401pb do gene *gltA* (CS2) apresentaram 99% de identidade com sequências de *R. rickettsii* depositadas no GenBank (Tabela 10), esta sequência está incluída no grupo “Identidade A” (Anexo A, Figura 3). As sequências obtidas na análise do fragmento de 834pb do gene *gltA* (CS4) apresentaram 100% de identidade com sequências de *R. felis*, depositadas no GenBank (Tabela 10), esta sequência está incluída no grupo “Identidade D” (Anexo C, Figura 4).

Estudos objetivando analisar a interação das pulgas com as riquetsias, bem como a participação desses artrópodes na transmissão dos agentes da FMB, ainda precisam ser realizados, uma vez que existe registro de co-deteção de *R. felis* com uma RGFM, em *Xenopsylla cheopis*, na Indonésia (BARBARA et al., 2010). Os autores deste estudo discutem essa co-deteção, sugerindo que seja resultado de pulga infectada com *R. felis* (agente não patogênico para o sifonaptero), se alimentando em um hospedeiro infectado com RGFM, dessa forma, dois agentes seriam detectados, um presente na pulga e outro no sangue consumido pela *X. cheopis*.

3.6 PCR quantitativa (qPCR)

Como metodologia adicional de detecção de riquetsias em potenciais vetores e com o intuito de avaliar os ensaios da PCR, foram realizados ensaios de qPCR em 231 amostras, totalizando 1483 artrópodes analisados. Dessas amostras, 144 (procedentes dos sete municípios estudados) amplificaram o gene *gltA* para *Rickettsia* sp. Esse resultado, demonstra que a qPCR se mostrou cerca de 10 vezes mais sensível à detecção de riquetsias nas amostras (identificação positiva em 62,33% das amostras analisadas) do que a PCR convencional (detecção de infecção em 5,3% das amostras analisadas) (Anexo F).

Essa diferença entre os percentuais de amostras positivas pela PCR convencional e a qPCR ocorre porque a combinação dos oligonucleotídeos da qPCR e a sonda mostra uma sensibilidade de uma cópia de DNA de riquetsia (LABRUNA et al., 2004b). Convém salientar que os ensaios da qPCR realizaram a investigação do gene *gltA*, dessa forma, as amostras que amplificaram o fragmento deste gene podem demonstrar a presença de organismos do gênero *Rickettsia*, tanto patogênicos como não patogênicos.

4 CONCLUSÕES

A presente investigação sobre genes riquetsiais (*gltA* e *ompA*) em potenciais vetores procedentes de áreas com casos suspeitos ou confirmados de Febre Maculosa, no estado do Rio de Janeiro, permitiu:

- Indicar carrapatos *A. cajennense*, *A. dubitatum* e *B. microplus*, e pulgas *C. canis* e *C. felis* como vetores potencialmente envolvidos no ciclo enzoótico da FMB nas áreas de foco estudadas.
- A detecção de RGFM em *A. cajennense* – carrapato zooantropofílico – nas três regiões investigadas (Serrana, Médio Paraíba e Noroeste Fluminense) sugere sua atuação como principal vetor do ciclo epidêmico da Febre Maculosa Brasileira.
- Constatar valores de FMVI – determinados para maior parte de espécies de ectoparasitas – superiores no estado do Rio de Janeiro em relação a outros trabalhos realizados no Brasil.
- Diagnosticar sequências com 99% de identidade com *R. rickettsii* em *B. microplus* e em *C. felis* e, ainda, sequências com 99 e 100% de identidade com *R. rickettsii* em *A. cajennense* nas regiões estudadas, indicando a participação destas espécies no ciclo peridomiciliar da riquetsia.
- Demonstrar pela primeira vez a presença de sequência com 99% de identidade com *R. bellii* em *A. dubitatum* no estado do Rio de Janeiro, e de sequência com 100% de identidade com *R. rickettsii* neste carrapato, para o Brasil.
- Demonstrar pela primeira vez a presença de sequências de 99% de identidade com *R. felis* em *C. canis* para o estado do Rio de Janeiro, e sequências de 99% de identidade com *R. rickettsii* nesta espécie de pulga para o Brasil.
- Registrar, pela primeira vez, a ocorrência de riquetsias nos municípios São José do Vale do Rio Preto, Trajano de Moraes, Volta Redonda, Porciúncula e Itaperuna, demonstrando a ampla distribuição geográfica destes agentes no estado do Rio de Janeiro.

REFERÊNCIAS*

- ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR- based techniques. **Nucl. Acids. Res.**, v. 25, n. 22, p. 4692-4693, 1997.
- AZAD, A. F.; BEARD, C. B. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. **Emer. Infect. Dis.**, v. 4, n. 2, p. 179-186, 1998.
- AZAD, A. F.; RADULOVIC, S.; HIGGINS, J. A.; NODEN, B. H.; TROYER, J. M. Flea-borne rickettsioses: ecologic considerations. **Emerg. Infect. Dis.**, v.3, n.3, p.319-327. 1997.
- BARBARA, K. A.; FARZELI, A.; IBRAHIM, I. N.; ANTONJAYA, U.; YUNianto, A.; WINOTO, I.; ESTER, PERWITASARI, D.; WIDJAYA, S.; RICHARDS, A. L.; WILLIAMS, M.; BLAIR, P. J. Rickettsial Infections of Fleas Collected from Small Mammals on Four Islands in Indonesia. **J. Med. Entomol.**, v. 47, n. 6, p. 1173-1178. 2010.
- BROUQUI, P.; BACELLAR, F.; BARANTON, G.; BIRTLES, R. J.; BJOERSDORFF, A.; BLANCO, J. R.; CARUSO, G.; CINCO, M.; FOURNIER, P. E.; FRANCAVILLA, E.; JENSENIUS, M.; KAZAR, J.; LAFERL, H.; LAKOS, A.; LOTRIC-FURLAN, S.; MAURIN, M.; OTEO, J. A.; PAROLA, P.; PEREZ-EID, C.; PETER, O.; POSTIC, D.; RAOULT, D.; TELLEZ, A.; TSELENTIS, Y.; WILSKE, B. Guideline for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 10, n. 12, p. 1108-1132, 2004.
- BURGDORFER, W.; HAYES, S. F.; MAVROS, A. J. Nonpathogenic rickettsiae in *Dermacentor andersoni*: a limiting factor for the distribution of *Rickettsia rickettsii*. In: BURGDORFER, W.; ANACKER, R. L. (eds). **Rickettsiae and rickettsial diseases**, New York: Academic Press Inc. 1981. p. 585-594.
- BURKET, C.T.; VANN, C. N.; PINGER, R. R.; CHATOT, C. L.; STEINER, F. E. Minimum infection rate of *Ambylomma americanum* (Acari: Ixodidae) by *Ehrlichia chaffeensis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) in southern Indiana. **J. Med. Entomol.**, v. 35, n. 5, p. 653-659, 1998.
- CARDOSO, L. D.; FREITAS, R. N.; MAFRA, C. L.; NEVES, C. V. B.; FIGUEIRA, F. C. B.; LABRUNA, M. B.; GENNARI, S. M.; WALKER, D. H.; GALVÃO, M. A. M. Caracterização de *Rickettsia* spp. circulante em foco silencioso de febre maculosa brasileira no Município de Caratinga, Minas Gerais, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 22, n. 3, p. 495-501, 2006.
- DIAS, E.; MARTINS, A. V. Spotted fever in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 19, n. 2, p. 103-108, 1939.
- DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*,

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 51, n. 6, p. 2145 – 2165. 2001.

EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE. **European Molecular Biology Laboratory (EMBL)**. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>>. Acesso em: 06 mai. 2011.

EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY – EMBnet. **BOXSHADE** – Multiple alignments designer. Disponível em: <http://www.ch.embnnet.org/software/BOX_form.html>. Acesso em: 06 mai. 2011.

EREMEEVA, M.; DASCH, G. A. Rickettsiae. In: Lederberg, J. (ed.). **Encycl. Microbiol.** 2^a ed. New York: Academic Press, 2000. v. 4, p. 140-180.

ESTRADA, D. A.; SCHUMAKER, T. T.; SOUZA, C. E.; RODRIGUES-NETO, E. J.; LINHARES, A. X. Rickettsiae detection in *Amblyomma* ticks (Acari: Ixodidae) collected in the urban area of Campinas City, SP. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39, n. 1, p. 68-71, 2006.

GALVÃO, M. A. M.; SILVA, L. J.; NASCIMENTO, E. M. M.; CALIC, S. B.; SOUSA, R.; BACELLAR, F. Riquetsioses no Brasil e Portugal: ocorrência, distribuição e diagnóstico. **Rev. Saúde Pública**, v. 39, n. 5, p. 850-856, 2005.

GAZÊTA, G. S.; SOUZA, E. R.; ABOUD-DUTRA, A. E.; AMORIM, M.; BARBOSA, P. R.; ALMEIDA, A. B.; GOMES, V.; GEHRKE, F. S.; MARRELLI, M. T.; SCHUMAKER, T. T. S. Potential vectors and hosts of *Rickettsia* spp: epidemiological studies in the Vale do Paraíba, state of Rio de Janeiro/Brazil. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 15, n.2, p.269-270, 2009.

GEHRKE, F. S. **Estudo da prevalência de *Borrelia* spp, *Ehrlichia* spp e *Rickettsia* spp em carrapatos coletados no estado de Rondônia, Amazônia Ocidental**. 2002. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

GEHRKE, F. S. **Deteção e caracterização molecular de riquetsias em humanos, potenciais vetores e animais domésticos da região sudeste do Brasil**. 2010. 100 f. Tese (Doutorado em Ciências – Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

GEHRKE, F. S.; GAZETA, G. S.; RODRIGUES, E. S.; MARRELLI, M. T.; SCHUMAKER, T. T. S. Co-infestation of ectoparasites infected by *Rickettsia rickettsii* in dogs and horses in the state of Rio de Janeiro, Brazil. In: **6th International Meeting on Rickettsiae and Rickettsial diseases**, Heraklion, Creta, Grécia. 2011b.

GEHRKE, F. S.; GAZETA, G. S.; RODRIGUES, E. S.; MARRELLI, M. T.; SCHUMAKER, T. T. S. First detection of *Rickettsia rickettsii* in horses and dogs in a Brazilian spotted fever focus in the State of Rio de Janeiro, Brazil. In: **6th International Meeting on Rickettsiae and Rickettsial diseases**, Heraklion, Creta, Grécia. 2011a.

GEHRKE, F. S.; GAZETA, G. S.; SOUZA, E. R.; RIBEIRO, A.; MARRELLI, M. T.; SCHUMAKER, T. T. S. *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia felis* and, *Rickettsia* sp TwKM03 infecting *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis* collected from dogs in a Brazilian Spotted Fever focus in the state of Rio de Janeiro/Brazil. **Clin. Microbiol. Infect Dis.**, v. 15, n. 2, 267-268, 2009.

GOODMAN, J. L.; DENIS, D. T.; SONENSHINE, D. E. **Tick-Borne Diseases of Humans**. Washington DC: ASM Press, 2005. 418p.

GUEDES, E. **Estudo de populações de *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae) e pesquisa de *Rickettsia* spp. nestas espécies em Coronel Pacheco, Minas Gerais**. 2009. 69 f. Tese (doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais. 2009.

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

HORTA, M. C. **Pesquisa de Infecção por Riquetsias do Grupo 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. 72 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

HORTA, M. C. **Estudo epidemiológico de *Rickettsia felis* em áreas endêmicas e não-endêmicas para febre maculosa no Estado de São Paulo**. 2006. 106 f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

HORTA, M. C.; CHIEBAO, D. P.; DE SOUZA, D. B.; FERREIRA, F.; PINHEIRO, S. R.; LABRUNA, M. B.; SCHUMAKER, T. T. Prevalence of *Rickettsia felis* in the Fleas *Ctenocephalides felis felis* and *Ctenocephalides canis* from Two Indian Villages in São Paulo Municipality, Brazil. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1078, p. 361–363, 2006.

LABRUNA, M. B.; MCBRIDE, J. W.; BOUYER, D. H.; CAMARGO, L. M. A.; CAMARGO, E. P.; WALKER D. H. Molecular evidence for a spotted fever group *Rickettsia* species in the tick *Amblyomma longirostre* in Brazil. **J. Med. Entomol.**, v.41, n. 3, p. 533-537, 2004a.

LABRUNA, M. B.; PACHECO, R. C.; RICHTZENHAIN, L. J.; SZABÓ, M. P. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* from *Haemaphysalis juxtakochi* ticks in the state of São Paulo, Brazil. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, n.3, p.869-873, 2007.

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M. C.; BOUYER, D. H.; MCBRIDE, J. W.; PINTER, A.; POPOV, V.; GENNARI, S. M.; WALKER, D. H. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. **J. Clin. Microbiol.**, v.42, n.1, p. 90-98, 2004b.

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; BOUYER, D. H.; MCBRIDE, J.; CAMARGO, L. M.; CAMARGO, E. P.; POPOV, V.; WALKER, D. H. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the State of Rondônia, Western Amazon, Brazil. **J. Med. Entomol.**, v41, n.6, p. 1073-1081, 2004c.

LAMAS C, FAVACHO A, ROZENTAL T, BÓIA MN, KIRSTEN AH, GUTERRES A, BARREIRA J, DE LEMOS ER. Characterization of *Rickettsia rickettsii* in a case of fatal Brazilian spotted fever in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 12, n. 2, p. 149-151. 2008.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. ClustalW and ClustalX version 2. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948. 2007.

LEMOS, E.R.S.; MELLES, H.H.B.; COLOMBO, S. et al. Primary isolation of spotted fever group rickettsiae from *Amblyomma cooperi* collected from *Hydrochoerus hydrochoeris* in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.91, n.3, p.273 – 275, 1996.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Febre Maculosa**. Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php>>. Acesso em 16 fev. 2010a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Febre Maculosa**. Situação Epidemiológica da doença no Brasil. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1555> Acesso em 16 fev. 2010b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Vigilância Epidemiológico**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/_arquivos/pdf/febremaculosa_gve.pdf>. Acesso em 16 fev. 2010c.

MONTEIRO, J. L.; FONSECA, F. Typho exanthemático de São Paulo. XI. Novas experiências sobre a transmissão experimental por carrapatos (*Boophilus microplus* e *Amblyomma cajennense*). **Mem. Inst. Butantan**, v. 7, p. 33-40, 1932.

MOURA, N. O.; SALAZAR, J. S.; AMORIM, M.; GEHRKE, F. S.; SCHUMAKER, T. T. S.; GAZÊTA, G.S. Riquetsias em *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), no estado do Rio de Janeiro. In: **III Congresso Nacional de Saúde Pública e I Encontro Internacional de Saúde Pública Veterinária**, 2009, Bonito – MS, Brasil.

NACIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **BLAST Assembled RefSeq Genomes**. Nucleotide Blast. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 06 mai. 2011.

NASCIMENTO, E. M. M. **Isolamento e detecção molecular de riquetsias do Grupo Febre Maculosa, a partir de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) e espécimes biológicos humanos, provenientes de áreas endêmicas do Estado de São Paulo**. 2003. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2003.

NASCIMENTO, E. M.; GEHRKE, F. DE S.; MALDONADO, R. A.; COLOMBO, S.; SILVA, L. J.; SCHUMAKER, T. T. Detection of Brazilian spotted fever infection by polymerase chain reaction in a patient from the state of São Paulo. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.100, n.3, p.277-279. 2005.

NIEBYLSKI, M. L.; PEACOCK, M. G.; SCHWAN, T. G. Lethal Effect of *Rickettsia rickettsii* on Its Tick Vector (*Dermacentor andersoni*). **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, n. 2, p. 773–778. 1999.

OLIVEIRA, K. A.; OLIVEIRA, L. S.; DIAS, C. C. A.; SILVA JR, A.; ALMEIDA, M. R.; ALMADA, G.; BOUYER, D. H.; GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C. L. Molecular identification of *Rickettsia felis* in ticks and flea from an endemic area for brazilian spotted fever. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 2, p. 191-194, 2008.

OLIVEIRA, R., GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C.; CHAMONE, C.; CALIC, S.; SILVA, S.; WALKER, D. H. *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides* spp. fleas, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, n. 3, p. 317-319, 2002.

PACHECO, R.C. **Pesquisa de *Rickettsia* spp. em carrapatos *Amblyomma dubitatum* Neumann 1899 e *Amblyomma triste* Koch 1844, provenientes do Brasil e Uruguai, respectivamente.** 2007. 51f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada à Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2007.

PADDOCK, C. D.; SUMNER, J. W.; COMER, J. A.; ZAKI, S. R.; GOLSMITH, C. S.; GODDARD, J.; MCLELLAN, S. L. F.; TAMMINGA, C. L.; OHL, C. A. *Rickettsia parkeri*: A newly reconized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. **Clin. Infect. Dis.**, v. 38, n. 6, p. 805-811, 2004.

PAROLA, P.; DAVOUST, B.; RAOULT, D. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. **Vet. Res.**, v. 36, n. 3, p. 469-492, 2005.

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

PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1078, p. 523-529, 2006.

PINTO, M. B. **Soroepidemiologia de riquetsias em *Canis familiaris* na região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.** 2009. 25 f. Monografia Especialização (Entomologia Médica) – Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro. 2009.

RAOULT, D.; LA SCOLA, B.; ENEA, M.; FOURNIER, P. E.; ROUX, V.; FENOLLAR, F.; GALVAO, M. A.; LAMBALLERIE, X. A flea-associated *Rickettsia* pathogenic for humans. **Emerg. Infect. Dis.**, v.7, n.1, p. 73 – 81, 2001.

RAOULT, D.; ROUX, V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 10, n. 4, p. 694-719, 1997.

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

ROUX, V.; RAOULT, D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (OmpB). **Internat. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 50, p. 1449-1455, 2000.

ROUX, V.; RYDKINA, E.; EREMEEVA, M.; RAOULT, D. Citrate Synthase Gene Comparison, a New Tool for Phylogenetic analysis, and its application for the Rickettsiae. **Intern. J. Syst. Bacteriol.**, v. 47, n. 2, p. 252-261, 1997.

ROZENTAL, T.; BUSTAMANTE, M.C.; AMORIM, M.; SERRA-FREIRE, N.M.; LEMOS, E.R. Evidence of spotted fever group rickettsiae in state of Rio de Janeiro, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 44, n. 3, p. 155-158. 2002.

ROZENTAL, T.; EREMEEVA, M. E.; PADDOCK, C. D.; ZAKI, S. R.; DASCH, G. A.; LEMOS, E. R. Fatal case of Brazilian spotted fever confirmed by immunohistochemical staining and sequencing methods on fixed tissues. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1078, p.257 – 259. 2006.

SAMBROOK, J; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE – RJ. **Banco de dados não publicados**. Arquivo em Programa Excel. Acesso em 30 de junho de 2009.

SERRA-FREIRE, N. M. Acari: Os carrapatos. In: REY, L. (ed.). **Parasitologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1991. p. 650-656.

SERRA-FREIRE, N. M. Occurrence of ticks (Acari: Ixodidae) on human hosts, in three municipalities in the State of Pará, Brazil **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 19, n. 3, p. 1-8. 2010.

SERRA-FREIRE, N. M.; SENA, L. M. M.; BORSOI, A. B. P. Parasitismo Humano por Carrapatos na Mata Atlântica, Rio de Janeiro, Brasil. **EntomoBrasilis**, v. 4, n. 2, p. 67-72. 2011.

SILVEIRA, I.; PACHECO, R. C.; SZABÓ, M. P.; RAMOS, H. G.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia parkeri* in Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v.13, n.7, p.1111 – 1113. 2007.

STOTHARD, D. R.; CLARK, J. B.; FUERST, P. A. Ancestral divergence of *Rickettsia bellii* from the spotted fever and typhus groups of Rickettsia and antiquity of the genus *Rickettsia*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 44, n.4, p. 798-804, 1994.

SOUZA, M. S. B. **Aspectos epidemiológicos de potenciais vetores de riquetsias na região Metropolitana do estado do Rio de Janeiro**. 2009. 34 f. Monografia Especialização (Entomologia Médica) – Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro. 2009.

SOUZA, E. R.; GAZÊTA, G. S.; BARBOSA, P. R. A.; GONÇALVES, P. C.; NASCIMENTO, E. M.; SCHUMAKER, T. T. S. Detecção de riquetsias e erlíquias através de PCR em animais domésticos do Município de Valença / RJ. In: **XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia**, 2005, Porto Alegre – RS, Brasil. Revista de Patologia Tropical, v. 34.

SOUZA, E. R.; GAZÊTA, G. S.; NASCIMENTO, E. M. M.; BARBOSA, P. R.; SCHUMAKER, T. T. S. Riquetsias em ectoparasitas capturados em localidades com casos humanos fatais de febre maculosa - Petrópolis/RJ. In: **XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & II Simpósio Latino-Americano de rickettsioses**, 2006, Ribeirão Preto – SP, Brasil. Resumo, p. 366.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molec. Biol. Evol.**, v. 28, n.10, p. 2731-2739. 2011.

VIANNA, M. C. B. **Pesquisa de Infecção pó Riquetsias do Grupo Febre Maculosa em Humanos, Cães, Equídeos e em Adultos de Carrapatos *Amblyomma cajennense* em uma área Endêmica do Estado de Minas Gerais**. 2002. 67f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2002.

WEDINCAMP, J. JR; FOIL, L. D. Vertical transmission of *Rickettsia felis* in the cat flea (*Ctenocephalides felis* Bouché). **J. Vector Ecol.**, v. 27, n.1, p. 96 – 101. 2002.

ANEXO A

Figura 1 - Identidade A

```

2989A 1 CGACAGCCGCAAGCATAATAGCCATAGGATGAGAAGAGCTACAAAAGGTCTGAAATAAAT
2932B 1 CGACAGCCGCAAGCATAATAGCCATAGGATGAGAAGAGCTACAAAAGGTCTGAAATAAAT
178 1 CGACAGCCGCAAGCATAATAGCCATAGGATGAGAAGAGCTACAAAAGGTCTGAAATAAAT
2988B 1 CGACAGCCGCAAGCATAATAGCCATAGGATGAGAAGAGCTACAAAAGGTCTGAAATAAAT
2813 1 CGACAGCCGCAAGCATAATAGCCATAGGATGAGAAGAGCTACAAAAGGTCTGAAATAAAT
078 1 CGACAGCCGCAAGCATAATAGCCATAGGATGAGAAGAGCTACAAAAGGTCTGAAATAAAT
2988A 1 CGACAGCCGCAAGCATAATAGCCATAGGATGAGAAGAGCTACAAAAGGTCTGAAATAAAT
*****

2989A 61 AGTGTAACTTTTCATTCACCTAATGAATGATGAGCAACCTGTTTAGTGAAATTATTATACT
2932B 61 AGTGTAACTTTTCATTCACCTAATGAATGATGAGCAACCTGTTTAGTGAAATTATTATACT
178 61 AGTGTAACTTTTCATTCACCTAATGAATGATGAGCAACCTGTTTAGTGAAATTATTATACT
2988B 61 AGTGTAACTTTTCATTCACCTAATGAATGATGAGCAACCTGTTTAGTGAAATTATTATACT
2813 61 AGTGTAACTTTTCATTCACCTAATGAATGATGAGCAACCTGTTTAGTGAAATTATTATACT
078 61 AGTGTAACTTTTCATTCACCTAATGAATGATGAGCAACCTGTTTAGTGAAATTATTATACT
2988A 61 AGTGTAACTTTTCATTCACCTAATGAATGATGAGCAACCTGTTTAGTGAAATTATTATACT
*****

2989A 121 GCTCGCCACTTGGTAGTTCCCCATAAATCAGTAAATATGCCACTTCTAAAAAATCACTTT
2932B 121 GCTCGCCACTTGGTAGTTCCCCATAAATCAGTAAATATGCCACTTCTAAAAAATCACTTT
178 121 GCTCGCCACTTGGTAGTTCCCCATAAATCAGTAAATATGCCACTTCTAAAAAATCACTTT
2988B 121 GCTCGCCACTTGGTAGTTCCCCATAAATCAGTAAATATGCCACTTCTAAAAAATCACTTT
2813 121 GCTCGCCACTTGGTAGTTCCCCATAAATCAGTAAATATGCCACTTCTAAAAAATCACTTT
078 121 GCTCGCCACTTGGTAGTTCCCCATAAATCAGTAAATATGCCACTTCTAAAAAATCACTTT
2988A 121 GCTCGCCACTTGGTAGTTCCCCATAAATCAGTAAATATGCCACTTCTAAAAAATCACTTT
*****

2989A 181 TCTCAGCTAAGTCTTTAATATCATATCCTCGATGCCGCAAGATTCTTTATCACCGTCTA
2932B 181 TCTCAGCTAAGTCTTTAATATCATATCCTCGATGCCGCAAGATTCTTTATCACCGTCTA
178 181 TCTCAGCTAAGTCTTTAATATCATATCCTCGATGCCGCAAGATTCTTTATCACCGTCTA
2988B 181 TCTCAGCTAAGTCTTTAATATCATATCCTCGATGCCGCAAGATTCTTTATCACCGTCTA
2813 181 TCTCAGCTAAGTCTTTAATATCATATCCTCGATGCCGCAAGATTCTTTATCACCGTCTA
078 181 TCTCAGCTAAGTCTTTAATATCATATCCTCGATGCCGCAAGATTCTTTATCACCGTCTA
2988A 181 TCTCAGCTAAGTCTTTAATATCATATCCTCGATGCCGCAAGATTCTTTATCACCGTCTA
*****

2989A 241 TATAGGTGATAGTAGACTGACAAGAAGCAGTAGACATAAAACCCGGGTCGTAAGTAAAGC
2932B 241 TATAGGTGATAGTAGACTGACAAGAAGCAGTAGACATAAAACCCGGGTCGTAAGTAAAGC
178 241 TATAGGTGATAGTAGACTGACAAGAAGCAGTAGACATAAAACCCGGGTCGTAAGTAAAGC
2988B 241 TATAGGTGATAGTAGACTGACAAGAAGCAGTAGACATAAAACCCGGGTCGTAAGTAAAGC
2813 241 TATAGGTGATAGTAGACTGACAAGAAGCAGTAGACATAAAACCCGGGTCGTAAGTAAAGC
078 241 TATAGGTGATAGTAGACTGACAAGAAGCAGTAGACATAAAACCCGGGTCGTAAGTAAAGC
2988A 241 TATAGGTGATAGTAGACTGACAAGAAGCAGTAGACATAAAACCCGGGTCGTAAGTAAAGC
*****

2989A 301 AATCGGCTTCCGCAGATACCCTACTTATATCGATTACATCC
2932B 301 AATCGGCTTCCGCAGATACCCTACTTATATCGATTACATCC
178 301 AATCGGCTTCCGCAGATACCCTACTTATATCGATTACATCC
2988B 301 AATCGGCTTCCGCAGATACCCTACTTATATCGATTACATCC
2813 301 AATCGGCTTCCGCAGATACCCTACTTATATCGATTACATCC
078 301 AATCGGCTTCCGCAGATACCCTACTTATATCGATTACATCC
2988A 301 AATCGGCTTCCGCAGATACCCTACTTATATCGATTACATCC
*****

```

Alinhamento das seqüências de nucleotídeos das amostras 2988A, 2989A, 178(clone), 2988B, 2813, 2932B e 078, obtidas utilizando o oligonucleotídeo CS2 (*gltA*). FONTE: MOURA, N. O., 2011.

ANEXO B

Figura 2 - Identidade B

```

182B      1 ACCAACGGCCGCAAGCATAATAGCCATAGGATGAGAAGAGCTACAAAATGTTTGAAATAA
077      1 ACCAACGGCCGCAAGCATAATAGCCATAGGATGAGAAGAGCTACAAAATGTTTGAAATAA
181A      1 ACCAACGGCCGCAAGCATAATAGCCATAGGATGAGAAGAGCTACAAAATGTTTGAAATAA
          *****

182B      61 ATAGTGTAATCTTTCATTCACTAATGAATGATGAGCAACCTGTTTAGTGAAATTATTATA
077      61 ATAGTGTAATCTTTCATTCACTAATGAATGATGAGCAACCTGTTTAGTGAAATTATTATA
181A      61 ATAGTGTAATCTTTCATTCACTAATGAATGATGAGCAACCTGTTTAGTGagATTATTATA
          *****

182B      121 CTGCTCGATGCTTGGCAATTCTCCGTAGATTAGCAAATATGCCACTTCTAAAAAATCACT
077      121 CTGCTCGATGCTTGGCAATTCTCCGTAGATTAGCAAATATGCCACTTCTAAAAAATCACT
181A      120 CTGCTCGATGCTTGGCAATTCTCCGTAGATTAGCAAATATGCCACTTCTAAAAAATCACT
          *****

182B      181 TTTCTCGGCTAAATCTTTAATGTCATATCCTCGATGTCGCAAGATTCTTTATCACCGTC
077      181 TTTCTCGGCTAAATCTTTAATGTCATATCCTCGATGTCGCAAGATTCTTTATCACCGTC|
181A      180 TTTCTCGGCTAAATCTTTAATGTCATATCCTCGATGTCGCAAGATTCTTTATCACCGTC
          *****

182B      241 TATATAAGTGATAGTAGACTGACAAGAAGCAGTAGACATAAAGCCCCGGGTCATAAGTAAA
077      241 TATATAAGTGATAGTAGACTGACAAGAAGCAGTAGACATAAAGCCCCGGGTCATAAGTAAA
181A      240 TATATAAGTGATAGTAGACTGACAAGAAGCAGTAGACATAAAGCCCCGGGTCATAAGTAAA
          *****

182B      301 ACAATCGGCTTCCGAAGATACCCTGCTTATATCGATTACATCCTC
077      301 ACAATCGGCTTCCGAAGATACCCTGCTTATATCGATTACATCCTC
181A      300 ACAATCGGCTTCCGAAGATACCCTGCTTATATCGATTACATCCTC
          *****

```

Alinhamento das sequências de nucleotídeos das amostras 182B, 077 e 181A, obtidas utilizando o oligonucleotídeo CS2 (*gltA*). FONTE: MOURA, N. O., 2011.

ANEXO C

Figura 3 - Identidade D

```

182B      1 CTATTATGCTTGCGGCCGTTGGTTCCTTTTCGGCATTTTATCCTGATTTACTGAATTTTA
078      1 CTATTATGCTTGCGGCCGTTGGTTCCTTTTCGGCATTTTATCCTGATTTACTGAATTTTA
          *****

182B      61 AAGAAGCAGACTACGAAC TTACCGCTATTAGAATGATTGCTAAGATACCAACTATCGCCG
078      61 AAGAAGCAGACTACGAAC TTACCGCTATTAGAATGATTGCTAAGATACCAACTATCGCCG
          *****

182B      121 CAATGTCCTATAAATATTCTATAGGACAACCGTTTATTTATCCTGATAATTCGTTAGATT
078      121 CAATGTCCTATAAATATTCTATAGGACAACCGTTTATTTATCCTGATAATTCGTTAGATT
          *****

182B      181 TTAAGTAAAATTTTCTGCATATGATGTTTGCAACGCC TTGTACAAAATATAAAGTAAATC
078      181 TTAAGTAAAATTTTCTGCATATGATGTTTGCAACGCC TTGTACAAAATATAAAGTAAATC
          *****

182B      241 CAATAATAAAAAATGCTCTTAATAAAATATTTATTCTGCATGCTGACCATGAGCAGAACG
078      241 CAATAATAAAAAATGCTCTTAATAAAATATTTATTCTGCATGCTGACCATGAGCAGAACG
          *****

182B      301 CTTCTACTTCAACAGTCCGAATTGCCGGCTCATCCGGGGCTAACCC TTTTGCTTGCGTAA
078      301 CTTCTACTTCAACAGTCCGAATTGCCGGCTCATCCGGGGCTAACCC TTTTGCTTGCGTAA
          *****

182B      361 GTACAGGGATTGCCTCACTTTGGGGGCC TGCCACGGCGGGGCTAATGAAGCGGTAATAA
078      361 GTACAGGGATTGCCTCACTTTGGGGGCC TGCCACGGCGGGGCTAATGAAGCGGTAATAA
          *****

182B      421 ATATGCTTAAAGAAATCGGTAGTTCTGAGAATATTCC TAAATATATAGCTAAAGCTAAGG
078      421 ATATGCTTAAAGAAATCGGTAGTTCTGAGAATATTCC TAAATATATAGCTAAAGCTAAGG
          *****

182B      481 ATAAAAATGATCCGTTTAGGCTAATGGGTTTCGGTCATCGTGT TATAAAAACTATGACC
078      481 ATAAAAATGATCCGTTTAGGCTAATGGGTTTCGGTCATCGTGT TATAAAAACTATGACC
          *****

182B      541 CACGTGCCGCAGTACTTAAAGAAAC TTGCAAGAAGTATTAAAGGAAC TC GGACAGCTAG
078      541 CACGTGCCGCAGTACTTAAAGAAAC TTGCAAGAAGTATTAAAGGAAC TC GGACAGCTAG
          *****

182B      601 AAAACAATCCGCTTTTGCAATAGCAATAGAAC TTGAAGCTATCGCTCTTAAAGATGAAT
078      601 AAAACAATCCGCTTTTGCAATAGCAATAGAAC TTGAAGCTATCGCTCTTAAAGATGAAT
          *****

182B      661 ATTTTATTGAGAGAAAATTATATCCAAATGTTGATTTTATT CAGGTATTATCTATAAAG
078      661 ATTTTATTGAGAGAAAATTATATCCAAATGTTGATTTTATT CAGGTATTATCTATAAAG
          *****

182B      721 CTATGGGTATACCGTCGCAAAATGTTTACGGTAC TTTTTCGAATAGCAAGAACC GTAGGCT
078      721 CTATGGGTATACCGTCGCAAAATGTTTACGGTAC TTTTTCGAATAGCAAGAACC GTAGGCT
          *****

182B      781 GGATGGCACAGTGGAAGAAATGCACGAAGACCC TGAA
078      781 GGATGGCACAGTGGAAGAAATGCACGAAGACCC TGAA
          *****

```

Alinhamento das seqüências de nucleotídeos das amostras 182B e 078, obtidas utilizando o oligonucleotídeo CS4 (*gltA*). FONTE: MOURA, N. O., 2011.

ANEXO D

Figura 4 - Identidade F

```

178      1 GCAGCTTGTCACCTTGGAATAACAACGCAGGATTTGCACCGTAGGCTGCAGTACCGGTA
077      1 GCAGCTTGTCACCTTGGAATAACAACGCAGGATTTGCACCGTAGGCTGCAGTACCGGTA
182B     1 GCAGCTTGTCACCTTGGAATAACAACGCAGGATTTGCACCGTAGGCTGCAGTACCGGTA
          *****

178      61 CCTGTAAAGTTAAGGTTAAACCATCATCAATATTAAGTGAAGTTTATTAGCTCCTCCC
077      61 CCTGTAAAGTTAAGGTTAAACCATCATCAATATTAAGTGAAGTTTATTAGCTCCTCCC
182B     61 CCTGTAAAGTTAAGGTTAAACCATCATCAATATTAAGTGAAGTTTATTAGCTCCTCCC
          *****

178      121 GTATCTACCACTGAACCTAATGAAATATCACAGTTACTGAAAAAGACCTGCTGCAAAA
077      121 GTATCTACCACTGAACCTAATGAAATATCACAGTTACTGAAAAAGACCTGCTGCAAAA
182B     121 GTATCTACCACTGAACCTAATGAAATATCACAGTTACTGAAAAAGACCTGCTGCAAAA
          *****

178      181 TTATTTAAATCTAATGCACGAACACTTACGTCAGCATCAGTAACCGTAAAAGCACCGGTA
077      181 TTATTTAAATCTAATGCACGAACACTTACGTCAGCATCAGTAACCGTAAAAGCACCGGTA
182B     181 TTATTTAAATCTAATGCACGAACACTTACGTCAGCATCAGTAACCGTAAAAGCACCGGTA
          *****

178      241 TATTGTAAAGTAGAACCCGCTACAAAAGCACCGGCTCCAGGACCTATATTTGTTCCGGCT
077      241 TATTGTAAAGTAGAACCCGCTACAAAAGCACCGGCTCCAGGACCTATATTTGTTCCGGCT
182B     241 TATTGTAAAGTAGAACCCGCTACAAAAGCACCGGCTCCAGGACCTATATTTGTTCCGGCT
          *****

178      301 GCAAGCTCTGCACCATCAGCAGTTACGGTTCCTTGAGCAGCAAGGACTCCACTACCGGTT
077      301 GCAAGCTCTGCACCATCAGCAGTTACGGTTCCTTGAGCAGCAAGGACTCCACTACCGGTT
182B     301 GCAAGCTCTGCACCATCAGCAGTTACGGTTCCTTGAGCAGCAAGGACTCCACTACCGGTT
          *****

178      361 AGCATTATCGCTGCG
077      361 AGCATTATCGCTGCG
182B     361 AGCATTATCGCTGCG
          *****

```

Alinhamento das seqüências de nucleotídeos das amostras 182B, 178 e 077, obtidas para o gene *ompA*. FONTE: MOURA, N. O., 2011.

ANEXO E

Figura 5 – Identidade G

2937A	1	GCAGGGGTAGCTAATGGTACTCCTGCTGGCGGTCC TCAAACAATTGGGCATTTACTTAC
2936A	1	GCAGGGGTAGCTAATGGTACTCCTGCTGGCGGTCC TCAAACAATTGGGCATTTACTTAC
2988B	1	GCAGGGGTAGCTAATGGTACTCCTGCTGGCGGTCC TCAAACAATTGGGCATTTACTTAC
		*****
2937A	61	GGTGGTGATTATACTGTCAC TGCAGATGCAGCCGATCGTATTATTAAGGC TATAAATGTT
2936A	61	GGTGGTGATTATACTGTCAC TGCAGATGCAGCCGATCGTATTATTAAGGC TATAAATGTT
2988B	61	GGTGGTGATTATACTGTCAC TGCAGATGCAGCCGATCGTATTATTAAGGC TATAAATGTT
		*****
2937A	121	GCGGGTACTACTCCC GTAGGTC TAAATATTACTCAAATACTGTCGTTGGTTCGATTATA
2936A	121	GCGGGTACTACTCCC GTAGGTC TAAATATTACTCAAATACTGTCGTTGGTTCGATTATA
2988B	121	GCGGGTACTACTCCC GTAGGTC TAAATATTACTCAAATACTGTCGTTGGTTCGATTATA
		*****
2937A	181	ACGAAAGGTAAC TTGTTGCC TGTTACTCTTAATGCCGGC
2936A	181	ACGAAAGGTAAC TTGTTGCC TGTTACTCTTAATGCCGGC
2988B	181	ACGAAAGGTAAC TTGTTGCC TGTTACTCTTAATGCCGGC
		*****

Alinhamento das seqüências de nucleotídeos das amostras 2988B, 2936A e 2937A, obtidas para o gene *ompA*. FONTE: MOURA, N. O., 2011.

ANEXO F

Tabela 1 – Pesquisa de genes riquetsiais (pela Reação em Cadeia da Polimerase – PCR) em potenciais vetores investigados para Febre Maculosa Brasileira, no município de Trajano de Moraes do estado do Rio de Janeiro, no período de outubro de 2008 a novembro de 2009

HOSPEDEIRO	VETOR						
	ESPÉCIE	COD. AMOSTRA	SEXO/ESTÁDIO	<i>gltA</i> *	<i>gltA</i> **	<i>ompA</i>	qPCR
<i>Canis familiaris</i>	<i>Amblyomma cajennense</i>	2814A	1F	-	-	-	+
		2814B	15N	-	-	-	+
		2817A	1F	-	-	-	+
		2817B	2N	-	-	-	+
		2828	8N	-	-	-	+
		2815A	10N	-	-	-	+
		2815B	1F	-	-	-	NA
		2819	5N	-	-	-	-
		2822	11N	-	-	-	+
		2821	13N	-	-	-	-
		2830	8N	-	-	-	-
		2813	1N	+	-	+	Ø
		2829	6N	-	-	-	-
		2816	13N	-	-	-	-
		2820	19N	-	-	+	Ø
		2818	6N	-	-	-	+
		2823	1M	-	-	-	-
		3120A	5N	-	-	-	+
		3120B	6N	-	-	-	+
		3120C	5N	-	-	-	+
		3120D	6N	-	-	-	+
Livre no ambiente	<i>Amblyomma aureolatum</i>	3120E	1F	-	-	-	NA
	<i>Amblyomma cajennense</i>	2824A	20N	-	-	-	+
		2824B	1F	-	-	-	NA
		2825A	9N	-	-	-	+
		2825B	2F	-	-	-	NA
		3118A	20N	-	-	-	+
		3118B	21N	-	-	-	+
		3118C	21N	-	-	-	+
		3118D	21N	-	-	-	+
		3119A	25N	-	-	-	+
		3119B	25N	-	-	-	+
		3119C	25N	-	-	-	+
		3122	18N	-	-	-	+
		2123A	1L	-	-	-	+
		2123B	1M	-	-	-	+
		2123C	35N	-	-	-	+

Continua

gltA*: resultado da PCR, utilizando o oligonucleotídeo CS2; *gltA*** : resultado da PCR, utilizando o oligonucleotídeo CS4; *ompA*: resultado da PCR para o gene *ompA*; qPCR: Resultado da qPCR para o gene *gltA*; - : Resultado negativo; + : Resultado positivo; Ø: Resultado inconclusivo; NA: Não analisado; FONTE: MOURA, N. O., 2011.

Tabela 1 – Pesquisa de genes riquetsiais (pela Reação em Cadeia da Polimerase – PCR) em potenciais vetores investigados para Febre Maculosa Brasileira, no município de Trajano de Moraes do estado do Rio de Janeiro, no período de outubro de 2008 a novembro de 2009

Continuação

HOSPEDEIRO	VETOR						
	ESPÉCIE	COD. AMOSTRA	SEXO/ESTÁDIO	<i>gltA</i> *	<i>gltA</i> **	<i>ompA</i>	qPCR
Livre no ambiente	<i>Amblyomma cajennense</i>	2123D	35N	-	-	-	+
		2125A	1F	-	-	-	+
		2125B	1M	-	-	-	+
		2125C	44N	-	-	-	+
		2125D	28N	-	-	-	+
		3126A	2M	-	-	-	+
		3126B	22N	-	-	-	+
		3126C	21N	-	-	-	+
		3126D	16N	-	-	-	+
		3127A	3M	-	-	-	-
		3127B	36N	-	-	-	+
		3127C	40N	-	-	-	+
		3128A	2M	-	-	-	+
		3128B	2M	-	-	-	+
		3128C	35N	-	-	-	+
		3128D	35N	-	-	-	+
<i>Equus caballus</i>	<i>Amblyomma cajennense</i>	2827H	1F	-	-	-	+
		2827J	1M	-	-	-	+
		2827K	2N	-	-	-	+
		3121J	1L	-	-	-	+
		3121K	8N	-	-	-	-
		3121L	9N	-	-	-	-
		3121M	2F	-	-	-	-
		3121N	2F	-	-	-	-
		3121O	1M	-	-	-	+
	<i>Anocentor nitens</i>	2827A	1F	-	-	-	-
		2827B	1F	-	-	-	+
		2827C	1F	-	-	-	+
		2827D	1F	-	-	-	+
		2827E	2F	-	-	-	+
		2827F	2F	-	-	-	+
		2827G	3F	-	-	-	-
		2827I	2F	-	-	-	-
		2827LI	3M	-	-	-	+
		2827LII	4M	-	-	-	+

Continua

gltA*: resultado da PCR, utilizando o oligonucleotídeo CS2; *gltA*** : resultado da PCR, utilizando o oligonucleotídeo CS4; *ompA*: resultado da PCR para o gene *ompA*; qPCR: Resultado da qPCR para o gene *gltA*; - : Resultado negativo; + : Resultado positivo; FONTE: MOURA, N. O., 2011.

Tabela 1 – Pesquisa de genes riquetsiais (pela Reação em Cadeia da Polimerase – PCR) em potenciais vetores investigados para Febre Maculosa Brasileira, no município de Trajano de Moraes do estado do Rio de Janeiro, no período de outubro de 2008 a novembro de 2009

Continuação

HOSPEDEIRO	ESPÉCIE	VETOR					
		COD. AMOSTRA	SEXO/ESTÁDIO	<i>gltA</i> *	<i>gltA</i> **	<i>ompA</i>	qPCR
<i>Equus caballus</i>	<i>Anocentor nitens</i>	2827LIII	4M	-	-	-	+
		2827MI	4N	-	-	-	+
		2827MII	5N	-	-	-	+
		3121A	1N	-	-	-	+
		3121B	2F	-	-	-	NA
		3121C	2F	-	-	-	+
		3121D	1F	-	-	-	-
		3121E	1F	-	-	-	-
		3121F	1F	-	-	-	-
		3121G	1F	-	-	-	+
		3121H	3M	-	-	-	+
		3121I	4M	-	-	-	NA
<i>Canis familiaris</i>	<i>Ctenocephalides felis</i>	063	3F	-	-	-	-
		070A	3M	-	-	+	+
		070B	2F	-	-	-	+
		073A	3F	-	-	-	-
		073B	2M	-	-	-	+
		064	7F	-	-	-	-
		062A	4F	-	-	-	-
		062B	1M	-	-	-	+
		065A	6F	-	-	-	-
		065B	1M	-	-	-	+
		066A	9F	-	-	-	-
		066B	1M	-	-	-	+
		068A	9F	-	-	-	-
		068B	4M	-	-	-	NA
		071A	4F	-	-	-	-
		071B	2M	-	-	-	+
		072	1F	-	-	-	+
		069	9F	-	-	-	-
		067A	4M	-	-	-	-
		067BI	3F	-	-	-	+
		067BII	4F	-	-	-	+
	<i>Ctenocephalides canis</i>	061A	3M	-	-	-	-
		061B	4F	-	-	-	+
		178	1F	+	+	+	+
<i>Homo sapiens</i>	<i>Anocentor nitens</i>	2826	3M	-	-	-	-

Conclusão

gltA*: resultado da PCR, utilizando o oligonucleotídeo CS2; *gltA*** : resultado da PCR, utilizando o oligonucleotídeo CS4; *ompA*: resultado da PCR para o gene *ompA*; qPCR: Resultado da qPCR para o gene *gltA*; ; - : Resultado negativo; + : Resultado positivo; NA: Não analisado; FONTE: MOURA, N. O., 2011.

Tabela 2 – Pesquisa de genes riquetsiais (pela Reação em Cadeia da Polimerase – PCR) em potenciais vetores investigados para Febre Maculosa Brasileira, no município de São José do Vale do Rio Preto do estado do Rio de Janeiro, no período de outubro de 2008 a novembro de 2009

HOSPEDEIRO	VETOR						
	ESPÉCIE	COD. AMOSTRA	SEXO/ESTÁDIO	<i>gltA</i> *	<i>gltA</i> **	<i>ompA</i>	qPCR
<i>Canis familiaris</i>	<i>Amblyomma cajennense</i>	2985	1M	-	-	-	+
<i>Equus caballus</i> <i>Equus caballus</i>	<i>Amblyomma cajennense</i>	2986A	3M	-	-	-	NA
		2986B	2M	-	-	-	NA
		2986CI	1F	-	-	-	+
		2986CII	1F	-	-	-	+
		2986DI	1F	-	-	-	+
		2986DII	1F	-	-	-	+
		2987A	2N	-	-	-	-
		2988A	1M	+	-	+	+
		2988B	1F	+	-	+	Ø
		2993A	1M	-	-	-	+
		2993B	1F	-	-	-	-
	<i>Boophilus microplus</i>	2987B	1F	-	-	+	Ø
<i>Bos taurus</i>	<i>Amblyomma cajennense</i>	2991A	1F	-	-	-	-
		2992A	1M	-	-	-	+
		2992B	1F	-	-	-	-
Livre no ambiente	<i>Amblyomma cajennense</i>	2994A	1M	-	-	-	+
		2994B	33L	-	-	-	+
		2994CI	17L	-	-	-	+
		2994CII	17L	-	-	-	+
		2994D	12L	-	-	-	+
		2995	1F	-	-	-	+
		2996A	1M	-	-	-	+
		2996B	2F	-	-	-	+
		2996CI	1F	-	-	-	+
		2996CII	1F	-	-	-	+

Continua

gltA*: resultado da PCR, utilizando o oligonucleotídeo CS2; *gltA*** : resultado da PCR, utilizando o oligonucleotídeo CS4; *ompA*: resultado da PCR para o gene *ompA*; qPCR: Resultado da qPCR para o gene *gltA*; - : Resultado negativo; + : Resultado positivo; Ø: Resultado inconclusivo; NA: Não analisado; FONTE: MOURA, N. O., 2011.

Tabela 2 – Pesquisa de genes riquetsiais (pela Reação em Cadeia da Polimerase – PCR) em potenciais vetores investigados para Febre Maculosa Brasileira, no município de São José do Vale do Rio Preto do estado do Rio de Janeiro, no período de outubro de 2008 a novembro de 2009

Continuação

HOSPEDEIRO	ESPÉCIE	VETOR					
		COD. AMOSTRA	SEXO/ESTÁDIO	<i>gltA</i> *	<i>gltA</i> **	<i>ompA</i>	qPCR
<i>Bos taurus</i>	<i>Boophilus microplus</i>	2989A	2F	+	-	+	Ø
		2990A	1M	-	-	-	-
		2990BI	1F	-	-	-	NA
		2990BII	1F	-	-	-	+
		2990C	2F	-	-	-	-
		2990DI	2F	-	-	-	-
		2990DII	2F	-	-	-	-
		2991BI	1F	-	-	-	-
		2991BII	1F	-	-	-	-
		2991BIII	1F	-	-	-	-
		2991C	5F	-	-	+	Ø
		2991DI	1F	-	-	-	-
		2991DII	1F	-	-	-	-
		2991DIII	1F	-	-	-	-
		2991EI	1F	-	-	-	-
		2991EII	1F	-	-	-	-
		2992C	2F	-	-	-	-
		2992D	2F	-	-	-	-
		2992E	2F	-	-	-	-
		2992F	2F	-	-	-	-
<i>Canis familiaris</i>	<i>Ctenocephalides felis</i>	079A	6F	-	-	-	-
		079B	1M	-	-	-	+
		080A	1M	-	-	-	+
		080B	1F	-	-	-	-

Conclusão

gltA*: resultado da PCR, utilizando o oligonucleotídeo CS2; *gltA*** : resultado da PCR, utilizando o oligonucleotídeo CS4; *ompA*: resultado da PCR para o gene *ompA*; qPCR: Resultado da qPCR para o gene *gltA*; - : Resultado negativo; + : Resultado positivo; Ø: Resultado inconclusivo; NA: Não analisado; FONTE: MOURA, N. O., 2011.

Tabela 3 – Pesquisa de genes riquetsiais (pela Reação em Cadeia da Polimerase – PCR) em potenciais vetores investigados para Febre Maculosa Brasileira, no município de Barra do Piraí do estado do Rio de Janeiro no período de outubro de 2008 a novembro de 2009

HOSPEDEIRO	VETOR						
	ESPÉCIE	COD. AMOSTRA	SEXO/ESTÁDIO	<i>gltA</i> *	<i>gltA</i> **	<i>ompA</i>	qPCR
<i>Equus caballus</i>	<i>Amblyomma cajennense</i>	3167A	1F	-	-	-	+
		3167B	1F	-	-	-	+
		3167C	1F	-	-	-	-
		3167D	1F	-	-	-	-
		3168A	1F	-	-	-	+
		3168B	1F	-	-	-	-
		3170A	1N	-	-	-	-
		3170B	2M	-	-	-	+
		3170C	2F	-	-	-	NA
		3171A	1F	-	-	-	+
		3171B	3M	-	-	+	Ø
	<i>Anocentor nitens</i>	3167E	1F	-	-	-	-
		3167F	1F	-	-	-	-
		3167G	1F	-	-	-	-
		3167H	1F	-	-	-	-
		3167I	1F	-	-	-	-
Livre no ambiente	<i>Amblyomma cajennense</i>	3169A	3N	-	-	-	+
		3169B	1F	-	-	-	+
		3172	3N	-	-	-	+
<i>Canis familiaris</i>	<i>Ctenocephalides felis</i>	184A	2F	-	-	-	+
		184B	1M	-	-	-	+
		185	1F	-	-	-	-
		186A	2M	-	-	-	-
		186B	3F	-	-	-	-
	<i>Amblyomma cajennense</i>	3166	1F	-	-	-	NA

gltA*: resultado da PCR, utilizando o oligonucleotídeo CS2; *gltA*** : resultado da PCR, utilizando o oligonucleotídeo CS4; *ompA*: resultado da PCR para o gene *ompA*; qPCR: Resultado da qPCR para o gene *gltA*; ; - : Resultado negativo; + : Resultado positivo; Ø: Resultado inconclusivo; NA: Não analisado; FONTE: MOURA, N. O., 2011.

Tabela 4 – Pesquisa de genes riquetsiais (pela Reação em Cadeia da Polimerase – PCR) em potenciais vetores investigados para Febre Maculosa Brasileira, no município de Pirai do estado do Rio de Janeiro, no período de outubro de 2008 a novembro de 2009

HOSPEDEIRO	ESPÉCIE	VETOR					
		COD. AMOSTRA	SEXO/ESTÁDIO	<i>gltA</i> *	<i>gltA</i> **	<i>ompA</i>	qPCR
<i>Canis familiaris</i>	<i>Amblyomma cajennense</i>	3157A	1N	-	-	-	+
		3157B	1M	-	-	-	+
		3162A	1F	-	-	-	-
		3162B	1N	-	-	-	+
		3163	2N	-	-	-	NA
		3164B	2N	-	-	-	+
		3164C	2N	-	-	-	+
Livre no ambiente	<i>Amblyomma cajennense</i>	3160	1F	-	-	-	+
		3165A	2N	-	-	-	+
		3165B	1M	-	-	-	+
<i>Equus caballus</i>	<i>Amblyomma cajennense</i>	3161A	1M	-	-	-	+
		3161B	1F	-	-	-	-
		3161C	1F	-	-	-	-
		3161D	1F	-	-	-	-
		3161E	1F	-	-	-	-
<i>Canis familiaris</i>	<i>Amblyomma aureolatum</i>	3164A	1M	-	-	-	+
	<i>Ctenocephalides felis</i>	179A	1M	-	-	-	+
		180A	1M	-	-	-	+
		180B	3F	-	-	-	-
		181A	1F	+	-	-	+
		181B	4M	-	-	-	+
		183	1F	-	-	-	+
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	3157C	2N	-	-	-	-
		3158	1M	-	-	-	+
		3159	1F	-	-	-	-
<i>Felis catus</i>	<i>Ctenocephalides felis</i>	182A	1M	-	-	-	+
		182B	5F	+	+	+	+

gltA*: resultado da PCR, utilizando o oligonucleotídeo CS2; *gltA*** : resultado da PCR, utilizando o oligonucleotídeo CS4; *ompA*: resultado da PCR para o gene *ompA*; qPCR: Resultado da qPCR para o gene *gltA*; ; - : Resultado negativo; + : Resultado positivo; NA: Não analisado; FONTE: MOURA, N. O., 2011.

Tabela 5 – Pesquisa de genes riquetsiais (pela Reação em Cadeia da Polimerase – PCR) em potenciais vetores investigados para Febre Maculosa Brasileira, no município de Porciúncula do estado do Rio de Janeiro, no período de outubro de 2008 a novembro de 2009

HOSPEDEIRO	VETOR						
	ESPÉCIE	COD. AMOSTRA	SEXO/ESTÁDIO	<i>gltA</i> *	<i>gltA</i> **	<i>ompA</i>	qPCR
Livre no ambiente	<i>Amblyomma cajennense</i>	2933	2N	-	-	-	NA
		2934	1N	-	-	-	NA
		2936A	1N	-	-	+	+
		2936BI	40L	-	-	-	+
		2936BII	40L	-	-	-	+
		2936BIII	1F	-	-	-	NA
		2936C	40L	-	-	-	+
		2937B	33N	-	-	-	+
		2937C	33N	-	-	-	NA
	<i>Amblyomma dubitatum</i>	2937A	2F	+	+	+	+
	<i>Ctenocephalides felis</i>	077	2F	+	-	+	+
		077B	1M	-	-	-	NA

gltA*: resultado da PCR, utilizando o oligonucleotídeo CS2; *gltA*** : resultado da PCR, utilizando o oligonucleotídeo CS4; *ompA*: resultado da PCR para o gene *ompA*; qPCR: Resultado da qPCR para o gene *gltA*; ; - : Resultado negativo; + : Resultado positivo; NA: Não analisado; FONTE: MOURA, N. O., 2011.

Tabela 6 – Pesquisa de genes riquetsiais (pela Reação em Cadeia da Polimerase – PCR) em potenciais vetores investigados para Febre Maculosa Brasileira, no município de Itaperuna do estado do Rio de Janeiro

HOSPEDEIRO	VETOR						
	ESPÉCIE	COD. AMOSTRA	SEXO/ESTÁDIO	<i>gltA</i> *	<i>gltA</i> **	<i>ompA</i>	qPCR
Livre no ambiente	<i>Amblyomma cajennense</i>	2932AI	45L	-	-	-	+
		2932AII	40L	-	-	-	+
		2932B	22L	+	-	+	Ø
		2932BII	1N	-	-	-	NA
		2935	45L	-	-	-	-
<i>Canis familiaris</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	2949A	1F	-	-	-	NA
		2949B	1M	-	-	-	-

gltA*: resultado da PCR, utilizando o oligonucleotídeo CS2; *gltA*** : resultado da PCR, utilizando o oligonucleotídeo CS4; *ompA*: resultado da PCR para o gene *ompA*; qPCR: Resultado da qPCR para o gene *gltA*; - : Resultado negativo; + : Resultado positivo; Ø: Resultado inconclusivo; NA: Não analisado; FONTE: MOURA, N. O., 2011.

Tabela 7 – Pesquisa de genes riquetsiais (pela Reação em Cadeia da Polimerase – PCR) em potenciais vetores investigados para Febre Maculosa Brasileira, no município de Volta Redonda do estado do Rio de Janeiro, no período de outubro de 2008 a novembro de 2009

HOSPEDEIRO	ESPÉCIE	VETOR					
		COD. AMOSTRA	SEXO/ESTÁDIO	<i>gltA</i> *	<i>gltA</i> **	<i>ompA</i>	qPCR
<i>Canis familiaris</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	2902	1F	-	-	-	NA
		2902A	1M	-	-	-	NA
		2902B	1N	-	-	-	+
		2903A	1M	-	-	-	NA
		2903B	1F	-	-	-	NA
		2904A	1M	-	-	-	NA
		2904B	2N	-	-	-	NA
		2907	1F	-	-	-	NA
		2908A	1N	-	-	-	+
		2908B	2M	-	-	-	NA
		2908C	2F	-	-	-	NA
		2909A	1M	-	-	-	NA
		2909B	2N	-	-	-	NA
		2910A	1F	-	-	-	NA
		2910B	1M	-	-	-	NA
		2911A	1F	-	-	-	NA
		2911B	1M	-	-	-	NA
		2912	2M	-	-	-	NA
		2913	2M	-	-	-	NA
		2914	1F	-	-	-	NA
		2915	1F	-	-	-	NA
		2916A	2M	-	-	-	NA
		2916B	1F	-	-	-	NA
		2917A	1M	-	-	-	NA
		2917B	3F	-	-	-	NA
		2918A	4M	-	-	-	NA
		2918B	1F	-	-	-	+
		2919A	1F	-	-	-	NA
		2919B	3M	-	-	-	NA
		2920	2M	-	-	-	NA
		2921A	1F	-	-	-	NA
		2921B	4M	-	-	-	NA
		2922A	3M	-	-	-	-
		2922B	2F	-	-	-	NA
		2922C	1N	-	-	-	+
		2923A	2F	-	-	-	NA
		2923B	4M	-	-	-	NA

Continua

gltA*: resultado da PCR, utilizando o oligonucleotídeo CS2; *gltA*** : resultado da PCR, utilizando o oligonucleotídeo CS4; *ompA*: resultado da PCR para o gene *ompA*; qPCR: Resultado da qPCR para o gene *gltA*; ; - : Resultado negativo; + : Resultado positivo; NA: Não analisado; FONTE: MOURA, N. O., 2011.

Tabela 7 – Pesquisa de genes riquetsiais (pela Reação em Cadeia da Polimerase – PCR) em potenciais vetores investigados para Febre Maculosa Brasileira, no município de Volta Redonda do estado do Rio de Janeiro no período de outubro de 2008 a novembro de 2009

Continuação

HOSPEDEIRO	ESPÉCIE	VETOR					
		COD. AMOSTRA	SEXO/ESTÁDIO	<i>gltA</i> *	<i>gltA</i> **	<i>ompA</i>	qPCR
<i>Canis familiaris</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	2924A	1M	-	-	-	-
		2924B	2F	-	-	-	NA
		2924C	1N	-	-	-	+
		2925A	2M	-	-	-	NA
		2925B	2F	-	-	-	+
		2926A	2M	-	-	-	NA
		2926B	1F	-	-	-	NA
		2927A	3M	-	-	-	-
		2927B	2F	-	-	-	NA
		2928A	2F	-	-	-	NA
		2928B	1M	-	-	-	+
		2929	5F	-	-	-	NA
		2930A	2M	-	-	-	NA
		2930B	2F	-	-	-	+
		2931A	4M	-	-	-	+
<i>Canis familiaris</i>	<i>Ctenocephalides felis</i>	2931B	4F	-	-	-	-
		2931C	4F	-	-	-	-
		078	4F	+	+	+	+
		079	2F	-	-	-	NA
		080	2F	-	-	-	NA
<i>Equus caballus</i>	<i>Amblyomma cajennense</i>	081	1F	-	-	-	NA
		082	1F	-	-	-	NA
		2831	20N	-	-	-	NA
		2832A	26L	-	-	-	NA
		2832B	17N	-	-	-	NA
		2832C	1F	-	-	-	NA
		2833A	1M	-	-	-	NA
		2833B	1F	-	-	-	+
		2833C	5L	-	-	-	+
		2833DI	35N	-	-	-	+
		2833DII	45N	-	-	-	-
		2834	17N	-	-	-	NA

Conclusão

gltA*: resultado da PCR, utilizando o oligonucleotídeo CS2; *gltA*** : resultado da PCR, utilizando o oligonucleotídeo CS4; *ompA*: resultado da PCR para o gene *ompA*; qPCR: Resultado da qPCR para o gene *gltA*; ; - : Resultado negativo; + : Resultado positivo; NA: Não analisado; FONTE: MOURA, N. O., 2011.