

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *Rickettsia* spp.  
CIRCULANTE EM FOCO INATIVO PERI-URBANO DO  
MUNICÍPIO DE CARATINGA, MG.**

**LUCIANE DANIELE CARDOSO**

OURO PRETO – AGOSTO 2004

---

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *Rickettsia* spp.  
CIRCULANTE EM FOCO INATIVO PERI-URBANO DO  
MUNICÍPIO DE CARATINGA - MG**

**LUCIANE DANIELE CARDOSO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Márcio A. Moreira Galvão.

OURO PRETO – AGOSTO 2004



*“Faz-se ciência com fatos, como se faz uma casa com pedras; mas uma acumulação de fatos não é uma ciência, assim como um montão de pedras não é uma casa.”*

*(Henri Poincaré)*

---

# *D*edicatória

*A Deus*

*Por tudo e todos;*

*A minha querida mãe que proporcionou todo*

*Apoio de que preciso desde o primeiro dia de minha vida;*

*A doce Ana Clara pelo novo sentido*

*Que trouxe a minha existência;*

*Ao meu amado e saudoso pai*

*Presença viva e exemplo eterno em minha caminhada.*

---

# *A*gradecimentos

A Deus por fortalecer minha fé para sempre crer que nada é difícil demais para Ti;

Ao Márcio por ter me proporcionado tão valiosa oportunidade;

Aos dois grandes colaboradores deste projeto: prof. Dr. Cláudio Mafra e Profa. Dra. Renata Freitas. Vocês deram uma contribuição muito importante não somente para realização deste trabalho mas também para minha vida profissional e pessoal;

A todos os professores do NUPEB e em especial aos professores Babá, Ieso, Luís Carlos e Milton por tamanha disponibilidade e colaboração;

A amiga e também colaboradora Fátima Bacellar. Suas orientações foram fundamentais para realização deste trabalho;

A Simone Calic, coordenadora do Laboratório de Segurança Biológica da Fundação Ezequiel Dias pela utilização do laboratório para realização dos testes sorológicos;

A Marilane, técnica do Laboratório de Segurança Biológica pelas orientações e auxílio na realização da RIFI;

Ao Álvaro Tapias, coordenador do Serviço de Vigilância Sanitária do Município de Caratinga pela acolhida, disponibilidade e auxílio na coleta de vetores realizada durante o trabalho;

A Cristiane e a Diana pelo compromisso e auxílio no processamento do material coletado;

---

A querida Cida pela atenção, carinho, amizade, cuidado e disponibilidade;

Aos amigos do LBMCC, especialmente ao Ângelo pela companhia e tão alegre convivência;

A todos os colegas do mestrado e em especial ao Heberth, Wander, Marquinhos, Eduardo, Tati e Michele, vocês foram e serão presença marcante em minha vida;

À minha amada Ana Clara por todo amor e ternura. A sua existência é o que dá sentido a minha vida;

A minha mãe pela imensa dedicação. Sem o seu apoio essa caminhada não seria possível;

Ao meu pai (*sempre presente*). Você deixou o maior legado que um pai poderia deixar a um filho: o seu exemplo.

A vovó Carmita (*sempre presente*);

A todos aqueles que depositaram algo neste trabalho: discussões e leituras incessantes, sorrisos, abraços, olhares de apoio, de incentivo, palavras....

MUITO OBRIGADA!

---

## RESUMO

As riquetsias patogênicas constituem um grupo de bactérias gram-negativas, intracelulares obrigatórias responsáveis por várias doenças humanas conhecidas como riquetsioses, as quais são transmitidas ao homem através da picada de artrópodes hematófagos como carrapato, pulga e piolho. O Brasil apresenta histórico de doença riquetsial desde o final da década de 20, sendo a febre maculosa brasileira a mais severa das riquetsioses descritas, com inúmeros casos confirmados através de sorologia no sudeste do país. A introdução de técnicas da biologia molecular no estudo das riquetsias tem possibilitado a caracterização de espécies já existentes como a *Rickettsia rickettsii*, bem como a descrição de novas espécies tais como a *Rickettsia felis*. O presente trabalho teve por objetivo detectar a presença de *Rickettsia* spp. circulante em artrópodes vetores em um foco inativo peri-urbano do município de Caratinga, MG, através da reação em cadeia da polimerase e avaliar o nível de transmissão de riquetsioses na população animal do domicílio e peri-domicílio. 2610 ectoparasitos, em fase parasitária, foram coletados entre maio/2002 e abril/2003, taxonomicamente identificados, agrupados de acordo com estágio evolutivo e animal de origem e submetidos à extração de DNA pelo método do fenol/clorofórmio. O DNA extraído foi amplificado por meio de uma PCR duplex contendo dois pares de oligonucleotídeos iniciadores gênero específicos: citrato sintase - *gltA* (RpCS877p; RpCS1258n) e 17 KDa (17kDa F; 17kDa R), sendo o produto obtido reamplificado com um par de iniciadores internos do gene que codifica a proteína interna de membrana de 17kDa (*full nested* PCR). Os produtos amplificados foram visualizados em gel de poliacrilamida 8% corado pela prata e as amostras positivas foram clonadas, purificadas, seqüenciadas, editadas e comparadas com outras seqüências depositadas no GenBank utilizando os programas Chromas e *BLASTn*. Alternativamente, produtos de PCR's positivas foram purificados e diretamente seqüenciados. Foram também coletadas 73 amostras de soro canino e 18 amostras de soro equino por venocentese da cefálica e da jugular, respectivamente, sendo estas submetidas à reação de imunofluorescência indireta usando antígeno específico de *R. rickettsii*. A análise das seqüências obtidas de *pools* de pulgas do gênero *Ctenocephalides* e de *pools* de carrapatos das espécies *Amblyomma cajennense* e *Rhipicephalus sanguineus* permitiu a identificação de riquetsias com 100% de homologia com *R. felis* e 97% de homologia com *Rickettsia honei* e *R. rickettsii*, simultaneamente. Nenhum dos soros caninos analisados apresentou resultado positivo à RIFI enquanto 3 dos soros equinos (17%) apresentaram-se positivos nos títulos 1:64 e 1:128. Os dados obtidos mostram que o foco estudado representa uma região vulnerável com relação à transmissão de riquetsioses, fazendo-se necessário o estabelecimento de um sistema de vigilância epidemiológica no referido local.

Palavras-chave: febre maculosa, *Rickettsia rickettsii*, riquetsioses, *Rickettsia felis*, febre maculosa brasileira.

---

## .ABSTRACT

The pathogenic *Rickettsiae* are obligate intracellular gram-negative bacteria associated with hematophagous arthropods such as ticks, fleas and lice that while feeding, can transmit *Rickettsiae* to animals and humans. In Brazil, rickettsial diseases has been described in the southeast of the country since 1929. Brazilian spotted fever is the most significant and severe rickettsial disease described with many cases confirmed by serology in the southeast of the country.

The introduction of molecular biology tools in rickettsial diseases investigation allowed the detection of many species already known such as *Rickettsia rickettsii* and new species such as *Rickettsia felis*. The objective of the present study was to detect *Rickettsia* spp. in vectors by PCR and to investigate the presence of antibodies for the spotted fever *Rickettsiae* group in sera from pet animals in Caratinga-MG, Brazil.

From may/2002 to april/2003, 2610 arthropods were collected . The ticks and fleas were pooled in pools ranging from 1 to 8 specimens per pool, separated by life stage and sex. The DNA was extracted by phenol-chloroform method and a duplex PCR was performed using, in the first reaction, two oligonucleotide primer pairs: citrate synthase (*gltA*)- RpCS877p; RpCS1258n and 17kDa genus common protein (17kDa F; 17kDa R). The PCR products were reamplified using a nested primer pair from the 17 kDa genus common protein (full nested PCR). The PCR products were electrophoresed in 8% polyacrylamide gel silver stained. Each positive PCR product were cloned and cycle sequenced or purified and directly sequenced. The sequences obtained were edited and assembled by using Chromas software and compared with other *Rickettsia* species sequences in the GeneBank database by using BLASTn utility. Sera samples from pet dogs (n=73) and from horses (n=18) were tested by indirect fluorescent antibody (IFA) using *Rickettsia rickettsii* antigen. Nucleotide sequences of the gene n - 17kDa (232 pb) from *Ctenocephalides* fleas , *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus sanguineus* ticks were 100% identical to *R. felis*. Another nucleotide sequences of the gene n - 17kDa (232 pb) from *Amblyomma cajennense* were similar to *R. rickettsii* and *R. honei* (97% for both). Three of the horses sera tested (17%) had positive antibody titers ranging from 1:64 to 1:128. All the dogs sera were negative by IFA.

The detection of *Rickettsiae* species potentially pathogenic for humans and the presence of equine seroreactivity to spotted fever *Rickettsiae* group show the risk of transmission of rickettsial disease and the need of improving a continuous epidemiologic surveillance system for them in this region.

Key-words: spotted fever; Brazilian spotted fever, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia felis*

---

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de vida dos ixodídeos

Figura 2 – Exantema máculo-papular

Figura 3- Localização geográfica do município de Caratinga, Minas Gerais

Figura 4 - Gel de poliacrilamida 8% corado pela prata de produto amplificado de PCR duplex e *nested* usando pares de *primers* gênero específicos

Figura 5 - Alinhamento da seqüência do fragmento do gene 17 kDa obtida no seqüenciamento com a seqüência depositada no *GenBank*

---

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição de artrópodes vetores de acordo com a espécie, coletados em Caratinga, Minas Gerais

Gráfico 2 - Distribuição sazonal da população de *Amblyomma cajennense* no município de Caratinga, Minas Gerais

Gráfico 3 - Distribuição sazonal da população de *Rhipicephalus sanguineus* no município de Caratinga, Minas Gerais

Gráfico 4 - Resultado da pesquisa de anticorpos anti-*R. rickettsii* em soro de eqüinos utilizando-se a RIFI

---

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR duplex

Tabela 2 - Lista de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na *nested* PCR

Tabela 3 – Resultado do seqüenciamento dos produtos de PCR's positivas, de acordo com o vetor e animal de origem

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E TERMOS

$\mu\text{L}$	microlitro, $10^{-6}\text{L}$
$\mu\text{M}$	micromolar, $10^{-6}\text{M}$
B.O.D	demanda biológica de oxigênio
BSA	albumina de soro bovino
ddNTPs	dideoxynucleotídeos trifosfatados
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTPs	desoxynucleotídeos trifosfatados
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etileno-diamino-tetracético
ELISA	<i>enzyme linked system assay</i>
<i>et al.</i>	e colaboradores
fg	fentogramas, $10^{-15}$ gramas
FMB	febre maculosa brasileira
GFM	grupo da febre maculosa
GT	grupo do tifo
IPTG	isopropil-tio- $\beta$ -D-galactosídeo
kDa	kiloDalton
LB	meio Luria-Bertani
M	molar
MEM	meio essencial mínimo
mL	mililitro, $10^{-3}\text{L}$
mM	milimolar, $10^{-3}\text{M}$
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
ng	nanogramas, $10^{-9}$ gramas
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
pb	pares de bases
PBS	solução de fosfato tamponada

---

PCR	reação em cadeia da polimerase
pg	picogramas, 10 <sup>-12</sup> gramas
pH	potencial hidrogeniônico
<i>primer</i>	oligonucleotídeo iniciador
RIFD	reação de imunofluorescência direta
RIFI	reação de imunofluorescência indireta
SBF	soro bovino fetal
SDS	dodecil sulfato de sódio
SSC	solução salina de citrato de sódio
TAE	tampão tris-acetato EDTA
Taq	<i>Termophilus aquaticus</i>
TBE	tris borato EDTA
TESP	tifo exantemático de São Paulo
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactosídeo

---

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1) RIQUETSIOSES DO GRUPO DA FEBRE MACULOSA .....	5
2.1.1) O Agente Etiológico .....	6
2.1.2) O Vetor.....	7
2.1.3) Os Hospedeiros.....	11
2.2) A RELAÇÃO Rickettsia – IXODÍDEO.....	13
2.3) ASPECTOS CLÍNICOS.....	16
2.4) MÉTODOS DE DETECÇÃO .....	18
2.5) A CONTRIBUIÇÃO DA BIOLOGIA MOLECULAR.....	19
2.6) RIQUETSIOSES NA LITERATURA BRASILEIRA.....	21
3. OBJETIVOS .....	30
3.1) OBJETIVO GERAL .....	31
3.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	32
4.1) SELEÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO .....	33
4.2) COLETA DE VETORES .....	34
4.3) EXTRAÇÃO DE DNA .....	35
4.4) PADRONIZAÇÃO DA PCR.....	36
4.4.1) Obtenção do Controle Positivo.....	36
4.4.2) Inoculação Experimental de Carrapatos .....	37
4.4.3) Teste da Hemolinfa.....	38
4.4.4) Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	38
4.4.5) Teste de Sensibilidade da PCR.....	40
4.5) SEQUENCIAMENTO .....	41
4.5.1) Clonagem .....	41
4.5.2) Transformação em célula bacteriana competente.....	42
4.5.3) Triagem das colônias recombinantes.....	42
4.5.4) PCR de colônia .....	43

---

4.5.5) Purificação dos plasmídios recombinantes .....	44
4.5.6) Purificação dos produtos da PCR .....	45
4.5.7) Quantificação do DNA plasmidial e dos produtos da PCR .....	45
4.5.8) Reação de sequenciamento .....	45
4.5.9) Análise da seqüência nucleotídica .....	47
4.6) SOROLOGIA .....	47
4.6.1) Reação de Imunofluorescência Indireta.....	47
5. RESULTADOS .....	49
5.1) COLETA DE VETORES .....	50
5.2) EXTRAÇÃO DE DNA .....	54
5.3) PADRONIZAÇÃO DA PCR.....	54
5.3.1) Infecção experimental de carrapatos .....	54
5.3.2) Teste de sensibilidade da PCR .....	54
5.4) PCR duplex e nested PCR .....	55
5.5) Sequenciamento .....	55
5.6) Sorologia animal .....	56
5. DISCUSSÃO .....	60
6 - CONCLUSÕES .....	67
7 - PERSPECTIVAS .....	71
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	73

---

# ***1. INTRODUÇÃO***

---

Casos humanos de infecção por bactérias do gênero *Rickettsia* têm sido descritos em vários países da América do Sul nos últimos 20 anos.

O Brasil apresenta histórico de doença riquetsial desde a década de 1920, sendo a febre maculosa brasileira (FMB) a mais severa das riquetsioses descritas, com inúmeros casos confirmados através de sorologia no sudeste do país (Galvão, 1996).

Em Minas Gerais tem-se registrado, desde a década de 80, a ocorrência de inúmeros casos da doença na forma de epidemias em áreas rurais e peri-urbanas com predominância nos Vales do Jequitinhonha, Mucuri e Rio Doce. Recentemente, casos humanos de riquetsiose felis, uma nova riquetsiose causada pela *Rickettsia felis*, foram descritos no estado, com a detecção por reação em cadeia da polimerase (PCR) desta mesma bactéria em pulgas do gênero *Ctenocephalides* (Oliveira, 2002).

A introdução de técnicas da biologia molecular na investigação de doenças riquetsiais tem assumido grande importância na detecção de várias espécies do gênero *Rickettsia* em vetores, humanos e animais, permitindo a caracterização de espécies já conhecidas como a *Rickettsia rickettsii* e outras recentemente reconhecidas como a *R. felis* (Oliveira, 2002).

Em 1992 foi registrada através da Secretaria de Saúde de Minas Gerais, a existência de um foco peri-urbano expressivo em termos de ocorrência de casos, no município de Caratinga, Minas Gerais, localizado no Vale do Rio Doce, região esta que vinha se destacando como região problema (Galvão, 1996).

No período de junho a outubro de 1992 a Secretaria de Saúde de Minas Gerais notificou a ocorrência de 15 óbitos na região de Caratinga, sendo o diagnóstico de febre

---

maculosa brasileira, baseado em critérios clínico-epidemiológicos, o mais provável para explicação dos óbitos (Galvão, 1996).

Motivado pelas características do foco mencionado, Galvão (1996) elege o município de Caratinga como objeto de estudo e através de inquérito sorológico realizado no foco em questão, registra uma prevalência de 2% em humanos, 25% em cães e 53% em eqüinos através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) utilizando-se de antígeno específico contra *R. rickettsii*.

Desde o referido surto em 1992 até os dias atuais, nenhum caso suspeito de FMB foi registrado no município de Caratinga. Deste modo, como contribuição para um melhor conhecimento do ciclo natural das riquetsias, o presente trabalho pretendeu reavaliar o foco de Caratinga, um foco peri-urbano, aparentemente silencioso no momento do estudo, através da investigação de infecção por bactérias do gênero *Rickettsia* na população de artrópodes vetores e em prováveis reservatórios do domicílio e peri-domicílio, utilizando-se de técnicas sorológicas (RIFI) e de técnicas da biologia molecular (PCR) com o objetivo de melhor conhecer a dinâmica de transmissão de riquetsioses na referida área e estimar o risco ao qual está submetida sua população.

---

## 2. *REVISÃO DA LITERATURA*

---

## 2.1) RIQUETSIOSES DO GRUPO DA FEBRE MACULOSA

As riquetsioses constituem um grupo de doenças causadas por parasitas intracelulares obrigatórios com características de bactérias gram-negativas, da Ordem *Rickettsiales*, Tribo *Rickettsiaee*, Família *Rickettsiaceae* e gêneros *Rickettsia*, *Coxiella*, *Ehrlichia* e *Bartonella*. Várias espécies dessa ordem causam doenças no homem e em outros hospedeiros vertebrados e invertebrados, apresentando uma larga distribuição mundial (Hackstadt, 1996).

As informações a respeito dos primeiros casos da doença que mais tarde foi chamada de *Rocky Mountain spotted fever* (febre maculosa das Montanhas Rochosas) e sua distribuição geográfica inicial são bastante incompletas. O primeiro relato datado de 1896 em Idaho, nos Estados Unidos, foi feito por Marshal Wood, médico do exército americano (Harden, 1990). A primeira publicação científica feita por Maxcy, 1899 descreveu a doença no vale do *Snake River*, em Idaho, e a definiu como doença febril endêmica, não contagiosa e infecciosa, caracterizada clinicamente por febre alta, dores musculares, artrite e erupções petequiais ou purpúras profusas na pele, surgindo inicialmente nos tornozelos, pulsos e testa, difundindo-se rapidamente para todas as partes do corpo (Ricketts, 1909).

Em 1906 o Dr. Howard Taylor Ricketts identificou o agente etiológico da febre maculosa das Montanhas Rochosas e estabeleceu o papel do carrapato na transmissão da doença, sendo o gênero denominado *Rickettsia* em sua homenagem (Weiss e Strauss, 1991).

---

### 2.1.1) O Agente Etiológico

As riquetsias são bactérias que se especializaram em nichos ecológicos muito restritos e seu ciclo natural depende apenas de um hospedeiro, geralmente um artrópode (Bacellar,1996). Os organismos incluídos na família *Rickettsiaceae* reproduzem-se em células nucleadas de vertebrados e invertebrados e parasitam preferencialmente as células endoteliais (Weiss, 1984). Apesar de tanto vertebrados quanto invertebrados surgirem como hospedeiros para as bactérias da família *Rickettsiaceae*, alguns autores consideram que a sua associação com esses últimos seria evolutivamente mais antiga, pois os artrópodes, a exceção do piolho, não apresentam patologias evidentes associadas à infecção por estes microrganismos atuando, portanto, como vetores ou hospedeiros primários, os quais transmitem a doença ao homem, embora este seja considerado um hospedeiro acidental e a sua infecção um reflexo de mudanças ecológicas produzidas no ambiente (Hoogstraal,1967; Friedhoff,1990).

Os microrganismos do gênero *Rickettsia* estão, com base em caracteres moleculares e antigênicos, atualmente classificados em três grupos distintos: o grupo do tifo (GT), o grupo da febre maculosa (GFM) e o grupo ancestral (GA).

O GT inclui apenas as espécies *Rickettsia typhi* e *Rickettsia prowazekii*, ambas reconhecidamente patogênicas ao homem, causadoras do tifo murino e tifo epidêmico, respectivamente. O GFM contém mais de vinte espécies diferentes distribuídas em 7 linhagens distintas – complexo *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia japonica*, *Rickettsia montana*, complexo *Rickettsia massiliae*, *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia felis* e o complexo *Rickettsia akari*. O grupo ancestral por sua vez engloba as espécies *Rickettsia*

---

*bellii*, *Rickettsia canadensis* e o agente AB, todos de patogenicidade desconhecida ao homem (Sekeyová *et al.*, 2000).

As espécies do GFM parecem estar associadas à distribuição geográfica dos artrópodes vetores e inclui duas espécies patogênicas consideradas padrão: a *R. conorii*, restrita ao Velho Mundo e a *R. rickettsii* no Novo Mundo (Bacellar, 1996).

Pelo menos nove das espécies pertencentes ao GFM causam doenças ao homem em diferentes regiões geográficas: *R. rickettsii* nas Américas do Norte e do Sul, *Rickettsia conorii* no sul da Europa, Ásia e África, *Rickettsia africae*, na África, *Rickettsia australis*, na Austrália, *Rickettsia honei*, na Oceania, *Rickettsia sibirica*, no norte da Ásia, *R. japonica*, no Japão, *Rickettsia akari*, nos Estados Unidos e na Ásia e *R. felis*, recentemente descrita nos Estados Unidos, México, Brasil, França e Alemanha. (Raoult, 1997; Eremeeva, 2000).

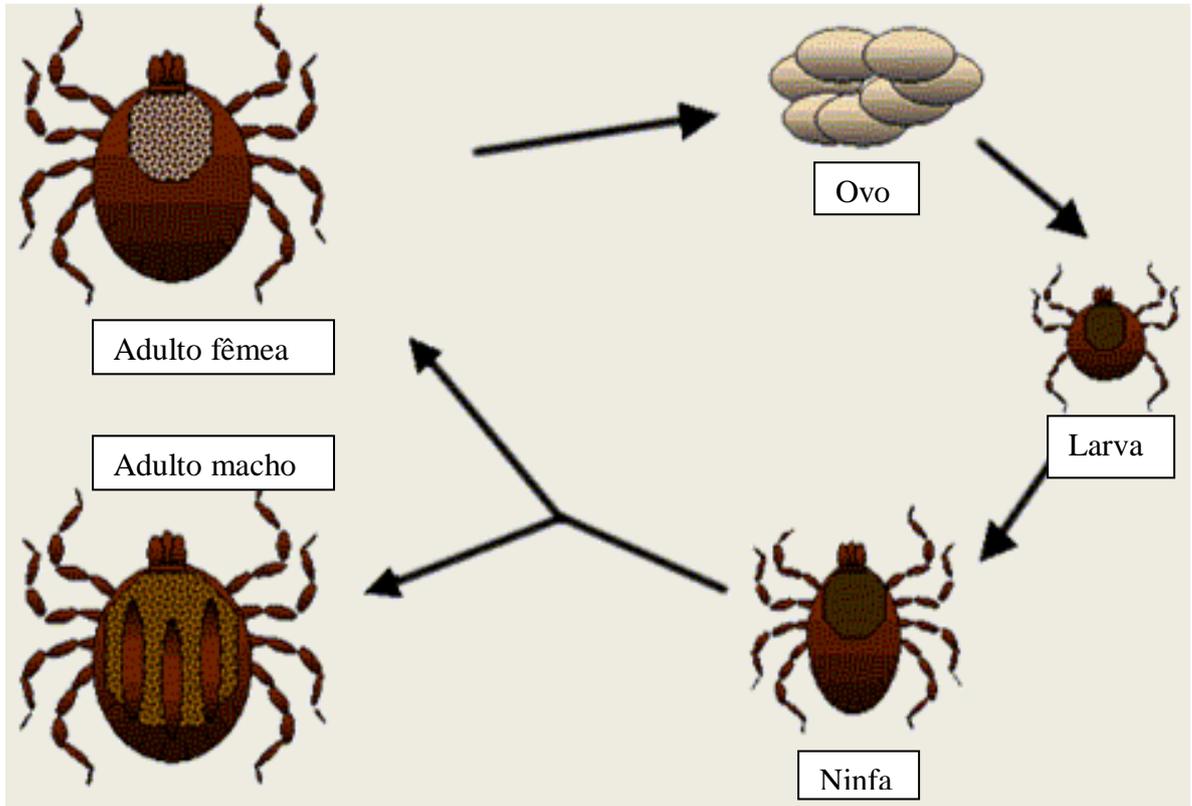
### **2.1.2) O Vetor**

A maioria das espécies de riquetsias patogênicas ao homem, assim como as riquetsias não patogênicas, têm como vetores e reservatórios naturais artrópodes hematófagos restritos da família Ixodidae. Com exceção da *R. akari*, transmitida por ácaros e *R. felis*, também transmitida por pulgas, todas as demais espécies são transmitidas por carrapatos.

Os ixodídeos têm um ciclo de vida que compreende as fases de ovo, larva, ninfa e adulto (Figura 1). Os três últimos estádios alimentam-se, em grandes quantidades, em

---

um hospedeiro vertebrado apenas uma única vez até ingurgitarem. Após a refeição, soltam-se do hospedeiro, sofrem uma muda ou ecdise, passando ao estágio seguinte.



**Figura 1 - ciclo de vida do ixodídeo**

As fêmeas da maior parte das espécies necessitam de uma refeição de sangue para iniciar a cópula e a ovoposição, após a qual morrem (Arthur, 1962).

A digestão do sangue nesses artrópodes, especialmente nas fêmeas, é feita intracelularmente e processa-se em três fases: a) fase preparatória, no início da digestão, quando o pH do sangue ingerido inibe a ação das proteases do trato intestinal dos ixodídeos; b) a digestão propriamente dita, que se inicia durante a fase de ingurgitação, quando ocorre a concentração de nutrientes e a excreção pelas glândulas salivares do

---

excesso de fluidos de volta à circulação do hospedeiro; c) a fase final, depois que o ixodídeo se separa do hospedeiro, prosseguindo a digestão dentro de células fagocíticas até a ovoposição. A ausência da ação de enzimas proteolíticas no lúmen intestinal pode ser uma das razões que permitiriam a sobrevivência de agentes patogênicos existentes no sangue ingerido do hospedeiro e a sua disseminação pelo organismo do artrópode (Akov, 1982; Kaufman, 1989; Friedhoff, 1990; Sonenshine, 1993).

A maior parte dos ixodídeos ocupa nichos ecológicos abertos, estando sujeitos aos fatores ambientais, notadamente as condições climáticas. Devido a este fato, no decurso da evolução, desenvolveram uma incrível capacidade de adaptação às condições desfavoráveis como a falta de alimento, as condições climáticas desfavoráveis, a procura pelo hospedeiro e o reconhecimento de períodos sazonais ótimos para o início da postura e da ecdise (fotoperiodismo). A sua longevidade e elevada taxa de reprodução contribuem para manter a densidade populacional elevada numa determinada área geográfica, garantindo assim sua sobrevivência (Oliver, 1984; Friedhoff, 1990).

Os ixodídeos têm com seus hospedeiros uma especificidade mais ou menos restrita (Katz *et al.*, 1994). A especificidade ixodídeo-hospedeiro depende não só das espécies animais envolvidas, mas, principalmente, do estágio de desenvolvimento. Nos estádios larvares e ninfais a área geográfica de dispersão por si só é restrita e a capacidade de picar é determinada pelas dimensões do aparelho bucal (Kaufman, 1989). Os adultos de algumas espécies têm a característica de se deslocarem à procura do hospedeiro, enquanto outras ficam perto da área onde ocorreu a muda, subindo à

---

vegetação à espera que o hospedeiro passe para se fixar a ele (Lane e Stubbs, 1990; Belan e Bull, 1991).

Com relação ao homem como hospedeiro, não se pode afirmar, com base em dados experimentais, que existam carrapatos mais ou menos antropofílicos, embora na natureza grande parte das espécies não o pique e ele seja considerado um hospedeiro acidental ou ocasional (Katz *et al.*, 1994).

A relativa antropofilia dos ixodídeos e sua prevalência em uma determinada área desempenham um papel determinante na transmissão de agentes patogênicos. Alguns autores consideram ser muito comum que a presença de carrapatos não seja notada não só devido às dimensões reduzidas dos estádios intermediários, mas, também porque a picada é indolor, sendo este fato de extrema importância para a transmissão efetiva do agente infeccioso ao homem. Estudos efetuados com *R. rickettsii* e *R. conorii* concluíram que para haver transmissão do agente etiológico, são necessárias, em média, 6 a 20 horas de parasitismo pelo artrópode. Assim, os estádios intermediários devido a sua pequena dimensão, passam mais facilmente despercebidos durante mais tempo (Ricketts, 1909; McDade e Newhouse, 1986).

A transmissão pode ainda ocorrer por via mecânica, por exemplo, por maceração de um ixodídeo infectado e contaminação das mucosas com este material. A probabilidade desta ocorrência aumenta proporcionalmente ao tempo em que o ixodídeo permanece parasitando o hospedeiro, seja ele um animal ou o próprio homem (Comer, 1991).

Um carrapato pode se infectar com riquetsias de dois modos: ou as ingere durante o repasto sanguíneo num hospedeiro vertebrado infectado e riquetsêmico ou as

---

adquire por via transovariana ou transestadial (Burgdorfer, 1975; Rehacek, 1989; Rehacek, 1991). Em laboratório também foi conseguida a co-infecção de ixodídeos por via alimentar, quando se colocaram artrópodes infectados alimentando-se simultaneamente com outros não infectados sobre um mesmo hospedeiro saudável (Price, 1954). Foi comprovado que a infecção primária de um ixodídeo por via alimentar depende da quantidade de riquetsias que ingere juntamente com o sangue. Segundo alguns autores, quando ingeridas em quantidades suficientes as riquetsias ultrapassam a barreira intestinal e penetram no hemocélio onde são fagocitadas pelos hemócitos (Burgdorfer, 1966; Burgdorfer, 1975; Burgdorfer e Brinton, 1975).

### **2.1.3) Os Hospedeiros**

Os mamíferos são referidos como hospedeiros da maior parte das espécies de ixodídeos e, dentro deste grupo de vertebrados, a classe *Rodentia* é a mais parasitada. Encontram-se menos freqüentemente como hospedeiros destes artrópodes, as aves e os répteis (Oliver, 1989). Estudos experimentais realizados com pequenos roedores confirmaram que estes animais são sensíveis à infecção e desenvolvem riquetsemia suficiente para infectar os ectoparasitas durante o repasto sanguíneo, embora por um curto período de tempo. Estes mamíferos têm uma área de dispersão limitada e um tempo de vida curto, sendo considerados bons indicadores da existência de riquetsias numa dada área quando encontrados naturalmente infectados (Rehacek e Urvolgyi, 1978; Rehacek, 1992).

---

Os pássaros migradores também participam da circulação de riquetsias, por transportarem os ectoparasitas infectados a grandes distâncias, causando focos pontuais de infecção em zonas não endêmicas, podendo estabelecer novos focos se os ixodídeos se adaptarem à nova área geográfica (Burgdorfer, 1975, Rehacek e Tarasevich, 1991; Nice, 1994).

Entre os animais domésticos, o cão é considerado de grande importância na epidemiologia da febre maculosa (Burgdorfer, 1975). Embora ele não seja essencial ao ciclo natural das riquetsias, ele desempenha um papel primordial na manutenção e dispersão dos vetores infectados, além de estar envolvido na transmissão peri-domiciliar de doenças riquetsiais ao carregarem para o domicílio carrapatos infectados (McDade e Newhouse, 1986).

Além da existência de hospedeiros mamíferos, a atividade humana, especialmente sobre a vegetação, tem um importante papel no surgimento e expansão das riquetsioses. O reflorestamento feito com arbustos e a prática agrícola de criar pequenos bosques intercalados com monoculturas de gramíneas favorecem a proliferação de artrópodes devido à formação de microclimas favoráveis e à abundância de cobertura de solo, a qual gera um excelente *habitat* para os mamíferos hospedeiros dos estádios intermediários. Um caso concreto aconteceu no estado de Virgínia, EUA, onde o aumento de áreas reflorestadas com espécies arbóreas de folhas caducas originou um aumento de casos de febre maculosa das Montanhas Rochosas, já que estas árvores produzem mais umidade do que as pináceas, favorecendo a sobrevivência dos ixodídeos e dos hospedeiros (Atwood *et al.*, 1965; Sonenshine *et al.*, 1972).

---

## 2.2) A RELAÇÃO *Rickettsia* – IXODÍDEO

As riquetsias causam uma infecção sistêmica nos ixodídeos, multiplicando-se no citoplasma das células de todos os órgãos do artrópode (Rehacek, 1989). Apesar da infecção maciça das células por riquetsias, não foram observados efeitos citopatogênicos nos artrópodes (Rehacek, 1984).

A infecção sistêmica do ixodídeo explicaria a transmissão transestadial e a infecção dos ovários, a transmissão transovariana (Friedhoff, 1990; Smith e Dunn, 1991). Este fenômeno de invasão celular permitiu que os carrapatos se tornassem não só vetores das riquetsias, mas também o seu reservatório na natureza pela transmissão vertical, eliminando, teoricamente, a necessidade de um hospedeiro vertebrado no ciclo de vida dessas bactérias. Estudos com *R. rickettsii* e *Rickettsia slovaca* apontam a transmissão transovariana como sendo o mecanismo de manutenção das riquetsias na natureza. Em laboratório, conseguiu-se 100% de infecção dos descendentes de um ixodídeo infectado, embora, na natureza, não tenha sido comprovada esta possibilidade (Rehacek, 1984; Burgdorfer e Brinton, 1975; Hayes e Burgdorfer, 1982).

Outro fato decorrente da relação ixodídeo-riquetsia é o denominado fenômeno de interferência. Alguns autores citam que a taxa de ixodídeos infectados por espécies de riquetsias patogênicas ao homem deva ser regulada pela existência de infecção por riquetsias não patogênicas que competiriam pela colonização sistêmica dos artrópodes (Price, 1954; Loving *et al.*, 1978; Burgdorfer *et al.*, 1981; Ricketts, 1909). Outro fato é o fenômeno da reativação. Ainda em 1909, Ricketts associou a variação na virulência das riquetsias inoculadas em cobaias com o estado de alimentação do ixodídeo

---

(Ricketts, 1909). Nos anos 20 foi postulado que a virulência da *R. rickettsii* no vetor estaria relacionada com o estado fisiológico do ixodídeo (Weiss, 1987). Foi demonstrado que as riquetsias nos ixodídeos não ingurgitados tinham a capacidade de induzir uma resposta imune em animais, mas não eram capazes de induzir doença. Entretanto, carrapatos infectados por riquetsias, após o repasto sanguíneo ou após incubação a 37°C por 24-48 horas, quando inoculadas em cobaias produziam a infecção típica (Hayes e Burgdorfer, 1982). Este mecanismo de reativação foi reproduzido *in vitro* com estirpes virulentas de *R. rickettsii* (Walker *et al.*, 1982). Como cada estágio de desenvolvimento de um ixodídeo se alimenta apenas uma única vez, é possível que a refeição ou alguma substância ingerida, seja o sinal para o fim de um período de “dormência celular” que ocorre durante a diapausa: após o repasto sanguíneo, se inicia um processo de grande atividade celular no ixodídeo. Para que as riquetsias sejam transmitidas com sucesso à geração ou estágio seguinte, elas deverão proliferar neste momento, quando o metabolismo da célula hospedeira se eleva (Rehaeck, 1989).

Na literatura especializada, a definição de vetor e de reservatório tem sido motivo de controvérsia. No geral, considera-se como vetor o hospedeiro intermediário, enquanto um reservatório seria o hospedeiro no qual o parasita teria uma fase do ciclo de vida essencial para sua manutenção na natureza. No caso das riquetsias, os ixodídeos desempenham os dois papéis: são vetores ao transmiti-las ao hospedeiro vertebrado e são reservatórios ao mantê-las na natureza, seja por transmissão transovariana ou transtadial (Bacellar, 1996).

A relação riquetsia-ixodídeo demonstra um elevado nível de adaptação entre organismos, que parece ser muito antiga filogeneticamente. No entanto, não pode ser

---

considerada uma relação de comensalismo, uma vez que carrapatos infectados experimentalmente por riquétsias apresentam ovoposição diminuída, mau desenvolvimento dos ovos e elevada taxa de mortalidade entre os descendentes, quando comparados a carrapatos não infectados. Aparentemente, as riquétsias são mais beneficiadas nessa relação do que os ixodídeos (Rehaeck, 1989).

O desenvolvimento e dispersão de ixodídeos têm um efeito profundo na evolução e especificidade das riquétsias. Um dado que aponta nessa direção é o fato de certas espécies de riquétsias se encontrarem, freqüentemente, associadas a uma determinada espécie de carrapato. Por exemplo, *R. slovacca* é encontrada associada a *Dermacentor marginatus*, tendo sido raramente isolada de outras espécies de ixodídeos. Assim, esta riquétsia acompanha a distribuição geográfica do ixodídeo e, nas regiões onde este artrópode está presente deve-se levar em conta a presença desta riquétsia não patogênica nos estudos de soroprevalência, uma vez que as riquétsias não patogênicas são capazes de induzir a produção de anticorpos no organismo vertebrado (Bacellar, 1996).

Assim, a presença de riquétsias não patogênicas parasitando artrópodes pode exercer uma ação profilática, atuando como fator positivo na redução do poder de reservatório e vetor dos ixodídeos com relação as riquétsias patogênicas. É muito importante delimitar geograficamente as zonas de distribuição das diferentes espécies de riquétsias e estabelecer a inter-relação específica entre uma determinada espécie de riquétsia e uma determinada espécie de ixodídeo, de forma a esclarecer a relação ixodídeo-riquétia e determinar as áreas de maior risco de infecção para o homem (Bacellar, 1996).

---

Na história natural das riquetsias do grupo da febre maculosa, dois aspectos importantes devem ser considerados no que diz respeito à biologia dos artrópodes: o espectro de hospedeiros vertebrados das diferentes espécies de carrapatos e os hospedeiros nos quais se alimentam os estádios imaturos e os adultos de uma espécie em particular (Bertran, 1962).

A maior parte das espécies de ixodídeos tem um ciclo heteroxeno de 3 hospedeiros, com um hospedeiro diferente em cada estágio, não sendo estes hospedeiros necessariamente da mesma espécie. Embora alguns ixodídeos tenham uma preferência alimentar restrita, a maior parte parasita o vertebrado pela oportunidade de encontro. O ciclo natural das riquetsias em uma determinada área é caracterizado, primeiramente, pela espécie e pelo número de vetores prováveis e, secundariamente, pela fauna de vertebrados domésticos e silvestres (Traub e Jellinson, 1981). Numa riquetsiose, geralmente, o foco primário envolve os mamíferos, hospedeiros dos artrópodes vetores, e o foco secundário envolve os animais domésticos e silvestres, os quais se tornam fonte de infecção para o homem (Rehacek e Tarasevich, 1988).

### **2.3) ASPECTOS CLÍNICOS**

Os alvos preferenciais das riquetsias *in vivo* são as células endoteliais. Após penetração através da picada do carrapato, a parede vascular é invadida seguindo-se uma distribuição no organismo por via hematogênica e linfática. A replicação bacteriana ocorre no endotélio vascular, gerando uma vasculite que induz à ativação plaquetária e do sistema de coagulação, podendo levar a trombose. As lesões geradas no endotélio

---

vascular provocam aumento da permeabilidade capilar freqüentemente acompanhada por distúrbios hemostáticos tais como edema periférico, hipotensão e hipovolemia, todos relacionados aos efeitos citopáticos das riquetsias. Em formas severas da doença, não raro, observa-se falência renal, edema pulmonar e morte(Walker *et al.*, 1987; Davidson *et al.*, 1990).

Após um período de incubação de 2 a 14 dias manifestam-se os primeiros sintomas como febre contínua, mialgia, prostração e cefaléia. Lesões cutâneas maculo-papulares surgem entre o segundo e sexto dia nas extremidades, irradiando em seguida para o restante do corpo (figura 2). Caso não haja instituição de tratamento, ou caso este seja tardio, o óbito ocorre entre 5 a 8 dias após o início dos sintomas (Thorner *et al.*, 1998).



Fonte: CDC, 2002

Figura 2 - Exantema máculo-papular

---

O tratamento da FMB é baseado em antibioticoterapia utilizando-se a tetraciclina ou o cloranfenicol, o qual deve ser instituído tão logo se suspeite da doença, pois sua confirmação laboratorial pode ocorrer apenas em um estágio mais avançado da mesma (CDC, 2002). A letalidade em casos não tratados pode chegar a mais de 80% (Galvão *et al.*, 1993).

Embora o diagnóstico da febre maculosa se baseie em sinais e sintomas clínicos característicos associados a dados epidemiológicos, a confirmação laboratorial se faz necessária. Os métodos sorológicos são os mais difundidos na confirmação de casos de febre maculosa (CDC, 2002; Comer, 1991), no entanto, esta pode ainda ser feita através do isolamento do agente ou detecção do mesmo através de técnicas de biologia molecular em amostras de sangue ou biópsia de pele dos pacientes suspeitos.

#### **2.4) MÉTODOS DE DETECÇÃO**

O diagnóstico indireto do agente da febre maculosa é baseado em reações sorológicas (Comer, 1991), incluindo a reação de Weil-Felix,; teste de proteção por sensibilização em cobaias; reação de fixação do complemento; teste de neutralização de toxinas riquetsiais em ratos com anti-soro preparado em cobaias; aglutinação em látex e, principalmente, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), considerado como teste padrão no diagnóstico da febre maculosa. Entretanto, nenhum deles é capaz de reconhecer a espécie de riquetsia, devido à existência de reações heterólogas entre as diferentes espécies de bactérias do GFM e entre as do GT (Philip *et al.*, 1978; Mcdade e Newhouse, 1986; Comer, 1991). Também pode ser utilizada no diagnóstico indireto de

---

riquétsias, a técnica de ELISA com anticorpos monoclonais e policlonais (Dobson *et al.*, 1989), entretanto, esses anticorpos espécie-específicos estão disponíveis apenas para um número limitado de espécies (Regnery *et al.*, 1991). A técnica de *Western Blott* também pode ser usada como importante ferramenta para estudos de soroprevalência e confirmação de resultados, especialmente se empregada com anticorpos monoclonais para determinadas espécies de riquetsias (La Scola e Raoult, 1997).

Já o diagnóstico direto do agente pode ser feito através da reação de imunofluorescência direta (RIFD), teste da hemolinfa, isolamento do agente em cultura de células, inoculação em animais e ovos embrionados, composição protéica por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida e genotipagem (Burgdorfer, 1970; Lemos *et al.*, 1996; Philip *et al.*, 1976).

Atualmente as riquetsioses têm recebido pouca importância como doença infecciosa para o homem por parte do sistema de saúde. Porém, as riquetsioses continuam sendo um problema de caráter global, que afeta o homem em todos os continentes, com exceção da Antártida. Além disso, os casos não diagnosticados, mal diagnosticados e não notificados mascaram o papel real destas infecções na saúde pública mundial (Bacellar, 1996).

## **2.5) A CONTRIBUIÇÃO DA BIOLOGIA MOLECULAR**

A análise da seqüência de nucleotídeos de determinados genes constitui-se em um método bastante apropriado para identificação e análise filogenética de diferentes espécies de riquetsias (Regnery *et al.*, 1991). Embora este método não seja utilizado

---

rotineiramente no diagnóstico de múltiplas espécies de riquetsias, atualmente é uma importante ferramenta nas pesquisas que visam caracterizar novas espécies (Billings *et al.*, 1998).

Recentes progressos nas técnicas laboratoriais para o estudo das riquetsias, especialmente a implementação de técnicas da biologia molecular, vêm possibilitando a caracterização molecular do gênero *Rickettsia* com a identificação de novas espécies em todo o mundo e esclarecimentos importantes com relação a bactérias já descritas. A *R. felis*, por exemplo, conhecida desde 1990, era denominada “ELB” e classificada como membro do grupo do Tifo, devido à sua reatividade sorológica com *R. typhi*. Higgins *et al.* (1996). A utilização de técnicas da biologia molecular, no entanto, demonstrou haver distinção genética suficiente entre o agente “ELB” e as demais riquetsias e foi proposta uma nova espécie: *Rickettsia felis* (Higgins *et al.*, 1996).

A aplicação da PCR oferece um ensaio rápido, sensível e altamente específico para detecção de riquetsias (Azad *et al.*, 1990). Além disso, a PCR permite, em uma etapa posterior, o sequenciamento de nucleotídeos do gene amplificado. A identificação molecular de organismos do gênero *Rickettsia* através da PCR associada ao sequenciamento é, atualmente, o método padrão para identificação e análise filogenética das diferentes espécies de riquetsias (Regnery *et al.*, 1991; La Scola e Raoult, 1997). Utilizando-se diferentes iniciadores de seqüências genômicas conhecidas, é possível obter diagnósticos diferenciados para uma determinada amostra. Algumas seqüências genômicas das riquetsias já têm suas funções fenotípicas e sua distribuição entre diversas espécies determinada. A seqüência de DNA que codifica o gene da enzima respiratória citrato sintase está presente em diversos organismos procariotos e por ser

---

codificador de uma enzima de grande importância fisiológica, sofre uma elevada pressão seletiva para manter-se inalterada. Os iniciadores propostos por Regnery *et al.* (1991) identificam, neste gene, uma seqüência específica comum a todas as bactérias do gênero *Rickettsia*. Por outro lado, Azad *et al.* (1990) propuseram o uso iniciadores que amplificam uma seqüência do gene 17KDa, comum aos grupos da febre maculosa e grupo do tifo, que pode ser utilizado em conjunto com iniciadores internos (*nested primers*) da mesma seqüência, aumentando assim, a sensibilidade da técnica (Schriefer *et al.*, 1994). Para detecção de riquetsias do GFM, foram propostos iniciadores que localizam seqüências genômicas responsáveis por codificar proteínas de membrana, chamadas OmpA e OmpB, que estão mais expostas a mutações persistentes do genoma, representando uma ferramenta para a classificação e filogenia das diferentes espécies (Regnery *et al.*, 1991; Eremeeva *et al.*, 1994).

## **2.6) RIQUETSIOSES NA LITERATURA BRASILEIRA**

No Brasil, a doença conhecida como febre maculosa Brasileira (FMB) tem seus primeiros relatos na década de 1930 (Piza, 1932; Dias e Martins, 1939; Monteiro, 1932; Magalhães, 1952).

Buscando determinar o vetor da doença no Brasil, Lemos-Monteiro *et al.*, 1932a, demonstraram pela primeira vez que carrapatos da espécie *Amblyomma cajennense* podiam se infectar experimentalmente com o agente etiológico da doença, quando alimentados em cobaias experimentalmente infectadas e testaram a competência vetorial de carrapatos dos gêneros *Argas* e *Ornithodoros*, obtendo resultados positivos

---

apenas para o segundo gênero, mais especificamente a espécie *Ornithodoros rostratus*, que se infectou e transmitiu a infecção para cobaias. No entanto, baseados em observações epidemiológicas sobre a ocorrência da FMB, os autores insistiam na existência de outros vetores mais prováveis, responsáveis pela transmissão da doença em condições naturais. Na seqüência, propuseram que o nome da enfermidade em humanos, até então conhecida como tifo endêmico de São Paulo, mudasse para tifo exantemático de São Paulo (TESP), nomeando o agente etiológico da mesma *Rickettsia brasiliensis*. Neste estudo, os autores testaram a competência vetorial de diversos ectoparasitas presentes nas habitações ou arredores das áreas onde houve casos de TESP, em busca da determinação do provável vetor. Foram testados pulgas, piolhos, ácaros e carrapatos. Todas as tentativas foram negativas, o que levou os autores a concluir que o agente etiológico da TESP deveria ocorrer numa proporção muito baixa na população de vetores.

Ainda no mesmo, Lemos-Monteiro, 1932b demonstrou a transmissão interestadial do agente da TESP pelo carrapato *Amblyomma cajennense*, além de verificar a transmissão vertical do agente por fêmeas adultas do carrapato. Ao examinarem tecidos internos do carrapato, os autores identificaram a bactéria que havia sido descrita como *Rickettsia brasiliensis* e incriminada como o suposto agente etiológico do TESP. Paralelamente, Meyer *et al.*, 1932 reproduziram a doença em cobaias a partir da inoculação intraperitoneal de emulsão de piolhos retirados de um cadáver humano acometido por TESP.

Um ano depois, Gomes, de posse destes achados, tentou reproduzir o experimento inoculando em cobaias, piolhos colhidos em pacientes com a doença,

---

sendo todos os experimentos negativos. Neste mesmo trabalho, o autor descreve o isolamento do agente etiológico do TESP a partir de um exemplar de *Amblyomma ovale* adulto, colhido em um cão que residia com uma família cujos membros haviam sido acometidos pelo TESP. O autor aponta o gênero *Amblyomma* como o principal responsável pela transmissão da doença, sendo as espécies *A. cajennense* e *A. ovale* os vetores mais prováveis, reservando aos piolhos o papel de transmissor eventual (Gomes, 1933).

Ainda no ano de 1933, Lemos-Monteiro, em parceria com o *Rocky Mountain Laboratory*, nos Estados Unidos, verificaram, em uma série de experimentos utilizando cobaias, a imunidade cruzada entre amostras de soros de animais imunes ao TESP frente a soros animais imunes a febre maculosa das Montanhas Rochosas. Esta foi a primeira evidência de que a doença no Brasil era causada pela *R. rickettsii* (Lemos-Monteiro, 1933).

Em 1935, Lemos-Monteiro constatou que percevejos *Cimex lectularis*, freqüentemente encontrados parasitando humanos acometidos pela doença, não eram vetores competentes do agente etiológico do TESP (Lemos-Monteiro, 1935). No mesmo ano, Fonseca elucidou um equívoco cometido por Gomes ao demonstrar que o exemplar de *A. ovale* naturalmente infectado pelo agente do TESP era, na verdade, *A. striatum*, atualmente classificado como *A. aureolatum*. Fonseca apontou as espécies *A. aureolatum* e *A. cajennense* como os ixodídeos de maior importância na transmissão do TESP, enquanto a espécie *A. ovale* jamais fora encontrada naturalmente infectada pelo agente desta doença (Fonseca, 1935).

---

Contribuindo para o estudo da febre maculosa no Rio de Janeiro, Regendaz e Muniz demonstraram que o carrapato *R. sanguineus*, do cão, era capaz de manter a infecção transestadialmente, quando alimentado em cobaias infectadas, embora os autores não tivessem evidências do parasitismo deste ixodídeo em humanos (Regendaz e Muniz, 1936).

Moreira e Magalhães foram os primeiros a conduzirem um estudo epidemiológico da doença no Estado de Minas Gerais. O fato da doença apresentar uma letalidade próxima de 100% deixava-os intrigados, pois não encontravam paralelo com as demais doenças da época. Embora a possibilidade da participação de animais silvestres na epidemiologia da febre maculosa já tivesse sido sugerida por Ricketts em 1909, foi de Moreira e Magalhães o feito de isolar, pela primeira vez, o agente etiológico da doença a partir de um animal silvestre. Os mesmos autores também encontraram carrapatos da espécie *A. cajennense* naturalmente infectados, parasitando um cão doméstico e demonstraram, posteriormente, que o cão é um animal susceptível à doença (Moreira e Magalhães, 1937).

Como resultado de suas pesquisas, Moreira e Magalhães publicaram suas descobertas num trabalho intitulado pelos mesmos como “trabalho definitivo” sobre a epidemiologia da doença. Concluíram que se tratava de uma moléstia infecciosa, febril, aguda, via de regra exantemática, de amplo espectro clínico e comumente de elevada letalidade, predominantemente rural e registrada há mais de 30 anos em todo o estado de Minas Gerais. Determinaram claramente o papel do *A. cajennense* como principal transmissor da doença ao homem. Utilizando técnicas indiretas de diagnóstico tais como Weil-Felix, esses autores listam o gambá, o cão doméstico, o cachorro do mato, o

---

coelho, o preá e a cutia como prováveis reservatórios do agente. Os autores ainda classificaram a doença que ocorria em Minas Gerais como uma variedade da *Rocky Mountain Spotted Fever* que ocorria nos Estados Unidos, salientando, entretanto que se tratava de uma doença Sul-Americana e que não havia sido importada. Devido à coincidência entre os aspectos clínicos do tifo exantemático de São Paulo e o tifo exantemático de Minas Gerais, os autores propuseram que as duas moléstias se tornassem conhecidas como tifo exantemático do Brasil, embora não reconhecessem a bactéria *R. brasiliensis* descrita pelos pesquisadores paulistas como o provável agente etiológico da doença (Moreira e Magalhães, 1937).

Já na década de 40, Travajos e Vallejo (1942a), estudaram, em laboratório, a hipótese de que outros animais além do gambá pudessem albergar o agente da doença. Os autores verificaram que o preá era susceptível ao agente do tifo exantemático do Brasil, desenvolvendo a doença à semelhança das cobaias, quando inoculados experimentalmente. Já a capivara não apresentava sintoma clínico quando inoculadas experimentalmente, embora fosse possível isolar o agente a partir do sangue e órgãos internos do animal entre o quinto e décimo primeiro dia pós-inoculação. Embora esses autores não tenham obtido sucesso em suas tentativas de isolamento do agente do tifo exantemático do Brasil a partir de capivaras e preás capturados em áreas de ocorrência da doença, eles constataram que alguns animais trazidos da natureza eram refratários à inoculação, em laboratório, do agente da FMB. Assim, foi possível concluir que estes animais já haviam tido contato com a doença em seu ambiente natural e sobreviveram (Travassos e Vallejo, 1942a). Em uma segunda publicação, os mesmos autores demonstraram a infecção de carrapatos adultos da espécie *A. cajennense* após se

---

alimentarem em capivaras experimentalmente infectadas pelo agente da FMB, embora não tenham se certificado que os ixodídeos utilizados no ensaio, eram previamente livres de infecção, uma vez que foram colhidos em condições naturais de parasitismo (Travassos e Vallejo ,1942b).

Na mesma década, Travassos e Vallejo editam um extenso, completo e ainda atual trabalho sobre a manutenção de ixodídeos em laboratório para produção de uma vacina (Travassos e Vallejo, 1947).

O insucesso da vacina contra febre maculosa levou os pesquisadores a testarem métodos mais eficazes no tratamento dos doentes, sendo o advento dos antibióticos na década de 40, a principal arma encontrada pelos pesquisadores no combate a enfermidade, especialmente a tetraciclina (Tibira *et al.* 1968).

Embora Lemos-Monteiro *et al.* (1932b) tivessem sugerido a bactéria *R. braziliensis* como o provável agente da FMB, nenhum outro autor adotou esta nomenclatura. A dúvida sobre a espécie causadora da FMB pairava sobre a falta de diagnóstico específico e caracterização do agente: o resultado obtido a partir de um animal ou humano com sorologia positiva para *R. rickettsii* não era esclarecedor em função das reações heterólogas entre as riquetsias do grupo da febre maculosa, ou seja, o título de anticorpo apresentado poderia ter sido induzido por uma riquetsia não patogênica ou de baixa virulência do GFM. Somente em 1978, após quatro décadas, veio a confirmação de que o agente causador da FMB era de fato a *R. rickettsii*, através da técnica de sorotipagem por microimunofluorescência de uma amostra do agente causador do TESP enviada pelo Dr. Lemos Monteiro ao Dr. Parker no *Rocky Mountain Laboratory* ainda na década de 30 (Philip *et al.*, 1978)

---

Magalhães, em 1952, fornece detalhes históricos da doença relatada há mais de um século no norte do estado de Minas Gerais e publica extenso trabalho sobre o comportamento da febre maculosa em Minas Gerais, no período de 1929 a 1944 (Magalhães, 1952).

Após essa publicação, nenhum trabalho foi publicado sobre a febre maculosa em Minas Gerais, e uns poucos foram publicados sobre a doença no Brasil. Jayme Neves, em relato pessoal informa a existência de vários casos no período de 1957 a 1979 atendidos no Hospital Carlos Chagas, antiga Clínica de Doenças Infecciosas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, a qual servia de referência para todo o estado. Entretanto, a desativação do Hospital Carlos Chagas, que culminou com seu fechamento em 1979, trouxe como resultado o apagamento da memória da febre maculosa e também de outras patologias infecciosas em Minas Gerais.

A introdução de antibióticos na década de quarenta e seu uso indiscriminado por pacientes com quadro febril inicial a esclarecer, especialmente o uso do cloranfenicol e das tetraciclina, parece, também, ser outro fator que levou a doença ao esquecimento, por abortar seus principais sinais e sintomas, em especial o exantema máculo-papular. Apesar disso, a doença não deixou de fazer vítimas, seja pela invasão pelo homem do foco natural da doença, seja pelo contato com focos transformados (Galvão, 1996).

Em 1979 foi relatada a presença presumida da febre maculosa em Salvador, primeiro caso publicado no estado da Bahia, sugerindo uma distribuição geográfica da doença mais ampla do que se conhecia anteriormente, pois antes a incidência se limitava aos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (Mancini, 1983).

---

Somente a partir da década de 80, outros casos de febre maculosa diagnosticados em Minas Gerais foram alvo de novas publicações.

Gonçalves *et al.* (1981) apresentaram casos diagnosticados de FMB no Rio de Janeiro, fundamentados em aspectos clínico-epidemiológicos e laboratoriais, e chamaram a atenção para os aspectos clínicos da doença no que se refere ao diagnóstico diferencial da FMB com outras entidades freqüentes na prática clínica.

Galvão *et al.* (1983) descrevem um surto epidêmico de FMB no norte de Minas Gerais baseado em critérios clínico-epidemiológicos e laboratoriais e realizam um inquérito sorológico para riquetsioses em cães da mesma região. Ainda no final da década de 80, Galvão, 1988 estuda a ocorrência da FMB em Minas Gerais e seus determinantes através de inquérito soro-epidemiológico utilizando-se da reação de imunofluorescência indireta.

A década de 90 e o início dos anos 2000 são marcados pela realização de diversos estudos soros-epidemiológicos na população humana e animal nos estados de Minas Gerais (Galvão *et al.*, 1998; Galvão *et al.* 2002; Galvão *et al.* 2003), Rio de Janeiro e São Paulo (Del Guercio *et al.*, 1997; Lemos *et al.*, 1996a) e Espírito Santo (Sexton *et al.*, 1993), os quais apontam o estado de Minas Gerais como o de maior prevalência de FMB (Galvão, 1996).

Em 1992 é feito o isolamento do gênero *Rickettsia* em humanos, a partir de biópsia de pele (Melles *et al.*, 1992) e em 1996 obtêm-se o primeiro isolamento do gênero a partir de vetores da espécie *Amblyomma cooperi* obtido a partir da capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) (Lemos *et al.* (1996b). Em ambos os casos, a espécie do agente não foi identificada.

---

Galvão em 1996 estuda as características epidemiológicas de um foco periurbano no Vale do Rio Doce, Minas Gerais, e cita diversos municípios do estado que apresentaram relatos de suspeita e casos confirmados da doença nas décadas de oitenta e noventa.

Até o presente momento foram identificadas no Brasil, as seguintes espécies de riquetsias através de seqüenciamento genético: *R. felis*, identificada em pulgas do gênero *Ctenocephalides* nos estados de Minas Gerais e São Paulo (Oliveira *et al.*, 2002; Horta, 2002; Santos, 2003) e em carrapatos do gênero *Amblyomma* (Galvão *et al.*, 2002; Horta, 2002; Vianna, 2002; Santos, 2003; Sangioni, 2003), além das espécies *R. belii* (Labruna *et al.*, 2003a), *R. amblyommii* (Labruna *et al.*, 2003b), e *R. rickettsii* (Santos, 2003).

Resultados recentemente encontrados confirmam a presença de casos com sorologia positiva para *R. felis* em Minas Gerais (Raoult *et al.*, 2001), e a presença desta demonstra a importância de se investigar outras riquetsias com potencial patogênico para o homem.

Para concluir esse capítulo, é importante reiterar que a Organização Mundial de Saúde considera que, devido às suas complexas relações epidemiológicas, as riquetsioses requerem uma estreita vigilância e estratégias de controle. A razão disto reside no fato de que, apesar do aparente controle obtido com o uso de antibióticos e de inseticidas, nenhuma riquetsia patogênica ao homem foi ainda erradicada (Pervikov, 1991).

---

### **3. OBJETIVOS**

---

### 3.1) OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste trabalho foi detectar e caracterizar bactérias do gênero *Rickettsia* em artrópodes vetores e animais domésticos em um foco inativo peri-urbano.

### 3.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar diretamente a presença de organismos do gênero *Rickettsia* em artrópodes vetores (carrapatos, pulgas e piolhos), utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR);
- Identificar e classificar os organismos do gênero *Rickettsia* detectados na PCR através de sequenciamento dos fragmentos amplificados;
- Detectar indiretamente a presença de organismos do gênero *Rickettsia* em animais domésticos (cães, gatos e cavalos) utilizando a RIFI;
- Avaliar o nível de transmissão de riquetsioses na população animal do domicílio e peri-domicílio.

---

## 4. *M*ATERIAIS E *M*ÉTODOS

---

#### 4.1) SELEÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

O presente estudo foi realizado em Caratinga, município localizado no Vale do Rio Doce, Minas Gerais (latitude sul 18° 48' e longitude oeste 42° 09'), local no qual ocorreram vários casos fatais de febre maculosa em 1992 (figura 3).

O município de Caratinga apresenta temperatura média anual de  $21,1 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$  com precipitação e média anual de umidade relativa de 1.192,5 mm e  $80,5 \pm 2,2\%$ , respectivamente. A estação chuvosa ocorre nos meses de outubro a março, com uma precipitação acumulada de 951,9mm (79,8%) e temperatura média do mês mais quente (fevereiro) de  $23,9^{\circ}\text{C}$ . A estação seca se prolonga de maio a setembro, com uma precipitação acumulada de 165,9mm(13,6%) e temperatura média do mês mais frio (julho) de  $18^{\circ}\text{C}$ , sendo o mês de abril considerado um mês de transição entre a estação chuvosa e a estação seca.



**Figura 3 - Localização geográfica do município de Caratinga, MG**

---

Desde o surto de 1992 até os dias atuais, nenhum caso de FMB foi diagnosticado no foco descrito. Desta forma, o presente estudo escolhe como objeto de investigação o foco de Caratinga, um foco peri-urbano aparentemente silencioso, com o objetivo de reavaliá-lo e melhor conhecer a dinâmica de transmissão de riquetsioses na referida área, estimando, dessa forma, o risco ao qual está submetida sua população.

#### **4.2) COLETA DE VETORES**

A sistemática de coleta de artrópodes vetores foi pensada e elaborada de forma a se obter pulgas, piolhos e carrapatos parasitando animais domésticos do domicílio e peri-domicílio, dentre eles cães, gatos e cavalos.

A coleta aconteceu no bairro da Cadeia, Caratinga, Minas Gerais com auxílio de por uma equipe devidamente treinada do Centro de Controle de Zoonoses e do Escritório da Fundação Nacional de Saúde em Caratinga, em parceria com a equipe executora deste projeto.

O cronograma de coleta foi estabelecido de forma a se cobrir a variação sazonal da população do carrapato vetor, sendo os mesmos coletados em fase parasitária e em fase de vida livre. As coletas realizadas eram mensais e aconteciam na última semana do mês.

Os carrapatos em fase parasitária foram coletados ativamente pela busca no corpo dos animais presentes no domicílio e peri-domicílio. A coleta foi feita manualmente e os carrapatos acondicionados em recipiente apropriado segundo o local de coleta e animal de origem. Os carrapatos de vida livre, por sua vez, foram coletados

---

através da técnica de arrasto de flanela, acondicionados em tubos apropriados e identificados de acordo com data e local de coleta.

As pulgas e piolhos também foram coletados manualmente pela busca direta no corpo dos animais investigados.

Posteriormente os artrópodes foram transportados para o Setor de Medicina Veterinária Preventiva do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, onde foram taxonomicamente identificados de acordo com a chave dicotômica e pictórica descrita por Aragão & Fonseca (1961) e separados segundo gênero, espécie, sexo e estágio de desenvolvimento e armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o processamento.

As fêmeas ingurgitadas foram acondicionadas em microtubos, individualmente, e as ninfas, larvas e machos foram agrupadas em lotes de 1 a 6 indivíduos de acordo com o hospedeiro e o tamanho de cada vetor, resultando num total de 689 *pools*, os quais foram então submetidos a extração de DNA .

#### **4.3) EXTRAÇÃO DE DNA**

A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Billings *et al.*, 1998. Cada *pool* foi lavado com etanol 70 % suficiente para cobrir os carrapatos durante 15 minutos, seguido de lavagem em tampão fosfato (PBS pH 7,2). Após a lavagem foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  do mesmo tampão para maceração dos vetores, os quais foram triturados com o auxílio de uma ponteira de polietileno (fêmeas ingurgitadas) ou cortados com lâmina estéril em uma placa de Petri (machos e fêmeas

---

não ingurgitadas), sendo novamente colocados dentro do microtubo contendo PBS e homogeneizados com auxílio de uma ponteira estéril. Proteinase K (20mg/mL) e SDS 10% foram adicionados a esta suspensão para concentrações finais de X  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e 1%, respectivamente e posteriormente incubada a 55°C *overnight*.

O DNA foi obtido através de extrações sucessivas com fenol : clorofórmio (1:1), precipitado com 2/10 volumes de NaCl 2,5 M acrescido de 2 volumes de etanol 100% gelado e mantido a -20°C *overnight*. O DNA obtido foi ressuspendido em 100  $\mu\text{L}$  de água estéril, destilada e deionizada e armazenado a -4 °C. Desse material foram retirados 20  $\mu\text{L}$  para quantificação em espectrofotômetro ( $\lambda 260$ ), sendo todas as amostras ajustadas para concentração de 50ng/ $\mu\text{L}$ .

#### **4.4) PADRONIZAÇÃO DA PCR**

##### **4.4.1) Obtenção do Controle Positivo**

Os controles positivos foram obtidos a partir de culturas de células Vero infectadas com *Rickettsia parkeri*. Uma monocamada de células Vero foi obtida por incubação a 37°C, por 24/48 horas em estufa de CO<sub>2</sub>, em frasco contendo meio essencial mínimo (MEM) enriquecido com 10% de soro bovino fetal (SBF) e L-glutamina 2 mM. Obtida a monocamada nas condições descritas acima, a cultura foi infectada com *R. parkeri*. As células infectadas foram mantidas em estufa, a 32°C por aproximadamente 5 dias (até começarem a se desprender da parede da garrafa de cultura). Assim, no quinto dia pós-infecção uma pequena porção de células foi retirada para visualização e

---

controle da infecção, sendo as riquetsias visualizadas em microscópio ótico através da coloração de Gimenez.

Parte dessa cultura foi utilizada para extração de DNA (de acordo com protocolo descrito anteriormente) para obtenção de controles positivos e parte foi utilizada na infecção experimental de carrapatos utilizados na padronização da PCR.

#### **4.4.2) Inoculação Experimental de Carrapatos**

Os carrapatos utilizados nestes experimentos foram obtidos em campo, na fase parasitária e levados para o Laboratório de Biologia Molecular e Cultivo Celular (LBMCC) da Escola de Nutrição onde foram desinfetados com etanol 70% durante 10 minutos, lavados com água estéril por 5 minutos e submetidos ao teste da hemolinfa.

Para cada carrapato foi preparada uma lâmina para realização do teste da hemolinfa.

Confirmada a ausência de infecção natural, os carrapatos foram submetidos à infecção experimental por via intra-celomática, com *R. parkeri* cultivada em célula VERO e mantidos em estufa B.O.D., a 36°C, por 24 horas, quando então foi realizado um novo teste da hemolinfa para confirmação da infecção.

Os carrapatos positivos ao teste da hemolinfa foram então utilizados para extração de DNA e aqueles que se mostraram negativos após a infecção foram novamente incubados a 36°C por mais 24 horas e submetidos a um novo teste da hemolinfa.

---

#### 4.4.3) Teste da Hemolinfa

O teste da hemolinfa consiste num método de triagem de carrapatos naturalmente infectados por riquetsias. Para realização do teste da hemolinfa a porção distal de uma das patas do carrapato foi seccionada de forma a se obter uma a duas gotas de hemolinfa, a qual foi aplicada sobre uma lâmina limpa e desengordurada. As lâminas foram fixadas ao calor, coradas pelo método de Gimenez e examinadas ao microscópio óptico (Burgdorfer, 1970).

#### 4.4.4) Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As 689 amostras de DNA obtidas a partir dos ectoparasitos coletados foram agrupadas e submetidas à PCR em *pools* contendo DNA de 6 amostras cada um, resultando num total de 119 *pools* submetidos a PCR. Para isso foram misturadas 50 ng de DNA total de cada amostra, formando um *pool* final de 300 ng de DNA.

Para amplificação do DNA riquetsial foram utilizados três pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) já descritos na literatura, sendo um deles um sistema *nested* (Azad *et al.*, 1990; Webb *et al.*, 1990; Schriefer *et al.*, 1994). Os iniciadores foram sintetizados pela Alpha DNA, estando suas seqüências, T<sub>m</sub> e tamanho do produto amplificado apresentados na tabela 1.

Para detecção do gênero riquetsia foi utilizado um duplex composto por dois pares de iniciadores gênero específicos, um par externo do gene que codifica uma proteína estrutural de membrana de 17 KDa , altamente conservada no gênero e que

amplifica um fragmento de 434 pb e outro um par de iniciadores do gene da citrato sintase o qual amplifica uma porção de 381 pb.

**Tabela 1** - Lista de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR duplex

Iniciador	Origem	Gene	Seqüência nucleotídica (5'→3')	Tamanho do produto amplificado	Tm (°C)
RpCs877p	<i>R.</i>	<i>gltA</i>	GGGGGCCTGCTCACGGCGG	381 pb	70
RpCs 1258n	<i>proWazekii</i>		ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA		58
17 KDa 1	<i>R. rickettsii</i>	17 KDa	GCTCTTGCAACTTCTATGTT	434 pb	56
17 KDa 2			CATTGTTTCGTCAGGTTGGCG		62

As amostras negativas na primeira amplificação foram reamplificadas utilizando outro par de iniciadores também gênero específicos (*nested primers*) que amplificam uma região mais interna do gene 17 KDa, permitindo a realização de uma PCR de maior sensibilidade (*full nested PCR*), que amplifica um fragmento de 232 pb. Os iniciadores foram sintetizados pela Alpha DNA, estando suas seqüências, Tm e tamanho do produto amplificado apresentados na tabela2.

**Tabela 2** - Lista de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na nested PCR

Iniciador	Origem	Gene	Seqüência nucleotídica (5'→3')	Tamanho do produto amplificado	Tm (°C)
N 17 kDa 1	<i>R. typhi</i>	17 kDa omp	CATTACTTGGTTCTCAATTCGGT	232 pb	64
N 17 kDa 2	<i>R. typhi</i>	17 kDa omp	GTTTTATTAGTGGTTACGTAA	232 pb	54

---

A reação de amplificação foi realizada conforme adaptações dos protocolos descritos por Webb *et al.*, 1990; Schriefer *et al.*, 1994; Regnery *et al.*, 1991 nas seguintes condições: 1) **PCR duplex**: uma pré desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55 °C por 3 minutos e extensão a 72 °C por 2 minutos, seguida de uma extensão final de 72°C por 7 minutos e 2) **nested PCR**: pré desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 50 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos, além de uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

Após a PCR, alíquotas de 5 µl do produto amplificado foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado pelo método da prata para verificação da amplificação dos fragmentos desejados (Sanguinetti *et al.*, 1994).

Os *pools* de DNA que se apresentaram positivos foram desmembrados, ou seja, alíquotas de cada amostra que o compunham foram amplificadas individualmente, utilizando os mesmos procedimentos citados acima.

#### **4.4.5) Teste de Sensibilidade da PCR**

Com o objetivo de se determinar o limiar de detecção da PCR foram feitas diluições sucessivas de DNA de carrapato infectado em DNA de carrapato não infectado.

As diferentes concentrações de DNA de carrapato infectado foram misturadas com DNA de carrapato não infectado e amplificadas em duplicata, partindo de uma alíquota inicial contendo 150 ng de DNA de carrapato infectado com *R. parkeri* até 150

---

ng de DNA de carrapato não infectado. As seguintes misturas foram feitas: 100 ng, 50 ng, 25 ng, 5 ng, 2,5 ng, 0,5 ng e 0,05 ng de DNA de carrapato infectado experimentalmente diluído em 50 ng , 100 ng , 125 ng , 145 ng , 147,5 ng, 149,5 ng e 149,95 ng de DNA de carrapato não infectado, respectivamente.

#### 4.5) SEQUENCIAMENTO

##### 4.5.1) Clonagem

O produto amplificado de uma amostra proveniente de um *pool* de pulgas do gênero *Ctenocephalides* foi clonado no vetor pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO do kit *TOPO TA cloning*<sup>®</sup> da Invitrogen. O vetor pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO fornecido nesse kit é um plasmídeo de fita dupla linearizado, de 3,9 kb que contém genes que conferem resistência a ampicilina e a kanamicina e o sistema operon *Lac Z* de *Escherichia coli*, dentro do qual encontra-se o sítio de clonagem. O sítio de clonagem é caracterizado pela presença de uma timina desapareada na extremidade 3' e uma topoisomerase covalentemente ligada, sendo o princípio de clonagem baseado na presença de um resíduo de desoxiadenosina na extremidade 3' do fragmento de PCR que é adicionado pela atividade terminal transferase independente de molde da enzima *Taq* DNA polimerase.

As reações foram realizadas de acordo com protocolo sugerido pelo fabricante. A clonagem foi feita à temperatura ambiente durante 5 minutos. Foram utilizados 4µL do produto fresco de PCR, 1µL do plasmídeo vetor (10ng/µl) em 50mM Tris-HCL pH 7,4 (a 25°C); 1mM EDTA, 1mM DTT; 0,1% Triton X-100; 100µg/mL BSA; 50%

---

glicerol e 1  $\mu\text{L}$  de solução salina contendo 1,2 M NaCl; 0,06 M  $\text{MgCl}_2$ , resultando um volume final de 6  $\mu\text{L}$  de produto de ligação.

#### **4.5.2) Transformação em célula bacteriana competente**

As células competentes foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBM) da Universidade Federal de Ouro Preto.

Para cada transformação foram adicionados cerca de 10 ng do plasmídeo recombinante (2  $\mu\text{L}$  do produto de ligação) a 100  $\mu\text{L}$  de célula quimicamente competente. A mistura foi mantida em gelo por 45 minutos e então submetida a um choque térmico a 42°C por 90 segundos, após o que foi imediatamente transferida para o gelo e incubada por mais 2 minutos. Em seguida foram adicionados 1 mL de meio Luria-Bertani (LB) sem antibiótico às células pré-incubadas com o DNA de interesse, sendo as mesmas submetidas a uma nova incubação, sob agitação, a 37°C durante 1 hora. Após esse período as células foram concentradas e plaqueadas em meio LB-ágar contendo 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$  ampicilina, 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  X-gal e 0,5 mM IPTG e incubadas a 37°C por aproximadamente 18 horas.

#### **4.5.3) Triagem das colônias recombinantes**

A triagem das colônias recombinantes foi feita visualmente. As colônias brancas (recombinantes) que surgiram após a transformação foram transferidas para

---

uma nova placa contendo LB-ágar, 100µL/mL ampicilina, 40 µg/mL X-gal e 0,5 mM IPTG com o auxílio de um palito estéril e incubadas a 37°C *overnight*, de forma a se obter réplicas das mesmas para posterior seleção de clones positivos. O mesmo palito utilizado para transferência das colônias foi também utilizado para inserção do *template* no *mix* de PCR e para o crescimento das colônias em meio LB líquido contendo 100µL/mL ampicilina.

#### **4.5.4) PCR de colônia**

A confirmação do tamanho do inserto das colônias recombinantes foi feita através de PCR. Utilizando-se um palito estéril, uma pequena parte da colônia recombinante foi adicionada ao *mix* de PCR contendo tampão com 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5mM dNTPs, 0,25 unidades de Taq DNA polimerase, todos da Invitrogen e 20 µM de cada iniciador (direto e reverso). A reação de PCR ocorreu nas seguintes condições: uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 2 minutos, seguida de um ciclo final cuja extensão ocorreu a 72°C por 7 minutos. O produto de PCR obtido foi analisado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,5 mg/ml.

---

#### 4.5.5) Purificação dos plasmídios recombinantes

As colônias recombinantes foram crescidas em 10 mL de meio LB (1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl pH 7,0) contendo ampicilina (100 µg/mL) a 37°C por aproximadamente 18 horas.

Para extração do DNA plasmidial foi utilizado o kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* da Promega. As amostras foram concentradas através de centrifugação a 14000 rpm por 5 minutos, sendo o sedimento celular ressuspensionado em 250 µL de solução de ressuspensão celular (10mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 7,5 e 100µg/ml RNase H). Após a ressuspensão das células, foram adicionados 250 µL de Solução de Lise Celular (0,2M NaOH e 1% SDS) e, em seguida, as amostras foram homogeneizadas por inversão dos tubos e incubadas à temperatura ambiente, por aproximadamente 5 minutos, até o clareamento da suspensão celular. Após esse passo, foram adicionados 10µL de Solução de Protease Alcalina misturando-se as amostras por inversão, as quais foram incubadas durante 5 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, foram adicionados 350 µL de Solução de Neutralização (4,09M hidrocloreto de guanidina, 0,759M acetato de potássio e 2,12M ácido acético glacial) com o objetivo de precipitar os restos celulares sendo as amostras imediatamente homogeneizadas por inversão. O lisado celular resultante foi então centrifugado a 14000 rpm (12000 x g) durante 10 minutos, sendo o sobrenadante transferido para uma coluna contendo uma resina de decantação. Essa coluna foi centrifugada a 14000 rpm (12000 x g) por 1 minuto, lavada com 750 µL de Solução de Lavagem da Coluna (10mM Tris-HCl pH 7,5, 60mM acetato de potássio e 60% etanol) e novamente centrifugada nas mesmas

---

condições anteriores. O processo de lavagem da coluna foi novamente repetido utilizando-se 250  $\mu$ L de Solução de Lavagem e o DNA plasmidial eluído com 100 $\mu$ L de água deionizada estéril, por centrifugação da coluna nas mesmas condições anteriores.

#### **4.5.6) Purificação dos produtos da PCR**

Alternativamente, produtos de PCR (*nested* PCR) foram purificados utilizando o *kit* Wizard<sup>®</sup> PCR preps DNA Purification Systems da Promega, de acordo com as recomendações do fabricante. 90 $\mu$ L de produto de PCR foram passados por uma mini-coluna com o auxílio de uma seringa. A seguir, a coluna foi lavada com isopropanol 80% e o DNA eluído com água estéril destilada e deionizada. O produto obtido foi então quantificado e submetido ao seqüenciamento direto.

#### **4.5.7) Quantificação do DNA plasmidial e dos produtos da PCR**

O DNA plasmidial e os produtos da PCR purificados conforme descrito acima, foram analisados em gel de agarose 1 % em TAE 0,5X corado com brometo de etídio (0,5mg/mL).

#### **4.5.8) Reação de seqüenciamento**

Ambas as fitas dos DNA's plasmidial e dos produtos de PCR purificados foram seqüenciadas utilizando-se o kit ABI PRISM BigDye III Terminator Cycle Sequencing

---

*Ready Reaction* da Applied Biosystems, um *kit* cuja a reação de seqüenciamento baseia-se na técnica de terminação da cadeia por incorporação de dideoxynucleotídeos (ddNTPs), descrita por Sanger *et al.* (1977).

A reação de amplificação foi conduzida nas seguintes condições: desnaturação inicial a 96°C por 2 min, seguido por 30 ciclos compostos por desnaturação a 96°C durante 30 s, anelamento a 50°C por 20 s, extensão a 60°C durante 4 min e uma extensão final a 60°C durante 10 minutos.

As reações de seqüenciamento foram realizadas em um volume final de 20 µL contendo 8 µL de *mix* fornecido no *kit* de seqüenciamento, 10 pmoles de um *primer* e 200 a 500 ng do DNA a ser seqüenciado. Os produtos de extensão, produzidos na reação de seqüenciamento, foram purificados pela adição de 2 µL de NaOAc 3 mmoles e 50 µL de etanol 96% e incubação à temperatura ambiente por 15 min. Os fragmentos foram coletados por centrifugação a 16.000 x *g* por 20 min. O precipitado foi lavado com 200 µL de etanol 70%, centrifugado por 5 minutos, seco à temperatura ambiente, ressuspendido em 5 µL do tampão de corrida (1 volume de azul de bromofenol e 5 volumes de formamida), desnaturado a 95°C por 5 min e mantido no gelo até o momento de sua aplicação em gel desnaturante de poliacrilamida 4,5%. A fluorescência emitida pelos oligonucleotídeos foi coletada por uma câmara CCD e automaticamente convertida em seqüências de nucleotídeos armazenadas na forma de cromatogramas.

---

#### **4.5.9) Análise da seqüência nucleotídica**

Com o objetivo de melhorar a comparação das seqüências obtidas com as seqüências depositadas, ambas as fitas, direta e reversa, foram alinhadas utilizando-se o programa *ClustalW*, disponível no endereço eletrônico (<http://www.workbench.sdsc.edu>), editadas utilizando o programa Chromas (<http://technelysium.com.au/chromas.html>) e submetidas à pesquisa de homologia com outras seqüências depositadas no *GenBank*, utilizando o programa BLASTn (Altschul *et al.*, 1997).

### **4.6) SOROLOGIA**

#### **4.6.1) Reação de Imunofluorescência Indireta**

Foram coletadas amostras de sangue de 91 animais presentes no domicílio e peri-domicílio do bairro da Cadeia, sendo 73 amostras de cães e 18 amostras de cavalos. Dez mililitros de sangue foram coletados através de venocentese da cefálica em cães ou da jugular em cavalos e identificados de acordo com o animal de origem e proprietário. O soro foi obtido através de centrifugação das amostras a 3000 rpm por 10 minutos e congelados em tubos de polipropileno a  $-20^{\circ}\text{C}$ , até o momento da análise.

As análises foram feitas no laboratório Referência Estadual para Riquetsioses da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) em Belo Horizonte, Minas Gerais. Alíquotas de soro diluídas em tampão fosfato (PBS pH 7,2) foram depositadas sobre lâminas contendo

---

antígeno específico contra *R. rickettsii* e incubadas a 37°C por minutos. A cada lâmina foi adicionado o conjugado total *Fluorine H* da Biolab<sup>®</sup> anti IgG anti-cão e anti-equino, marcados com isotiocianato de fluoresceína, na diluição de 1:250. Os soros foram testados na diluição 1:64, sendo este o ponto de corte utilizado. Quando positivos, os soros foram testados até a última diluição reativa (Dumler e Walker, 1994 ).

---

## 5. *R*ESULTADOS

---

## 5.1) COLETA DE VETORES

Durante as visitas realizadas entre os meses de maio de 2002 a março de 2003 foram coletados 2241 carrapatos e 379 pulgas.

As pulgas foram identificadas como pertencentes ao gênero *Ctenocephalides*.

A identificação taxonômica dos carrapatos adultos, realizada segundo a chave dicotômica e pictórica descrita por Aragão & Fonseca (1961) permitiu a identificação das espécies *A. cajennense*, *R. sanguineus* e *Anocentor nitens*. A distribuição das espécies está mostrada no gráfico 1 onde pode ser observada uma predominância da espécie *A. cajennense*.

A dinâmica sazonal das espécies *A. cajennense* no município de Caratinga apresentou os três estádios parasitários bem distribuídos ao longo do ano. As larvas predominaram entre os meses de junho a setembro, as ninfas de setembro a dezembro e os carrapatos adultos de outubro a março, conforme mostrado no gráfico 2.

Quanto a dinâmica sazonal da população de *R. sanguineus* no município de Caratinga (gráfico 3), pôde-se observar o predomínio de larvas entre os meses de junho a setembro, ninfas de setembro a novembro e adultos de dezembro a março.

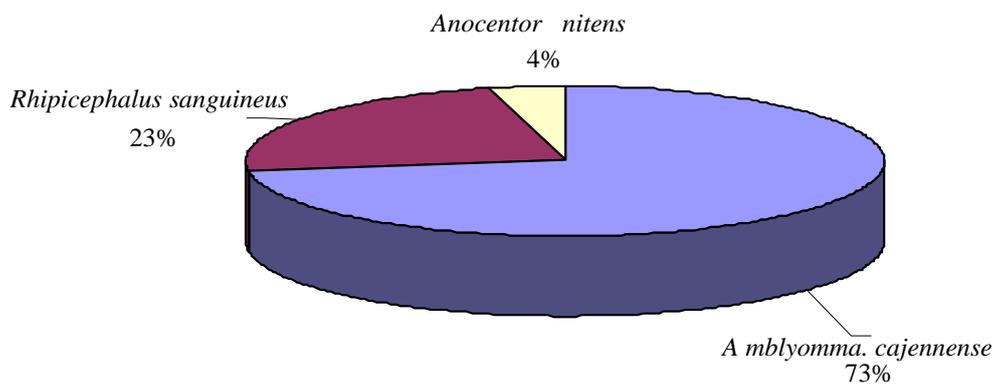


Gráfico 1 – Distribuição de ixodídeos coletados no município de Caratinga, Minas Gerais, de acordo com a espécie.

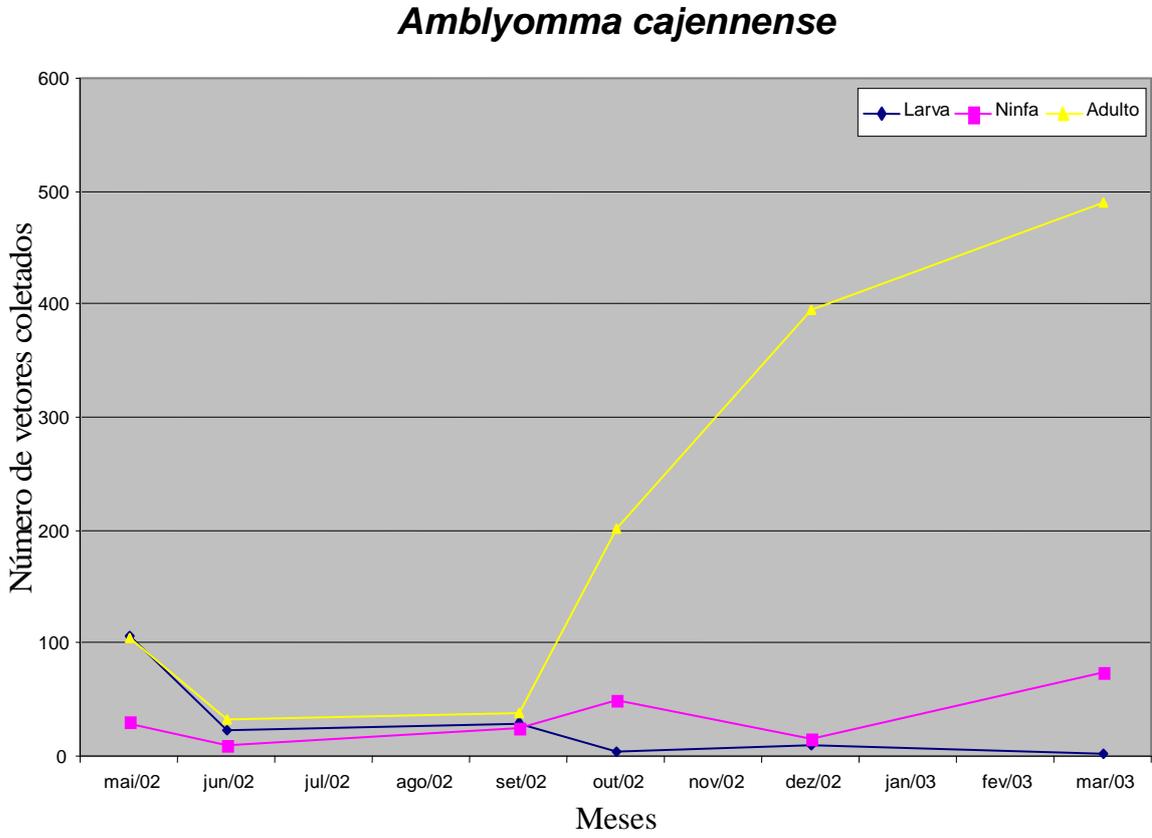


Gráfico 2 – Distribuição sazonal da população do *Amblyomma cajennense* no município de Caratinga, Minas Gerais.

### *Rhipicephalus sanguineus*

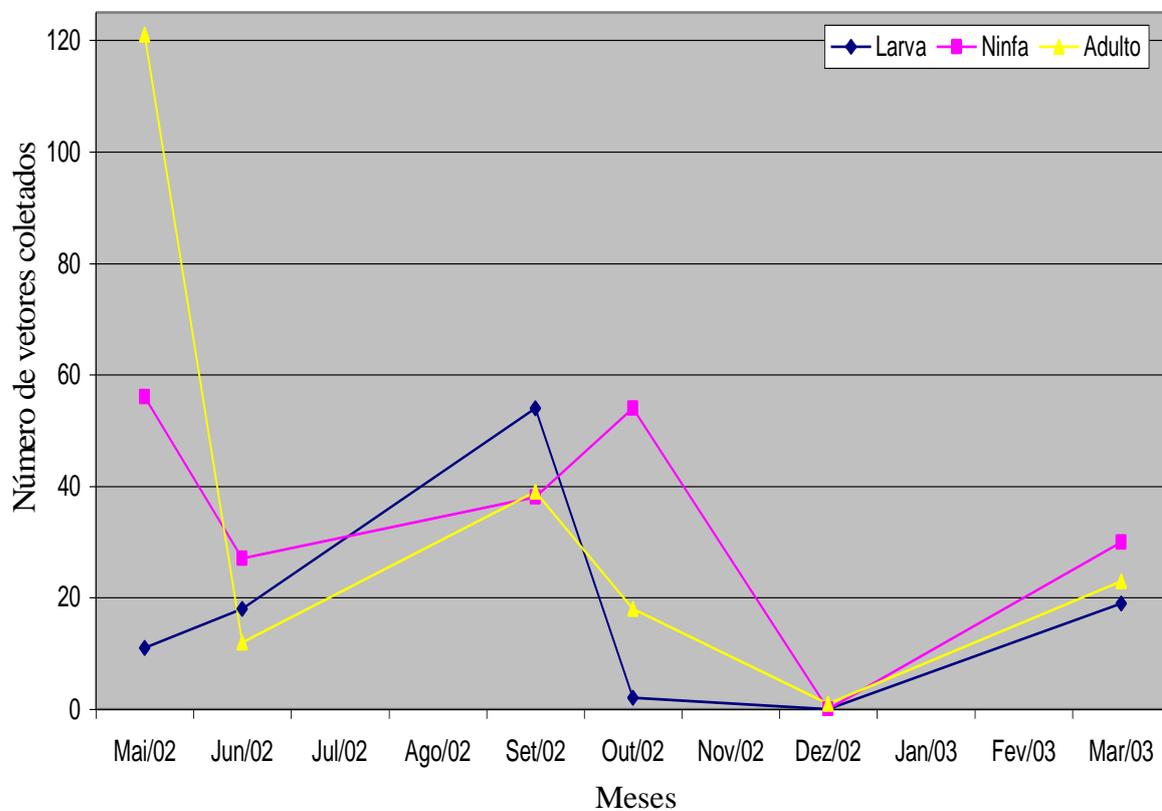


Gráfico 3 – Distribuição sazonal da população de *Rhipicephalus sanguineus* no município de Caratinga, Minas Gerais.

---

## **5.2) EXTRAÇÃO DE DNA**

O método de extração utilizado possibilitou a obtenção de quantidades satisfatórias de DNA genômico total, isto é: DNA do vetor, DNA do hospedeiro (vetores alimentados) e DNA de riquetsial (vetores infectados).

## **5.3) PADRONIZAÇÃO DA PCR**

### **5.3.1) Infecção experimental de carrapatos**

Dos 10 carrapatos da espécie *A. cajennense* coletados para realização da infecção experimental, nenhum apresentou forma intracelular característica de riquetsia nos hemócitos, sendo todos negativos ao teste da hemolinfa realizado na triagem.

Após a inoculação experimental dos mesmos utilizando *R. parkeri*, obteve-se 100% de infecção comprovada por reação positiva ao teste da hemolinfa, observando-se formas baciliformes vermelhas, características de riquetsia.

### **5.3.2) Teste de sensibilidade da PCR**

O sistema duplex PCR testado mostrou-se viável, sendo capaz de detectar, em uma única reação, a presença de DNA de riquetsial até 25 ng de DNA de carrapato experimentalmente infectado com *R. parkeri* em 300 ng de DNA total (figura 4).

---

A utilização do sistema *nested* também mostrou-se viável e sensível, sendo capaz de aumentar o limiar de detecção da PCR para 50 pg de DNA de carrapato infectado em 300 ng de DNA de carrapato não infectado.

#### **5.4) PCR duplex e nested PCR**

Dos 119 *pools* submetidos à PCR, 13,4% (n=16) apresentaram-se positivos, sendo 37,5% (n=6) compostos por DNA de pulga e 62,5% (n=10) compostos por DNA de carrapato.

Destes 16 *pools* positivos, 31,2% (n=5) apresentaram-se positivos à PCR duplex e 68,8% (n=11) mostraram-se positivos somente na *nested* PCR (figura 4).

#### **5.5) Seqüenciamento**

Dos 6 *pools* positivos obtidos a partir de DNA de pulga, todos eram compostos por pulgas do gênero *Ctenocephalides* e um deles foi submetido ao seqüenciamento automático, obtendo-se uma riquésia com 100% de homologia com *R. felis* (figura 5).

Dos 10 *pools* positivos obtidos a partir de DNA de carrapato, 3 foram seqüenciados sendo 2 *pools* compostos por carrapatos da espécie *A. cajennense* e outro por *R. sanguineus* (tabela 3).

A análise do fragmento amplificado a partir dos *pools* de *A. cajennense* nos forneceu uma riquésia com 100% de homologia com *R. felis* e outra com 97% de homologia com *R. rickettsii* e *R. honei*. A análise do fragmento obtido a partir do pool

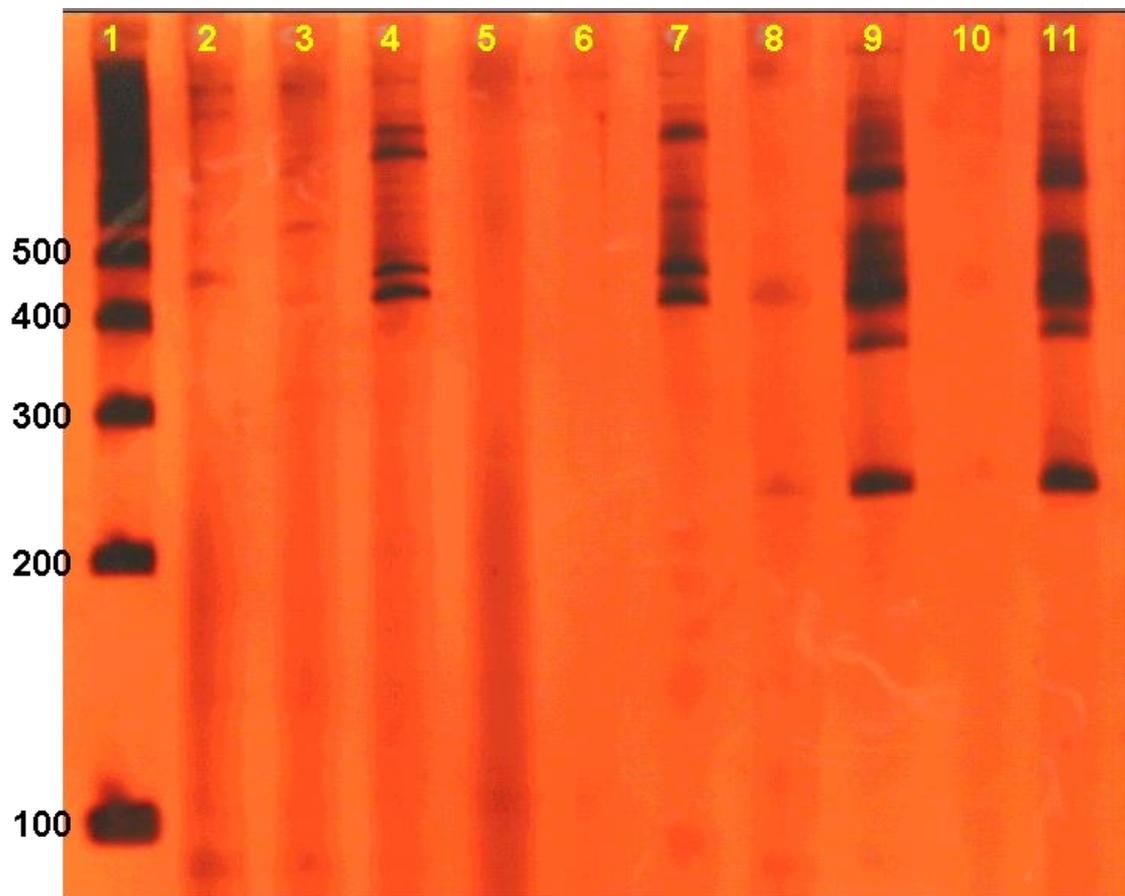
de *R. sanguineus* nos forneceu uma riquétisia, após edição, com 100% de homologia com *R. felis*.

Tabela 3- Resultado do seqüenciamento de produtos positivos de PCR de acordo vetor e animal de origem

Pool	Gênero/espécie	Animal de origem	Mês de coleta	Riquétisia encontrada
06	<i>Ctenocephalides</i> spp.	cão	junho	<i>R. felis</i>
21	<i>A. cajennense</i>	eqüino	dezembro	<i>R. felis</i>
22	<i>R. sanguineus</i>	cão	setembro	<i>R. felis</i>
28	<i>A. cajennense</i>	eqüino	setembro	<i>R. rickettsii</i> <i>R. honei</i>

### 5.6) Sorologia animal

Dos 73 soros de cães analisados, nenhum mostrou-se positivo à RIFI. Com relação aos soros de eqüinos, das 18 amostras submetidas à sorologia, 17% (n=3) apresentaram-se positivas à RIFI nos títulos 1:64 e 1:128 (gráfico 4).



**Figura 4** - Gel de poliacrilamida 8% corado pela prata de produto amplificado de PCR duplex usando os pares de *primers* CS.877p, Cs.1258n e 17kDa R e F; e produto amplificado de *nested* PCR usando o par *primers* n 17kDa R e F. **Canaleta 1:** marcador de peso molecular (100pb). **Canaletas 2 a 5:** PCR duplex de amostras de campo. **Canaleta 6:** controle negativo (duplex). **Canaleta 7:** controle positivo (duplex) (*R. parkeri*). **Canalates 8 e 9:** *nested* PCR das amostras 2 e 3, respectivamente. **Canaleta 10:** controle negativo (*nested* PCR). **Canaleta 11:** controle positivo *nested* PCR (*R. parkeri*).

---

```
gctcttgcaacttctatggtacaagcctgtaacggaccaggcggtatgaataaacaaggt
gctcttgcaagcttctatggtacaagcctgtaacggaccaggcggtatgaataaacaaggt

acgggaacacttcttggctgtgcccggcggtgcattacttggttctcaattcggcaagggc
acgggaacacttcttggcggtgcccggcggtgcattacttggttctcaattcggcaagggc

aaggacagcttgtcggagtaggtgtaggtgcattacttggagcagttcttggtgacaa
aaaggacagcttgtcggagtaggtgtaggtgcattacttggagcagttcttggtgacaa

ataggtgcaggtatggatgagcaggatagaagacttgcgaactcacttcacaaagagct
ataggtgcaggtatggatgagcaggatagaagacttgcgaactcacttcacaaagagct

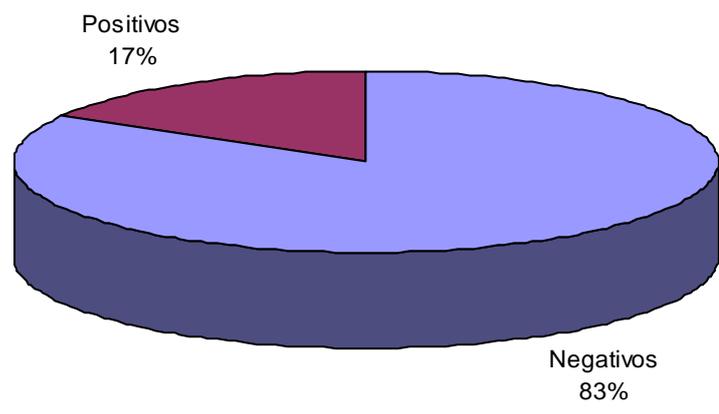
ttagaagcaacacctagcggcactagcgtagaatggcgtaatccggataacggtaatcat
ttagaagcaacacctagcggcactagcgtagaatggcgtaatccggataacggtaatcat

ggttacgtaaacacctaataaaaacttatagaatagcactgggtcaatattgccgtgagtac
ggttacgtaaacacctaataaaaacttatagaatagcactgggtcaatattgccgtgagtac

actcaaacagttgtaatagggcgaaaacaacaaaaagcatacggtaatgcatgccgccaa
actcaaacagttgtaatagggcgaaaacaacaaaaagcatacggtaatgcatgccgccaa

cctgacg
cctgacg
```

**Figura 5** – Alinhamento da seqüência do fragmento do gene 17 kDa. Seqüência em azul representa a seqüência do fragmento do gen 17 kDa da *R. felis* obtida no sequenciamento e a seqüência em vermelho representa a seqüência do mesmo fragmento depositada no *GenBank*.



**Gráfico 4** - Resultado da pesquisa de anticorpos anti *Rickettsia rickettsii* em soro de eqüinos utilizando-se a RIFI .

---

## 5. *D*ISSCUSSÃO

---

As pulgas e carrapatos foram os principais ectoparasitas coletados durante as visitas realizadas no bairro da Cadeia, no município de Caratinga, os quais foram encontrados parasitando animais domésticos no domicílio e peri-domicílio.

Todas as pulgas coletadas foram classificadas como pertencentes ao gênero *Ctenocephalides* e foram encontradas parasitando cães e gatos. O gênero *Ctenocephalides* possui ampla distribuição mundial e amplo espectro de hospedeiros, sendo um dos parasitas mais comuns em cães e gatos, além de se alimentar também em humanos (Márquez *et al.*, 2002; Kenny *et al.*, 2003).

Dos 6 *pools* positivos obtidos a partir de DNA de pulga, todos eram compostos por pulgas do gênero *Ctenocephalides*, sendo um deles submetidos ao seqüenciamento, o qual revelou uma riquetsia com 100% de homologia com *R. felis*.

O achado de pulgas do gênero *Ctenocephalides* infectadas com *R. felis*, detectado através de PCR, são uma evidência de que a *R. felis* pode representar uma espécie de importância epidemiológica relevante na região estudada.

A *R. felis* inicialmente designada agente ELB, é uma bactéria transmitida por pulgas do gênero *Ctenocephalides*, as quais também atuam como reservatórios devido a transmissão transovariana (Azad *et al.*, 1992; Higgins *et al.*, 1996; Bouyer *et al.*, 2001). Sua distribuição está ligada a presença do inseto vetor e até o presente momento, foram detectadas em populações de pulgas nas Américas do Sul, Norte e Europa (Oliveira *et al.* 2002; Márquez *et al.*, 2002).

*R. felis* foi descrita pela primeira vez em 1990, por microscopia eletrônica, em células epiteliais do intestino de pulgas da espécie *Ctenocephalides felis*, investigadas como possíveis vetores da *R. typhi* (Adams *et al.*, 1990), sendo sua posição taxonômica

---

dentro do gênero *Rickettsia* obtida através de comparação da seqüência genômica do fragmento amplificado da proteína antigênica 17kDa, a partir de tecido infectado de pulgas (Azad *et al.*, 1992). Sua patogenicidade ao homem tem sido demonstrada através de sua detecção, por PCR em humanos nos Estados Unidos (Schriefer *et al.*,1994), México (Zavala-Velasquez *et al.*, 2000), Brasil (Raoult *et al.*, 2001) e Europa (Richter *et al.*, 2002) e em pulgas do gênero *Ctenocephalides* no Brasil (Oliveira *et al.*, 2002), Espanha (Márquez *et al.*, 2002) e Reino Unido (Richter *et al.*,2002) .

Cabe ainda ressaltar que o tifo murino, causado pela *R. typhi*, era até pouco tempo, considerada a única riquetsiose transmitida por pulgas. No entanto, em função da ampla distribuição mundial da *R. felis* e do vetor, deve-se levar em consideração sua participação na patogenia de doenças semelhantes ao tifo murino e a febre maculosa.

Em humanos, *R. felis* pode produzir uma síndrome clínica semelhante ao tifo murino (Schriefer *et al.*,1994), podendo estar implicada em casos humanos compatíveis com tifo (Richter *et al.*,2002), embora Galvão et al 2004 tenham sugerido uma possível gravidade do mesmo nos casos ocorridos no Brasil e no México,o que torna necessário a sua distinção também da FMB.

Assim, a presença de *R. felis* em pulgas representa um indicador da possibilidade de surgimento de outras riquetsioses humanas na região, além de atestar sua potencialidade vetorial na transmissão de riquetsioses.

Neste estudo, as espécies *A. cajennense* e *R. sanguineus* foram encontradas de maneira importante em cães e eqüinos, o que chama a atenção para a possibilidade de participação destes animais na epidemiologia das riquetsioses na região.

---

O gênero *Amblyomma*, o mais frequente no Brasil, é o de maior importância médica, já que inclui as principais espécies que parasitam humanos. Dentre elas, *A. cajennense*, *Amblyomma aureolatum* e *Amblyomma cooperi*, *Amblyomma striatum* as quais estão incriminadas na manutenção enzoótica e na transmissão da febre maculosa para humanos (Dias e Martins, 1939; Lemos *et al.*, 1996a; Figueiredo *et al.*, 1999; Labruna *et al.*, 2001).

O *A. cajennense* no Brasil, é encontrado em abundância em todos os estados da região sudeste e centro-oeste, porém com distribuição limitada nas demais regiões. É a principal espécie de carrapato que parasita seres humanos no centro-sul brasileiro e é considerado o principal vetor da FMB (Dias e Martins, 1939).

Padrão de distribuição de ixodídeos semelhante ao encontrado neste estudo, no qual há predomínio da espécie *A. cajennense*, foi anteriormente descrito por Lima *et al.*, 1995 e Lemos *et al.*, 1997 em estudos realizados em áreas endêmicas do estado de São Paulo, o que nos leva a crer que haja maior prevalência desta espécie em áreas endêmicas para febre maculosa.

O achado de carrapatos da espécie *R. sanguineus* infectado por *R. felis* representa um achado inédito na literatura, enquanto o achado de carrapatos da espécie *A. cajennense* infectado por *R. felis* já foi descrito por Galvão *et al.*, 2002, sendo ambos passíveis de confirmação, já que há uma controvérsia com relação a identidade genética da espécie encontrada devido a especificidade parasitária das riquetsias.

Com relação ao achado das espécies *R. rickettsii* e *R. honei* em *A. cajennense*, a metodologia utilizada não permitiu a diferenciação entre as duas espécies encontradas, pois os iniciadores utilizados na reação de seqüenciamento codificam um fragmento

---

altamente conservado dentro do gênero *Rickettsia*, não permitindo concluir sobre a identidade específica dos agentes investigados, fazendo-se necessárias novas caracterizações utilizando outros fragmentos espécie-específicos.

O estudo sorológico de potenciais hospedeiros forneceu valiosas informações sobre o ciclo epidemiológico da doença em Caratinga.

No inquérito sorológico realizado no bairro da Cadeia, nenhum dos soros caninos mostrou-se reativo à RIFI utilizando antígeno específico de *R. rickettsii* enquanto 17% dos soros eqüinos mostraram-se reativos.

Resultados positivos à RIFI indicam infecção por riquetsia do GFM, mas não identificam a espécie, podendo-se tratar inclusive de uma espécie não patogênica do GFM devido a possibilidade de reatividade cruzada entre riquetsias de um mesmo grupo (Philip *et al.*, 1976).

No Brasil os cães vêm sendo indicados como animais sentinelas da situação epidemiológica da FM em regiões endêmicas. No entanto, nas áreas rurais da região Sudeste, os eqüinos são os principais hospedeiros para todos os estágios do *A. cajennense*, incriminado como principal vetor da FMB (Lemos *et al.*, 1996a).

Também em Caratinga, os eqüinos foram encontrados como os principais hospedeiros do *A. cajennense*, fato este que reforça o papel sentinela dos eqüinos na cadeia epidemiológica da FMB na região, fato esse comprovado a partir de sorologia positiva para *R. rickettsia* nos mesmos, demonstrando a circulação de riquetsias do GFM no foco estudado, cabendo aos cães o papel de possíveis carreadores de vetores infectados para o domicílio conforme já sugerido por Lemos *et al.*, 1997.

---

Assim, os eqüinos podem representar um dos principais elos na cadeia epidemiológica das riquetsioses na região, pois são capazes de albergar grandes infestações de carrapatos. Associado a isso há o fato de serem animais de livre movimentação, criados soltos e utilizados para o transporte, podendo dispersar carrapatos infectados, os quais podem se estabelecer em outras áreas provocando assim, o surgimento de novos focos.

O cão assim como o cavalo é um animal próximo ao homem, e pode como aqui já discutido, ter também um importante papel na cadeia epidemiológica da FM. A ausência de sorologia positiva no cão, associado a ausência de casos humanos diagnosticados no local nos últimos 12 anos parece ser importante para a caracterização de foco inativo porém, a presença de sorologia positiva em eqüinos, considerando o papel desses animais como sentinela, apontam para necessidade de se manter um sistema de vigilância epidemiológica no local e na região.

Embora a distribuição sazonal da população de vetores não tenha sido objetivo de nosso trabalho, a análise dos diferentes estádios evolutivos das espécies *R. sanguineus* e *A. cajennense* permitiu determinar a variação sazonal destas populações em Caratinga no ano de 2002, as quais apresentaram um padrão de distribuição sazonal semelhante ao já descrito no sudeste do país, com cada uma das espécies completando apenas uma geração por ano e, apesar de serem encontrados os três estádios em qualquer mês, ocorreram picos de determinados estádios em determinados meses: larvas em maio, ninfas em outubro e adultos em março, com tendência de aumento da população de ixodídeos ao longo do ano, na região estudada.

---

O *A. cajennense* completa uma geração por ano no sudeste do Brasil, mostrando os 3 estádios parasitários marcadamente distribuídos ao longo do ano. As larvas predominam de abril a julho; as ninfas de julho a outubro e os adultos predominam nos meses quentes e chuvosos, de outubro a março (Oliveira , 1998; Labruna *et al.*, 2002).

Magnarelli *et al.*, 1981, observaram que a prevalência de carrapatos infectados detectados por IFD é a mesma tanto em áreas endêmicas como em áreas não endêmicas, fato este que reduz aparentemente a importância do carrapato como indicador de atividade riquetsial em uma determinada área, isto é, embora a presença do ixodídeo infectado seja necessária, ela não é suficiente para produzir casos humanos.

Dessa forma, para que haja atividade riquetsial seria necessária a coexistência de uma relação de positividade entre vetores, hospedeiros e reservatórios, incluindo animais silvestres.

Assim, baseado nos dados obtidos no município de Caratinga, podemos concluir que o mesmo apresenta nível de endemicidade diferente das demais áreas do país reconhecidamente endêmicas. Embora se tenha detectado a presença de anticorpos anti riquetsia do GFM no cavalo e apesar de detecção molecular de riquetsias patogênicas do GFM em artrópodes vetores, não há registro sistemático de casos de FM na região nos últimos 12 anos, o que a coloca o município num nível de baixa transmissão, embora o risco ainda exista. Desse modo, esses achados recomendam uma vigilância epidemiológica no local bem como na região.

---

## **6 - CONCLUSÕES**

---

A partir deste trabalho conclui-se que:

1. O gênero *Amblyomma* na região de Caratinga, assim como na região sudeste, representa o gênero mais numeroso;
2. A distribuição sazonal das espécies *A. cajennense* e *R. sanguineus* na região de Caratinga apresentou o mesmo padrão descrito na região sudeste do país para tais espécies;
3. O sistema duplex mostrou-se viável eliminando a necessidade de realização de PCR simples para cada um dos *primers* isoladamente, resultando em economia de material e tempo;
4. O sistema *full-nested* também mostrou-se viável e sensível, sendo capaz de aumentar, consideravelmente, o limiar de detecção do parasita em artrópodes vetores;
5. Análise da sequência nucleotídica do produto de PCR obtido a partir de pulgas do gênero *Ctenocephalides* utilizando iniciadores internos do gene 17 kDa mostrou 100% de homologia com *R. felis*;

- 
6. A seqüência obtida a partir do produto de PCR obtido de carrapatos da espécie *R. sanguineus* apresentou 100% de homologia com *R. felis*;
  7. A seqüência obtida a partir do produto de PCR obtido de carrapatos da espécie *A. cajennense* apresentou 97% de homologia com *R. rickettsii* e *R. honei*;
  8. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação do fragmento de riquetsia obtido a partir de carrapatos da espécie *A. cajennense* não permitiram concluir sobre a identidade específica das espécies encontradas;
  9. Nenhum cão apresentou sorologia positiva frente a pesquisa de anticorpos anti *R. rickettsii*;
  10. Dos eqüinos submetidos a RIFI 17% mostraram-se reativos nos títulos 1:64 e 1:128;
  11. A ausência de sorologia positiva no cão, associado a ausência de casos humanos diagnosticados no local nos últimos 12 anos parece ser importante para a caracterização de foco inativo;
  12. A presença de *R. felis* em pulgas e carrapatos é um indicador da possibilidade de transmissão de novas riquetsioses humanas na região;

---

13. A presença de sorologia positiva em eqüinos, considerando o papel desses animais como sentinela, apontam para necessidade de se manter um sistema de vigilância epidemiológica no local e na região.

---

## **7 - *P*ERSPECTIVAS**

- 
- Empregar o *Western blot* na diferenciação de soros positivos à RIFI;
  - Realizar testes sorológicos utilizando outros antígenos do GFM, como por exemplo, antígeno de *R. felis*;
  - Isolar *Rickettsia* spp. a partir de vetores e pacientes;
  - Investigar e analisar a importância do ciclo silvestre da doença e seu elo com o ciclo domiciliar e peri-domiciliar;
  - Estabelecer uma proposta de sistema de vigilância epidemiológica e controle de riquetsioses para a região estudada;
  - Desmembrar e sequenciar os demais *pools* positivos encontrados;
  - Desenhar novos oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos;
  - Criar controles internos de PCR.



## 8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ADAMS, J.R.; SCHMIDTMENN, E.T.; AZAD, A.F. (1990). Infection of colonized cat fleas, *Ctenocephalides felis* (Bouché), with a rickettsia-like microorganism. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. n.43, p.400-409.

ATWOOD, E.L.; LAMB, JR.J.T.; SONENSHINE, D.E. (1965). A contribution to the epidemiology of Rocky Mountain spotted fever in the eastern United States. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v.14, n.5, p.831-837.

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

BACELLAR, F.C. Rickettsias isoladas em Portugal: contribuição para identificação e classificação de estirpes. **Tese de Doutorado**, Universidade de Évora, 1996

BILLINGS, A.N.; YU, X.J.; TEEL, P.D.; WALKER, D.H. Detection of spotted fever group *Rickettsia* in *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in South Texas. **Journal of Medical Entomology**. v.35, n.4, p.474-478, 1998

BOUYER, D.H.; STENOS, J.; CROCQUET-VALDES, P.A. *Rickettsia felis*: molecular characterization of a new member of the spotted fever group. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.51, p.339-347, 2001.

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

BURGDORFER, W. A review of Rocky Mountain spotted fever (tickborne typhus), its agent, and its tick vectors in the United States. **Journal of Medicine and Entomology**. v.12, n.3, p.269-278, 1975.

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

BURGDORFER, W.; HAYES, S.F., MAVROS, A.J. Nonpathogenic *Rickettsiae* in *Dermacentor andersoni*: a limiting factor for the distribution of *Rickettsia rickettsii*.

---

**Rickettsiae and rickettsial diseases.** VEDA Publishing House of the Slovak Academy of Sciences, Bratislava, 1981.

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

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

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

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

DOBSON, M.E.; AZAD, A.F.; DASCH, G.L.; WEBB, L.; OLSON, J.G. Detection of murine typhus infected fleas with an enzyme-linked immunosorbent assay. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v.40, n.3, p.521-528, 1989.

DUMLER, S.J.; WALKER, D.H. Diagnostic tests for Rocky Mountain spotted fever and other rickettsial diseases. *Dermatologic Clinics*. n.12, p.25-36, 1994.

EREMEEVA, M. E.; DASCH, G.A. *RICKETTSIAE*. In: Lederberg, **Encyclopedia of Microbiology**. v.4, 2<sup>a</sup> ed., p.140-180. New York Academic Press, 2000.

EREMEEVA, M.E.; YU, X.; RAOULT, D. Differentiation among spotted fever group Rickettsiae species by analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA. *Journal of Clinical Microbiology*. v.32; n.3; p.803-810, 1994

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

---

FONSECA, F. Validade da espécie e ciclo evolutivo do *Amblyomma striatum* KOCH, 1844 (Acarina; Ixodidae). **Memórias do Instituto Butantã**. v.9, p.43-58, 1935.

FRIEDHOFF, K.T. Interaction between parasite and tick vector. **International Journal of Parasitology**. v.20, n.4, p.525-535, 1990.

GALVÃO, M.A.M. A febre maculosa brasileira em Minas Gerais e seus determinantes. **Dissertação de mestrado**. Escola Nacional de Saúde Pública, 1988.

GALVÃO, M.A.M. Febre maculosa em Minas Gerais: um estudo sobre a distribuição da doença no Estado e seu comportamento em área de foco peri-urbano. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Minas Gerais, 1996.

GALVÃO, M.A.M.; BOUYER, D.H.; OLANO, J.P.; CERQUEIRA LEITE, R.; WALKER, D.H. (*Rickettsia felis* in *Amblyomma cajennense* ticks, Brazil. **International Conference on rickettsiae and rickettsial diseases**. Book of Abstracts. Slovenia, 2002a

GALVÃO, M.A.M.; CALIC, S.B.; CHAMONE, C.B.; MAFRA, C.L.; FILHO, G.C.; OLANO, J.P.; WALKER, D.H. Spotted fever rickettsioses in Coronel Fabriciano, Minas Gerais state. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.36, n.4, p.479-481, 2003.

GALVÃO, M.A.M.; LAMOUNIER, J.A.; BONOMO, E.; REZENDE, E.G.; CALIC, S.B.; CHAMONE, C.B.; MACHADO, M.C.; OTONI, M.E.A.; LEITE, R.C.; CARAM, C.; MAFRA, C.L.; WALKER, D.H. (). Riquetsioses emergentes e reemergentes numa região endêmica do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. v.18, n.6, p.1593-1597. 2002b

GALVÃO, M.A.M.; MENDONÇA, E.F.; TEIXEIRA, R.I.; DUTRA, A.J.L.; HOST, H.H.; COSTA, P.R.R. Relato de investigação epidemiológica de um provável surto de riquetsiose em Grão Mogol-Minas Gerais. **Cadernos do Internato Rural**. v.2; n.1; p.61-79, 1983.

GOMES, L.S. Typho exanthematico de São Paulo. **Brasil Médico**. v.17, n.52, p.919-921, 1933.

---

GONÇALVES, A.J.R.; LOPES, P.F.A.; MELO, J.C.P.; PEREIRA, A.A.; PINTO, A.M.M.; LAZERA, M.S.; SOUZA, M.L.S.; TEIXEIRA, C.R.V.; OLIVEIRA, J.C.; DUARTE, F. Riquetsioses: a propósito de quatro casos diagnosticados no Rio de Janeiro de febre maculosa brasileira. **Folha Médica**. v.82, n.2, p.127-134, 1981.

HARDEN V.A. Rocky Mountain spotted fever. The Johns Hopkins University Press, 1990.

HACKSTADT, T.; MESSER, R.; CIEPLAK, W.; PEACOCK, M.G. Evidence for proteolytic cleavage of the 120 kilodalton outer membrane protein of Rickettsiae: Identification of an avirulent mutant deficient in processing. **Infection and Immunity**. V.60, n.1, p.159-165, 1992.

HAYES, S.F.; BURGDORFER, W. Reactivation of *Rickettsia rickettsii* in *Dermacentor andersoni* ticks: an ultrastructural analysis. **Infection and Immunity**. v.37, n.2, p.779-785, 1982.

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

HOOGSTRAAL, H. Ticks in relation to human diseases caused by *Rickettsia* species. **Annual Reviews of Entomology**. v.12, p. 377-420, 1967.

HORTA, M.C. Pesquisa de infecção por riquetsia do grupo da febre maculosa em humanos, cães, equídeos e em diferentes estádios de vida do *Amblyomma cajennense*, proveniente de uma área endêmica do estado de São Paulo. **Dissertação de mestrado**. Universidade de São Paulo, 2002

KATZ M.; DESPOMMIER, D.D.; GWADZ R.W. The Arthropods. The Arachnids. **Parasitic Diseases**, 2<sup>a</sup> ed., p.241-249, 1994.

KAUFMAN, W.R. Tick-host interaction: a synthesis of current concepts. **Parasitology Today**. v.5, n.2, p.47-56, 1989.

KENNY, M.J.; BIRTLES, R.J.; DAY, SHAW, S.E. *Rickettsia felis* in the United Kingdom. **Emerging Infectious Diseases**, v.9; n.8,

---

LABRUNA, M.B.; BOUYER, D.H.; MCBRIDE, J.W.; CAMARGO, L.M.A.; CAMARGO, E.P.; WALKER, D.H. Rickettsia species infecting *Amblyomma cajennense* ticks in Rondonia, western Amazon, Brazil. **American Society for Rickettsiology** 18<sup>th</sup> Meeting. Book of Abstracts. p.52. Florida, 2003a.

LABRUNA, M.B.; HORTA, M.C.; BOUYER, D.H.; MCBRIDE, J.W.; GENNARI, S.M.; WALKER, D.H. Rickettsia species infecting *Amblyomma cooperi* ticks Brazil. **American Society for Rickettsiology** 18<sup>th</sup> Meeting. Book of Abstracts. p.53. Florida, 2003b.

LABRUNA, M.B.; KASAI, N.; FERREIRA, F.; FACCINI, J.H.; GENNARI S.M. Seasonal dynamics of ticks (Acari:Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v.105, p.65-67, 2002.

LANE, R.S.; STUBBS H.A. Host-seeking behavior of adult *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) as determined by flagging vegetation. **Journal of Medicine Entomology**. v.27, n.3, p.282-287, 1990.

LA SCOLA, B.; MECONI, S.; FENOLLAR, F.; ROLAIN, J.M.; ROUX, V.; RAOULT. Emended description of *Rickettsia felis* (Bouyer e cols. 2001), a temperature-dependent cultures bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.52, p.2035-2041, 2002.

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

LEMOS, E.R.S.; ALVARENGA, F.B.F.; CINTRA, M.L.; RAMOS, M.C.; PADDOCK, C.D.; FERREBEE, T.L.; ZAKI, S.R.; FERREIRA, F.C.C.; RAVAGNANI, R.C.; MACHADO, R.D.; GUIMARÃES, M.A.A.M.; COURA, J.F. Spotted fever in Brazil: a seroepidemiological study and description of clinical cases in an endemic area the state of São Paulo. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.65, n.4, p.329-334, 1996a.

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

---

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

LEMOS-MONTEIRO, J. Comportamento experimental do coelho ao vírus do typho exantemático de São Paulo e da febre maculosa das Montanhas Rochosas. **Memórias do Instituto Butantã.** n.8, p.3-9, 1933.

LEMOS-MONTEIRO, J. Tentativas de transmissão experimental do typho exantemático de São Paulo por percevejos *Cimex lectularis*. **Memórias do Instituto Butantã.** v.9, n.3, p.3-24, 1935.

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

LEMOS-MONTEIRO, J.; FONSECA, F.; PRADO, A. Typho exantemático de São Paulo – Pesquisa do vírus em alguns artrópodos sob condições naturais. **Memórias do Instituto Butantã.** v.16, n.8, p.170-172, 1932b.

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

LOVING, S.M.; SMITH, A.B.; DISALVO A.F.; BURGDORFER, W. Distribution and prevalence of spotted fever group *Rickettsiae* in ticks from South Carolina, with epidemiological survey of persons bitten by infected ticks. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** v.27, n.6 p.1255-1260, 1978.

MAGALHÃES, O. Contribuição ao conhecimento das doenças do grupo exantemático. **Imprensa Nacional,** 1952.

MAGNARELLI, L.A.; ANDERSON, J.F.; PHILIP, R.N.; BURGDORFER, W.; CASPER, E.A. Endemicity of spotted fever group rickettsiae in Connecticut. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** n.30, p.239-252, 1981.

---

MANCINI, D.A.P. A ocorrência de riquetsioses do grupo *Rickettsia rickettsii*. **Revista de Saúde Pública**. n17, p.493-499, 1983.

MÁRQUEZ, F.J.; MUNIAIN, M.A.; PÉREZ, J.M.; PACHÓN, J. Presence of *Rickettsia felis* in the cat flea form southwestern Europe. **Emerging Infectious Diseases**. v.8, n.1, p.89-91, 2002.

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

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

MEYER, J.R.; SABORIDO, J.; PRADO, A. Typho exanthematico. **Brasil Médico**, v.17, n.10. p.167, 1932.

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

MOREIRA, J.A.; MAGALHÃES, O. Typho exanthematico em Minas Gerais. **Brasil Médico**. v.51, n.21, p.20-21. 1937

NICE, C.S. The dissemination of human infectious diseases by birds. **Reviews of Medical Microbiology**. v.5, n.3, p.191-198, 1994.

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

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

---

OLIVER, JR J. H. Induction of oogenesis and ovoposition in ticks. **Morfological and Physiological Behavioral Biology Ticks**. p.233-279, 1984.

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

PERVIKOV, Y. The role of the World Health Organization in the control of rickettsial diseases. **European Journal of Epidemiology**. v.7, n.3, p.287-290, 1991.

PHILLIP, R.N.; CASPER, E.A.; ORMSBEE, R.A.; PEACOCK, M.G.; BURDORFER, W. Microimmunofluorescence test for the study of Rocky Mountain spotted fever and typhus. **Journal of Clinical Biology**. v.3; p.51-61.,1976.

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

PIZA, J.T.; MEYER, J.R. GOMES, L.S. Considerações epidemiológicas e clínicas sobre o tifo exantemático de São Paulo. São Paulo: Sociedade Impressora Paulista, p.11-119.,1932.

PRICE, W.H. The Epidemiology of Rocky Mountain spotted fever: studies of the biological survival mechanisms of *Rickettsia rickettsii*. American **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. n. 60, p. 292-319, 1954.

PRICE, W.H.; JOHNSON J.W.; EMERSON H.; PRESTON, C.E. Rickettsial-interference phenomenon: a new protective mechanism. **Science**. n.120, p. 457-459, 1954.

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

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

---

REGENDAZ, P.; MUNIZ, J. (). Pesquisa sobre transmissão do typho exantematico de São Paulo por ixodídeos. **Brasil Médico**. v.50, n.3, p.45-48, 1936.

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

REHACEK, J. Ecological relationship between ticks and Rickettsiae. **European Journal of Epidemiology**. v.5, n.4, p.407-413, 1989.

REHACEK, J. The role of ticks in dissemination of Rickettsiae in Nature. **Acta Facult Rerum Natur Univers Comenianae-Zoologia**. v.35, p.127-130, 1991.

REHACEK, J. *Rickettsiae* and their ecology in the Alpine region. *Rev.* v.1, p.290-301. 1992

REHACEK, J.; TARASEVICH I.V. Acari-borne Rickettsiae & riquetsioses in Eurásia. **Veda Publishing House**. Bartislava. v.1 p.1-343, 1988.

REHACEK, J.; TARASEVICH I.V. Ecological questions concerning Rickettsiae. **European Journal of Epidemiology**. v.7, n.3, p.229-236. 1991

REHACEK, J.; URVOLGYI, J. Towards more standardized methods in ecological studies of Rickettsiae in relation to their vectors and vertebrate hosts. **VII international Congress of Infectious and Parasitic Diseases**. n.1, p.1-8, 1978.

RICHTER, J.; FOURNIER, P.E.; PETRIDOU, J.; HAUSSINGER, D.; RAOULT, D. *Rickettsia felis* infection acquires in Europe and documented by polymerase chain reaction. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.2, 2002.

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

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. (). DNA sequencing with chain terminating inhibitors, **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.74, p.5463-5467, 1977.

---

SANGIONI, L.A. Pesquisa de infecção por riquetsia do grupo da febre maculosa em humanos, cães, eqüídeos e em adultos de *Amblyomma cajennense*, em região endêmica e não endêmica do estado de São Paulo. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, 2003.

SANGUINETTI, C.J.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A.J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrilamide gels. **Biotechniques**. v.17, p.914-921, 1994.

SANTOS, A.P. 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). **Dissertação de mestrado**. Universidade de São Paulo. 2003

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

SEKEYOVÁ, Z.; FOURNIER, P.E.; REHACEK, J; RAOULT, D. Characterization of a new spotted fever group *Rickettsia* detected in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) collected in Slovakia. **Journal of Medical Entomology**. v.37, n.4, p.707-713, 2000.

SEXTON, D.J.; MUNIZ, M.; COREY, G.R.; BREITSCHWERDT, E.B.; HEGARTY, B.C.; DUMLER, S.; WALKER, D.H.; PEÇANHA, P.M.; DIETZE, R. Brazilian spotted fever in Espírito Santo, Brazil: description of a focus of infection in a new endemic region. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.49, n.2, p.222-226, 1993.

SMITH, J.E.; DUNN, A.M. Transovarial transmission. **Parasitology Today**. v.7, n.6, p.146-148. 1991.

SONENSHINE, D.E. Biology of ticks. Oxford University press. v.1, 1993.

SONENSHINE, D.E.; PETERS, A.H.; LEVY, G.F. Rocky Mountain spotted fever in relation to vegetation in the eastern United States, 1951-1971. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.96, n.1, p.59-69. 1972

---

THORNER, A.R.; WALKER, D.H.; PETRI, W.A. JR. Rocky Mountain spotted fever. **Clinical Infectious Diseases**. n.27, p.1353-1360, 1998.

TIRIBA, A.C.; GODOY, C.V.; BRITO, T.; FORDÃO, F.M.; PENNA, D.O.; SOUZA, A.R. Febre maculosa em São Paulo. Resultados terapêuticos em alguns casos com laurilsulfato de tetraciclina. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v.10, n.4, p.256-261, 1968.

TRAUB, R.; JELLISON, W.L. Evolutionary and biogeographic history and the phylogeny of vectors and reservoirs as factors in the transmission of diseases from other animals to man. **Rickettsiae and Rickettsial Diseases**. v.1, p.517-546, 1981.

TRAVASSOS, J., VALLEJO A. Comportamento de alguns cavêdeos (*Cavia aperea* e *Hydrochoerus capybara*) às inoculações experimentais do vírus da febre maculosa. **Memórias do Instituto Butantã**. v.16, p. 73-86, 1942a.

TRAVASSOS, J., VALLEJO A. Possibilidade de *Amblyomma cajennense* se infectar em *Hydrochoerus capybara* experimentalmente inoculado com o vírus da febre maculosa. **Memórias do Instituto Butantã**. n.16, p.87-90, 1942b.

TRAVASSOS, J., VALLEJO A. Criação artificial do *Amblyomma cajennense* para o preparo da vacina contra a febre maculosa. **Memórias do Instituto Butantã**. n.18, p.145-236, 1947.

VIANNA, M.C.B. Pesquisa de infecção por riquetsia do grupo da febre maculosa em humanos, cães, eqüídeos e em adultos de carrapatos *Amblyomma cajennense* em uma área endêmica do estado de Minas Gerais. **Dissertação de mestrado**. Universidade de São Paulo, 2002.

WALKER D.H.; HERRERO-HERRERO; J.I.; RUIZ-BELTRAN, R.; BULLON-SOPELANA, A.; RAMOS-HIDALGO, A. The pathology of fatal Mediterranean spotted fever. **American Journal of Clinical Pathology**. v.87, n.5, p.669-672, 1987.

WALKER, D.; FIRTH, W.T.; EDGELL, C.J.S. Human endothelial cell culture plaques induced by *Rickettsia rickettsii*. **Infection and Immunity**. v.37, n.1, p.301-306, 1982.

---

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

WEISS,E.; MOULDER, J.W. The Rickettsias and Chlamydias. In: Kreig, N.R.; Holt, J.G., editors. **Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology**. Baltimore. p. 687-739 1984.

WEISS, E.; NELSON, W.N.; DASCH G.A. Biochemistry of Rickettsiae: recent advances. **Acta Virology**. n.31, p.711-717, 1987.

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

ZAVALA-VELAZQUEZ, J.E.; RUIZ-SOSA; J.A.; VADO-SOLIS; I.; , R.A; BILLINGS, A.N.; WALKER, D.H.. Serologic study of the prevalence of rickettsiosis in Yucatan: evidence for a prevalent spotted fever group rickettsiosis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.61, n.3, p.405-408, 2000.