

EDVALDO BARROS

**INFECÇÃO POR *RICKETTSIA* EM ARTRÓPODES VETORES DE UMA REGIÃO
SOB ACENTUADA PRESSÃO ANTRÓPICA NO VALE DO RIO DOCE, ESTADO
DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica Agrícola, para
a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

EDVALDO BARROS

**INFECÇÃO POR *RICKETTSIA* EM ARTRÓPODES VETORES DE UMA REGIÃO
SOB ACENTUADA PRESSÃO ANTRÓPICA NO VALE DO RIO DOCE, ESTADO
DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica Agrícola, para
a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 10 de novembro de 2009.

Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo
(Coorientadora)

Márcio Antônio Moreira Galvão
(Coorientador)

Simone Berger Calic

Tarcízio Antônio Rego de Paula

Cláudio Lísias Mafra de Siqueira
(Orientador)

Dedico este trabalho a Deus e a todas as pessoas que caminharam comigo; e que, de alguma forma, permitiram a sua conclusão. Em especial aos meus pais, Divino e Eni, à minha querida esposa e eterna namorada, Márcia Cristina, e ao meu filho primogênito Arthur.

“Tudo posso Naquele que me fortalece e conforta.”
(Filipenses 4:13)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida e por me dar sustentação para vivê-lo.

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade concedida.

Ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica Agrícola, seus Professores e Funcionários, pelo apoio e compreensão durante toda a minha jornada.

Ao Senhor, Eduardo Pereira Monteiro, secretário da Pós Graduação em Bioquímica Agrícola, pela amizade, apoio e paciência.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, seus Professores, Técnicos e Funcionários, pelo apoio e gentileza em atender nossas necessidades.

Ao amigo, professor e orientador Cláudio Mafra, pelo apoio nos momentos mais difíceis, que encontrei, durante minha caminhada. Obrigado pela paciência que sempre demonstrou com a minha pessoa.

Às Professoras Márcia Rogéria e Maria Goreti pela amizade e pelos conselhos desde o momento que ingressei na Pós-Graduação.

Aos Professores Márcio Galvão e Márcia Rogéria, pela coorientação, por disponibilizarem seus laboratórios e alguns consumíveis para o desenvolvimento de nosso trabalho.

Ao Professor Marcelo Bahia Labruna, da Univesidade de São Paulo, por nos fornecer o controle positivo de *Rickettsia rickettsii*. Aos seus orientandos, em especial, ao Jonas Moraes Filho, pela atenção e presteza com todas as nossas solicitações.

Ao Dr. David H. Walker, do Center for Biodefense and Emerging Infectious Diseases, University of Texas Medical Branch, Galveston, EUA, pelo apoio financeiro e científico.

Ao Centro Universitário de Caratinga, seus professores, técnicos e funcionários, por ter mantido aberto às portas para o que fosse necessário.

Aos Professores, Patrícia Santos e Antônio Vieira, do Centro Universitário de Caratinga, pela amizade, orientação e logística durante as coletas e pela orientação no uso do GPS, respectivamente. E ainda, à professora Lamara Laguardia Valente Rocha, pela amizade, apoio e conselhos.

À Professora Lamara Laguardia Valente Rocha, pela amizade, apoio e conselhos quando preciso.

À Pollyanna da Silva Campos, pela amizade e auxílio nos trabalhos de coleta dos carrapatos.

Aos Diretores, responsáveis e funcionários da Pequena Central Hidrelétrica Areia Branca, pelo apoio logístico e pela gentileza sempre dispensada. Em especial, ao senhor Celso, por conceder a autorização para a coleta dos carrapatos na área.

Ao Departamento de Vigilância Sanitária de Caratinga, seus diretores e funcionários, pela presteza nas informações e logística necessárias à execução de parte deste trabalho.

Ao Departamento de Vigilância Epidemiológica, especialmente ao senhor, José Celso Guimarães Godinho, ex-diretor, pela confiança e apoio. E aos funcionários, Antônio Carlos Teixeira Costa e Paulo Henrique Nunes Borges, pela gentileza, atenção, prontidão e ética no fornecimento de informações e no auxílio da coleta dos carrapatos.

Ao Departamento de Vigilância Sanitária e ao Departamento de Vigilância Epidemiológica, do Município de Caratinga, seus diretores e funcionários, pelo apoio e presteza nas informações e logística necessárias à execução de parte deste trabalho.

Aos senhores, Antônio Carlos Teixeira Costa e Paulo Henrique Nunes Borges, funcionários do Departamento de Vigilância Epidemiológica de Caratinga, pela gentileza, atenção, prontidão e ética no fornecimento de informações e no auxílio da coleta dos carrapatos.

Ao senhor, José Celso Guimarães Godinho, ex-diretor do Departamento de Vigilância Epidemiológica de Caratinga, pela confiança e pelo apoio durante todo o período de execução deste trabalho.

Aos Professores, Everaldo Gonçalves de Barros, Maria Catarina Megumi Kasuya, José Lino Neto, Clóvis Andrade Neves, Maria Cristina Baracat Pereira e Marcelo Ehlers Loureiro, pelo apoio e incentivos preciosos.

Às amigas, Cláudia Alencar Vanetti e Karla Veloso Gonçalves Ribeiro, pelo apoio, incentivo, pela paciência e sugestões, dentre outras coisas.

Aos amigos, Marlos Matta, Luciana Oliveira, Luiza Mourão, Hellen e Carlos, pela amizade, apoio e sugestões no desenvolvimento deste.

Aos amigos do NuBioMol, Humberto Josué de Oliveira Ramos e Meire de Oliveira Barbosa, pelas valiosas sugestões nessa etapa final.

Aos amigos, Gleidson, Thiago, Márcio Lisboa e aos demais, que no momento, não me recordo, pela amizade e apoio durante mais essa jornada.

Ao Professor e amigo, João Martins Gomes, por abrir as portas de seu estabelecimento de ensino e permitir que eu experimentasse o doce néctar da docência durante os últimos cinco anos, além da amizade e apoio incondicionais.

Aos amigos do mestrado, Rony, Rafael, Patrícia, Larissa, Ritinha e demais, pela amizade, preocupação e apoio oferecidos ao longo dessa caminhada.

Aos amigos “bolados”, Saulo, Leonardo, Leandro, Herman, Fábio (Baiano), Felipe, Augusto, Renata, Soraia, Estevam e Williane, pela acolhida em Viçosa, pela amizade e apoio durante minha jornada.

Aos amigos, Aloirta, Mário e Ícaro, pelo apoio, conselhos e paciência.

Aos amigos de laboratório, Karla, Higo, Thiago, Nayra, Cláudio, Gleidson, Eveline e Lucas, pela ótima convivência, apoio e sugestões. Em especial, ao Higo e Thiago, pela amizade e pelo suporte no desenvolvimento da parte experimental.

Aos amigos, Daniel, Solange, Daniela e Mariana, pela amizade e por tudo o que foi possível ser feito para me tirar da fossa, nos momentos mais difíceis dessa jornada, e de toda minha vida.

Aos meus amados pais, Divino e Eni, pelo infinito amor, pelos conselhos, pelo apoio incondicional em todos os momentos de minha existência e por serem modelos de conduta de vida para mim e minha família.

Aos meus queridos sogros e cunhados, Adir, Vera Lúcia, Gabriela, Alessandra e Alessandro, pelo carinho, amizade e apoio.

Aos demais familiares pelo apoio direto ou indiretamente durante toda minha existência.

À Márcia Cristina, amada esposa, pelo amor, companheirismo, carinho, dedicação, compreensão e paciência durante estes doze anos que estamos juntos e, sobretudo nesse momento tão especial de nossas vidas.

Ao Arthur, meu primogênito, por ter feito minha vida brilhar de uma maneira inédita, desde o dia que chegou a nosso meio.

Enfim, por toda minha vida sempre estive com alguém ao meu lado, no entanto, há pessoas que já se foram, pessoas que, por algum motivo, seguiram outros caminhos e pessoas que permanecem presente. Peço desculpas àquelas que não tiveram seus nomes aqui citados. Para tal, seria preciso muito papel. Portanto, agradeço a todos que ajudaram e ajudam-me a seguir em frente, ensinando-me a ser uma pessoa, melhor hoje do que fui ontem!

BIOGRAFIA

EDVALDO BARROS, filho de Divino Alves de Barros e de Eni Maria da Penha de Barros, nasceu em 16 de julho de 1977, em Caratinga – Minas Gerais. Em 08 de janeiro de 2000, casou-se com Márcia Cristina da Silva Barros, com quem tem um filho, Arthur da Silva Barros, nascido em 29 de junho de 2008.

Em dezembro de 1995, terminou o curso Técnico em Contabilidade pela Escola Estadual Maria Isabel Vieira em Caratinga.

Em 21 de julho de 2006 graduou-se em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário de Caratinga – UNEC. Em março de 2007 ingressou no curso de Mestrado em Bioquímica Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, defendendo a dissertação em novembro de 2009.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	X
LISTA DE FIGURAS	XI
ABREVIATURAS	XIII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XVI
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. As Riquetsias	3
2.2. A doença	4
2.3. Os vetores.....	6
2.4. Área de estudo	8
3. OBJETIVOS	13
3.1. Objetivo Geral.....	13
3.2. Objetivos Específicos	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
4.1. Referenciamento dos pontos de coleta na área de estudo	14
4.2. Coleta de Vetores	17
4.3. Identificação taxonômica e acondicionamento dos carrapatos	19
4.4. Extração de DNA dos carrapatos	258
4.5. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	21
4.6. Cálculo da taxa mínima de infecção.....	213
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	244
5.1. Identificação dos carrapatos coletados	244
5.2. Detecção de <i>Rickettsia</i> spp. por <i>nested</i> -PCR.....	26
6. CONCLUSÕES	31
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	322
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	333
9. APÊNDICE	400

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Lotes de DNA genômico de carrapatos para a realização da <i>nested</i> -PCR.	22
Tabela 2: Carrapatos de vida livre coletados pelos métodos de arraste de flanela e armadilha de CO ₂	25
Tabela 3: Carrapatos coletados em relação de parasitismo em animais domésticos do ponto amostral 07	26
Tabela 4: Taxa mínima de infecção riquetsial dos carrapatos coletados, positivos para <i>Rickettsia</i> spp. na segunda reação da <i>nested</i> -PCR.	28

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Bacias Hidrográficas do Estado de Minas Gerais	08
Figura 2: Localização da Pequena Central Hidrelétrica (PCH Areia Branca); Estação Biológica de Caratinga (EBC/RPPN_FMA); Municípios de Caratinga e Ipanema, Minas Gerais	09
Figura 3: Barragem da PCH Areia Branca em construção	11
Figura 4: Distribuição dos pontos de amostragem na área de estudo	15
Figura 5: Perfil topográfico e vegetativo dos pontos amostrais 01, 02, 03 e 06	16
Figura 6: Perfil topográfico e vegetativo dos pontos amostrais 04 e 05	16
Figura 7: Ponto amostral 07 (Fazenda “Estrela”)	17
Figura 8: Técnicas utilizadas para a coleta de carrapatos de vida livre	18
Figura 9: Taxa mínima de infecção riquetsial dos carrapatos coletados, positivos para <i>Rickettsia</i> spp. na segunda reação da <i>nested</i> -PCR.	27
Figura 10: Vestígios que caracterizam a presença de capivara em dois pontos da área estudada	29

ABREVIATURAS

μL: Microlitro, 10^{-6} L

C: Base nucleotídica citocina

DBB: Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

BOD: Demanda biológica de oxigênio

BSF: Brazilian Spotted Fever

DNA: Ácido desoxiribonucléico

dNTP: Desoxinucleotídeo trifosfato

EBC: Estação Biológica de Caratinga

EDTA: Ácido etileno diamino tetracético

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

et al.: e colaboradores

FMA: Feliciano Miguel Abdalla

FMB: Febre maculosa brasileira

G: Base nucleotídica guanina

GMF: Grupo da febre maculosa

GT: Grupo do tifo

h: Hora

IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

KDa: KiloDalton

Km: Quilômetro

L: Litro

LAPEM: Laboratório de Parasitologia e Epidemiologia Molecular

M: Molar

mg: Miligrama

MgCl₂: Cloreto de Magnésio

mL: Mililitro, 10^{-3} L

mM: Milimolar, 10^{-3} M

NaCl: Cloreto de sódio

n-PCR: *nested-PCR*

°C: Graus Celsius

OMP: Proteína da Membrana Externa

pb: Pares de bases
PBS: Solução de fosfato tamponada
PCH: Pequena central hidrelétrica
PCR: Reação em Cadeia pela Polimerase
pH: Potencial hidrogeniônico
primer: Oligonucleotídeo iniciador
RIFI: Reação de imunofluorescência indireta
RMSF: Rocky Mountain Spotted Fever
RNA: Ácido ribonucléico
rpm: Rotação por minuto
RPPN: Reserva Partucular do Patrimônio Natural
SDS: Dodecil sulfato de sódio
SISBIO: Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
TAE: Tampão tris-acetato EDTA
Taq: *Termus aquaticus*
TE: Tris-EDTA
UFV: Universidade Federal de Viçosa
USP: Universidade de São Paulo
UTMB: *University of Texas Medical Branch*

RESUMO

BARROS, Edvaldo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Novembro de 2009. **Infecção por *Rickettsia* em artrópodes vetores de uma região sob acentuada pressão antrópica no Vale do Rio Doce, Estado de Minas Gerais.** Orientador: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira. Co-Orientadores: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo e Márcio Antônio Moreira Galvão.

O gênero *Rickettsia* é constituído por alfa-proto-bactérias gram-negativas, pleomórficas, parasitas intracelulares obrigatórias que infectam preferencialmente células endoteliais, podendo ser transmitidas ao hospedeiro vertebrado por meio de pulgas, piolhos e, principalmente, carrapatos. Esses microrganismos, amplamente distribuídos pelo mundo, são relatados em carrapatos provenientes de quase todo território brasileiro, porém, com elevada concentração na região sudeste, sendo as enfermidades ocasionadas pelos mesmos, agrupadas sob a denominação de riquetsioses. Entre as riquetsioses, a febre maculosa Brasileira (FMB), cujo agente etiológico é a *Rickettsia rickettsii*, é a mais frequente em nosso país. Os sintomas mais comuns desta enfermidade são: febre súbita, dor de cabeça, mialgias, mal estar, podendo surgir exantemas das extremidades dos membros para a região do tronco, ou seja, de forma centrípeta, além de manifestar-se na palma das mãos e planta dos pés. Na maior parte das vezes, os sintomas são indiferenciados de outras doenças, sendo muito importante a caracterização epidemiológica do paciente. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo verificar por investigação molecular a ocorrência de organismos em carrapatos coletados em área endêmica para FMB sob acentuada pressão antrópica, pela construção de um empreendimento hidrelétrico localizado próximo às pastagens e aos fragmentos de Mata Atlântica, no limite entre os municípios de Caratinga e Ipanema, no Vale do Rio Doce, estado de Minas Gerais. Foram coletados 863 carrapatos de vida livre pelo método de arraste de flanela branca e armadilha de CO₂ e 90 carrapatos parasitando animais domésticos (equinos e cães). Esses carrapatos foram identificados por meio de chaves taxonômicas e processados para a extração do DNA genômico. O DNA purificado foi testado por meio da *nested*-PCR quanto à presença de *Rickettsia* spp., com o uso de iniciadores gênero-específicos. Foram encontrados estádios imaturos de carrapatos do gênero *Amblyomma*, assim como as espécies: *A. cajennense*,

Dermacentor nitens, *Rhipicephalus microplus* e *R. sanguineus*, sendo observado o predomínio de carrapatos do gênero *Amblyomma* (94,6%). Das espécies em relação de parasitismo, *A. cajennense* (41,1%), seguida por *R. sanguineus* (34,4%), apresentaram maior prevalência nos animais domésticos estudados. Foram encontradas *Rickettsia* spp. infectando carrapatos em sete de um total de 32 lotes avaliados. Dentre eles apenas um lote era referente a carrapatos de vida livre, sendo os demais referentes a carrapatos em relação de parasitismo. As taxas mínimas de infecção para *A. cajennense*, *D. nitens*, *R. microplus* e *R. sanguineus*, foram de 2,27%, 12,5%, 16,67% e 6,45%, respectivamente. Estes resultados associados ao indício de casos suspeitos de FMB na região sugerem a presença de riquetsias circulantes na área, evidenciando a necessidade de outros estudos moleculares e sorológicos, buscando-se uma melhor compreensão dos papéis de animais domésticos e silvestres na epidemiologia das riquetsioses e de seus artrópodes vetores, especialmente quando submetidos a consideráveis níveis de pressão antrópica associada a elevada interferência ambiental, com conseqüente modificação dos ecossistemas.

ABSTRACT

BARROS, Edvaldo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November of 2009. **Molecular investigation of *Rickettsia* in arthropods vectors in area under accentuated anthropic pressure in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais.** Adviser: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira. Co-Advisers: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo and Márcio Antônio Moreira Galvão.

The gender *Rickettsia* is constituted by alpha-protobacteria gram-negatives, pleomorphics and obligatory intracellular parasites that infect preferentially endothelial cells, transmitted to the vertebrate host through fleas, lice and, mainly, ticks. These microorganisms, thoroughly distributed by the world, are reported infecting ticks of almost whole national territory, however, with high concentration in the southeast area, been caused the diseases denominated Rickettsiosis. The Brazilian Spotted Fever (BSF), whose etiological agent is the *Rickettsia rickettsii*, is the most common in our country. The more common clinical signs of this illness are sudden fever, headache and myalgias, sometimes showing exanthemas, mainly in the members and area of the trunk. Most of the time, the symptoms are undifferentiated of other diseases, being very important the patient's epidemiologic characterization. In this context, this work had as major subject verifies by molecular investigation the occurrence of rickettsias in ticks collected in an endemic area for BSF under accentuated anthropic pressure due the construction of a hydroelectric enterprise near to pastures and fragments of Atlantic forest, in the limit between the municipality of Caratinga and Ipanema, in the worth of Rio Doce Valley, state of Minas Gerais, Brazil. Were collected 863 ticks of free live by the method of drags of white flannel and trap of CO₂ and 90 ticks sponging domestic (horses and dogs) animals. These ticks were identified through taxonomic keys and processed for the extraction of the genomic DNA. Purified DNA was tested through the *nested*-PCR for the presence of organisms with the use of gender-specific primers. The ticks in the studied region were *Amblyomma* spp., *A. cajennense*, *Dermacentor nitens*, *Rhipicephalus microplus* and *R. sanguineus*, being observed the prevalence of ticks of the gender *Amblyomma* (94.6%). The species of ticks in relationship of parasitism with domestic animals most prevalent were *A. cajennense* (41.1%) followed by *R. sanguineus* (34.4%).

Rickettsia spp. was detected infecting ticks of several lots, been only one relative to the ticks of free life and the remnant of the ticks in parasitism relationship. The frequency of infection by rickettsias in *A. cajennense*, *D. nitens*, *R. microplus* and *R. sanguineus*, were of 2.27%, 12.5%, 16.67% and 6.45%, respectable. These results associated to the evidence of the reemergence of suspects cases of BSF in the region, suggest the occurrence of Rickettsiae organisms circulating in the studying area evidencing the needing of more molecular and serological studies to better understanding the role of domestics and wild animals in the epidemiology of the rickettsiosis and its vectors arthropods, with special attention due subjects the considerable levels of anthropic pressure, associated to a high level of environmental interference, with consequently change of ecosystems.

1. INTRODUÇÃO

As riquetsioses são patologias causadas por microrganismos parasitas intracelulares obrigatórios do gênero *Rickettsia*, que possuem a maior parte de seus representantes nos grupos da Febre Maculosa e do Tifo (Lascola & Raoult, 1997). Algumas riquetsioses são caracterizadas por apresentarem alta letalidade ao homem quando não adequadamente tratadas, sendo transmitidas, geralmente, de forma acidental (Walker, 1998). As riquetsias possuem uma gama enorme de artrópodes vetores (Raoult & Roux, 1997; Walker, 1998), como carrapatos, pulgas, piolhos e ácaros (Walker, 1998). O relacionamento entre as riquetsias e seus vetores e com seus hospedeiros vertebrados varia enormemente com a localização geográfica e com a disposição ambiental a que os mesmos se encontram (Galvão *et al.*, 2003). Os artrópodes vetores, principalmente os carrapatos, são responsáveis pela manutenção da transmissão de riquetsias tanto vertical quanto horizontalmente; portanto, tanto a técnica de investigação molecular como a epidemiológica são de extrema importância para acompanhar e avaliar a distribuição ecológica e a transmissão destes agentes (Galvão, 1996; Walker, 1998), assim como, para traçar uma melhor estratégia de controle dessas doenças.

No Brasil, a riquetsiose de maior frequência é a Febre Maculosa Brasileira (FMB), a qual foi descrita pela primeira vez em 1929, no estado de São Paulo, por José Toledo Pisa. É comum a ocorrência de casos isolados desta doença em territórios dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo (Galvão *et al.*, 2001). No estado de Minas Gerais os Vales do Rio Doce, do Jequitinhonha e do Mucuri são regiões classificadas como endêmicas para a FMB (Galvão, 1996).

A área de empreendimento da Pequena Central Hidrelétrica Areia Branca, Vale do Rio Doce, estado de Minas Gerais, está sofrendo intensa ação antrópica em função da alteração do microclima e do microambiente provocada pela presença da hidrelétrica, sendo observada, como consequência, intensa migração de animais silvestres e domésticos para outros fragmentos de Mata Atlântica. Estes locais são utilizados por moradores das proximidades como área de lazer, aumentando assim o risco de incidência das riquetsioses.

O ciclo natural das riquetsias é mantido principalmente pelos carrapatos, sendo que estes podem transmiti-las transovarianamente para seus descendentes e transestadialmente entre suas formas mais maduras de desenvolvimento evolutivo, não sendo observada a transmissão transovariana em piolhos e pulgas (Raoult & Parola, 2007).

Os hospedeiros invertebrados são responsáveis pela manutenção do ciclo natural de agentes riquetsiais no ambiente. A utilização de técnicas que permite distinguir os diferentes agentes riquetsiais e as relações desses com seus hospedeiros são essenciais para o desenvolvimento de estratégias de vigilância epidemiológica e controle da doença. Dentre as técnicas utilizadas destaca-se a aplicação do diagnóstico molecular (Galvão, 2002).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi buscar informações sobre a presença e a caracterização dos microrganismos pelo diagnóstico molecular do gênero *Rickettsia* em hospedeiros invertebrados na área de empreendimento da Pequena Central Hidrelétrica Areia Branca. Os resultados obtidos poderão auxiliar no controle epidemiológico em outras áreas de risco no Brasil.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. As Riquetsias

As riquetsias são alfa-protobactérias Gram-negativas, pleomórficas, que variam de bastões a formas cocóides, vivendo como parasitas intracelulares obrigatórios (Raoult & Roux, 1997; Mcleod *et al.*, 2004), podendo variar o seu tamanho entre 0,3 a 0,5 µm de diâmetro e 0,8 a 2,0 µm de comprimento (Raoult & Parola, 2007). Esses microrganismos pertencem à ordem Rickettsiales, família Rickettsiaceae e gênero *Rickettsia*. Esse gênero está dividido em três grupos: o grupo 1 denominado “Grupo Ancestral”, constituído pelas *R. belli* e *R. canadensis*; o grupo 2 denominado “Grupo do Tifo (GT)”, constituído pelas *R. typhi* e *R. prowazekii*; e o grupo 3 denominado “Grupo da Febre Maculosa (GFM)”, constituído por mais de vinte espécies válidas, dentre elas a *R. rickettsii* que é o agente etiológico da *Rocky Mountain spotted fever* (RMSF), descrita por Ricketts (1909), considerada a mais conhecida riquetsiose das Américas (Raoult & Roux, 1997; Labruna, 2009).

Existem muitas espécies de riquetsias que ainda não foram isoladas a partir de humanos, aparentemente sem patogenicidade para o mesmo, enquanto várias outras espécies estão relacionadas com diversas riquetsioses. Essas doenças possuem características peculiares variando, dentre outros fatores, com a espécie do agente etiológico que as causam e com a localidade geográfica que elas ocorrem (Raoult & Roux, 1997; Raoult & Parola, 2007).

Quanto ao grupo a que pertencem, as riquetsias podem ser classificadas por meio de várias de suas características. Dentre elas, a localização destes microrganismos no meio intracelular e sua temperatura ótima de crescimento são fatores muito utilizados pelos pesquisadores. As riquetsias do GFM podem ser observadas tanto no citoplasma quanto no núcleo celular, pois possuem a capacidade para polimerizar a actina e com isso, podem migrar entre estes compartimentos celulares, além de crescerem a uma temperatura ótima de 35°C. No entanto, as riquetsias do GT podem ser observadas apenas no citoplasma celular, não apresentam a capacidade de polimerização da actina, e crescem a uma temperatura ótima de 32°C ou 33°C (Raoult & Roux, 1997; Raoult & Parola, 2007).

2.2. A Doença

As riquetsioses são caracterizadas, principalmente, por infecção intravascular disseminada. Por isso, o agente etiológico invade as células endoteliais vasculares de órgãos como o pulmão e o cérebro, provocando lesões vasculares generalizadas. As paredes dos vasos capilares são danificadas pela proliferação riquetsial em suas células, permitindo o escoamento de fluidos e sangue (hemorragia) para os tecidos próximos do local da infecção, acumulando-se sob a pele, provocando uma erupção que se desenvolve entre cinco a sete dias após o paciente ter sido picado por artrópodes infectados, principalmente, o carrapato (Walker, 1998; Valbuena *et al.*, 2002). A erupção consiste em numerosos pequenos pontos circulares de cor vermelho-púrpura, que aparecem primeiramente nos tornozelos e pulsos e depois no restante do corpo com orientação centrípeta, ou seja, das extremidades dos membros para o tronco (Bratton & Corey, 2005).

A multiplicação das riquetsias nos capilares sanguíneos pode causar aumento progressivo das lesões cutâneas, resultando em grandes áreas de equimoses e ulcerações (Bratton & Corey, 2005). A evolução da doença pode causar sérios danos a órgãos internos, caracterizando um colapso cardiovascular, encefalite, pneumonite e dor abdominal, além de danos na micro-circulação sistêmica e no sistema nervoso central, apresentando sinais e sintomas neurológicos, como convulsão, coma; insuficiência respiratória aguda, choque e insuficiência renal, de forma que o dano causado à célula hospedeira correlaciona-se com a quantidade de riquetsias acumuladas intracelularmente (Walker, 1998; Gayle & Ringdahl, 2001; Valbuena *et al.*, 2002; Bratton & Corey, 2005). Tal quadro clínico permite classificar a doença como extremamente grave e, quando não tratada em estágios iniciais, resulta em uma elevada taxa de letalidade, em torno de 25%. Considerando que a doença responde de modo satisfatório aos antibióticos da classe das tetraciclina, doxiciclina e cloranfenicol, é extremamente importante estabelecer rapidamente o diagnóstico (Walker, 1998; Gayle & Ringdahl, 2001; Bratton & Corey, 2005).

Os sintomas mais comuns das riquetsioses são: febre súbita, dor de cabeça frontal, mal-estar generalizado, mialgia, principalmente no dorso e no

músculo da perna, náuseas e vômitos, podendo ou não apresentar exantema (Bratton & Corey, 2005). Esses e outros sintomas podem ser facilmente confundidos com os de outras doenças, podendo conduzir para um diagnóstico errôneo de infecção gastrintestinal, do trato respiratório, meningites bacterianas ou virais ou encefalomielite viral, além de outras doenças hemorrágicas neotrópicas (Walker, 1998; Bratton & Corey, 2005).

A dificuldade do diagnóstico da febre maculosa decorre principalmente das manifestações dos primeiros sintomas serem comuns aos de outras patologias e na fase inicial haver ausência ou baixa detecção dos anticorpos para esses microrganismos, fatores que dificultam o diagnóstico clínico-laboratorial. Durante o início da doença, aproximadamente, nos três primeiros dias, os pacientes portadores de riquetsioses podem não apresentar febre, exantema ou qualquer outro sintoma acima descrito, apresentando apenas um histórico de contato ou picada por carrapato (Walker, 1998).

A maioria dos pacientes que procuram atendimento médico que é diagnosticada presuntivamente como portadora de febre maculosa, o diagnóstico inicial é baseado apenas em dados clínicos e epidemiológicos. Embora seja importante e necessária a confirmação laboratorial da doença, é imprescindível a introdução de antibioticoterapia o mais precocemente em caso de suspeita da doença (Walker, 1998).

No Brasil, a FMB foi descoberta no Século XX, após décadas de silêncio epidemiológico, vem a partir dos anos 80, se mostrando agressiva e com elevada letalidade, em diversos estados brasileiros, principalmente nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro (Galvão, 1996).

Várias metodologias podem ser utilizadas para diagnosticar a febre maculosa, porém, muitas dependem de fatores que tornam a sua prática de difícil aplicação no dia-a-dia nos laboratórios voltados para a saúde pública, sendo realizadas apenas em laboratórios de pesquisa (La Scola & Raoult, 1997).

Os principais meios de diagnósticos das riquetsioses ainda são os métodos sorológicos. As técnicas sorológicas mais utilizadas são a imunofluorescência indireta, a fixação do complemento, a microaglutinação, ELISA e "*Imunoblotting*" (Lemos, 1991; La Scola & Raoult, 1997).

O método de diagnóstico sorológico para riquetsioses considerado padrão-ouro é a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), que apresenta uma especificidade de 98% e uma sensibilidade de 90% em títulos $\geq 1:64$ considerados positivos na detecção de *R. rickettsii* (La Scola & Raoult, 1997), porém, o nível de anticorpos anti-riquetsiais na fase inicial da doença pode apresentar-se abaixo do mínimo detectável (Walker, 1998).

Outra técnica muito utilizada em laboratórios de pesquisa é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que amplifica um fragmento de DNA riquetsial podendo apresentar extrema precisão a nível genérico ou específico. Desde a década de 90 são utilizados para o diagnóstico de riquetsioses fragmentos de genes como o *gltA* que codifica a enzima citrato sintase, além de genes que codificam proteínas antigênicas de membrana como o *ompA*, *ompB* ou *htrA* (La Scola & Raoult, 1997; Guedes *et al.*, 2005; Estrada *et al.*, 2006; Cardoso *et al.*, 2006; Pacheco *et al.*, 2009).

2.3. Os Vetores

Alguns artrópodes hematófagos como: carrapato, pulga, piolho-do-corpo e outros ácaros estariam envolvidos como vetores para algumas riquetsioses, também denominadas como febre exantemática. Sendo o carrapato incriminado como segundo principal vetor para doenças infecciosas em animais e humanos, podendo transmitir vírus, bactérias, protozoários e helmintos (Camargo-Neves *et al.*, 2004). Estes pertencem à classe Arachnida e estão divididos em três famílias, das quais a Ixodidae é composta por treze gêneros. Os gêneros *Amblyomma*, *Dermacentor* e *Ixodes* são os mais conhecidos por transmitirem doenças a humanos. A família Argasidae é composta por cinco gêneros, onde apenas o gênero *Ornithodoros* é conhecido pela mesma característica. Já a família Nuttalliellidae, composta por uma única espécie, é restrita ao Continente Africano (Gayle & Ringdahl, 2001; Barros-Batesti, 2006).

Os carrapatos podem estar associados com inúmeros hospedeiros vertebrados, dentre eles, répteis (Stenos *et al.*, 2003), aves (Rojas *et al.*, 1999) e, principalmente, mamíferos, tanto silvestres como domésticos (Lemos *et al.*, 1996a). No Brasil, os carrapatos do gênero *Amblyomma* possuem ampla distribuição territorial, principalmente na região Sudeste. Dos carrapatos do

gênero *Amblyomma*, a espécie *A. cajennense*, também conhecido como “carrapato-estrela” ou “rodulheiro” (Camargo-Neves *et al.*, 2004), é considerada como a principal envolvida na transmissão da febre maculosa ao homem e a outros mamíferos (Lemos *et al.*, 1996a), o qual não serve apenas como vetor, mas também como reservatório da doença (Lemos *et al.*, 1997a; Camargo-Neves *et al.*, 2004).

A excelência do *A. cajennense* como vetor aliada à sua ampla distribuição na região do Sudeste brasileiro se deve a sua baixa especificidade e ao seu desenvolvimento eficiente em locais de pastagens “suja” (Labruna *et al.*, 2004a). Um trabalho realizado por Rojas *et al.*, (1999) demonstra que as formas imaturas do *A. cajennense* (larva e ninfa) possuem uma menor especificidade parasitária, sendo facilmente encontradas em hospedeiros de grande e pequeno porte. No entanto, adultos de *A. cajennense* são os mais encontrados em hospedeiros de grande porte, tendo os humanos como hospedeiros acidentais (Oliveira *et al.*, 2000; Labruna *et al.*, 2002; Camargo-Neves *et al.*, 2004).

No estado de São Paulo foi encontrado o carrapato *A. dubitatum* com elevada taxa de infecção com *R. bellii*, demonstrando sua importante participação nas relações ecológicas destas riquetsias com seus hospedeiros e com o ambiente. O carrapato *A. dubitatum* é muito encontrado em grandes roedores como as capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*), as quais estão amplamente distribuídas por todo o território brasileiro (Lemos *et al.*, 1996b; Pacheco *et al.*, 2009).

Outras espécies de carrapatos podem estar associadas com a transmissão de agentes patológicos ao homem. Uma espécie muito importante de carrapato encontrada, geralmente, parasitando o cão, é denominada *Rhipicephalus sanguineus*, na qual foi detectada por diversas vezes infecção por riquetsias e, pode estar associada com a ecologia de riquetsias patogênicas ao homem, principalmente na região Sudeste do Brasil (Cardoso *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008; Moraes-Filho *et al.*, 2009).

Geralmente, as riquetsias parasitam, mas nem sempre não matam o carrapato, ficando amplamente distribuídas pelo seu corpo e passando de uma geração para outra por meio de um mecanismo denominado passagem transovariana (Guedes *et al.*, 2005). Isso permite que ele permaneça infectado

por toda sua vida, mantendo a disseminação das protobactérias através de suas gerações (Camargo-Neves *et al.*, 2004).

A transmissão de riquetsias do grupo da febre maculosa para seres humanos e animais ocorre através da regurgitação de sangue com saliva contaminada, pelo artrópode, após o repasto sanguíneo. (Walker, 1998; Kaufman, 1989).

2.4. Bacias Hidrográficas do Estado de Minas Gerais

O Estado de Minas Gerais é banhado por nove Bacias Hidrográficas (B. H.), as quais estão distribuídas da seguinte forma: B. H. do Rio Doce (D01 – D06); B. H. do Rio Grande (GD1 – GD8); B. H. do Rio Jequitinhonha (JQ1 – JQ3); B. H. dos Rios do Leste (MU1 e SM1); B. H. do Rio Pardo (PA1); B. H. dos Rios Piracicaba e Jaguari (PJ1); B.H. do Rio Paranaíba (PN1 – PN3); B. H. do Rio Paraíba do Sul (PS1 e PS2); e B. H. do Rio São Francisco (SF1 – SF10) (figura 1).

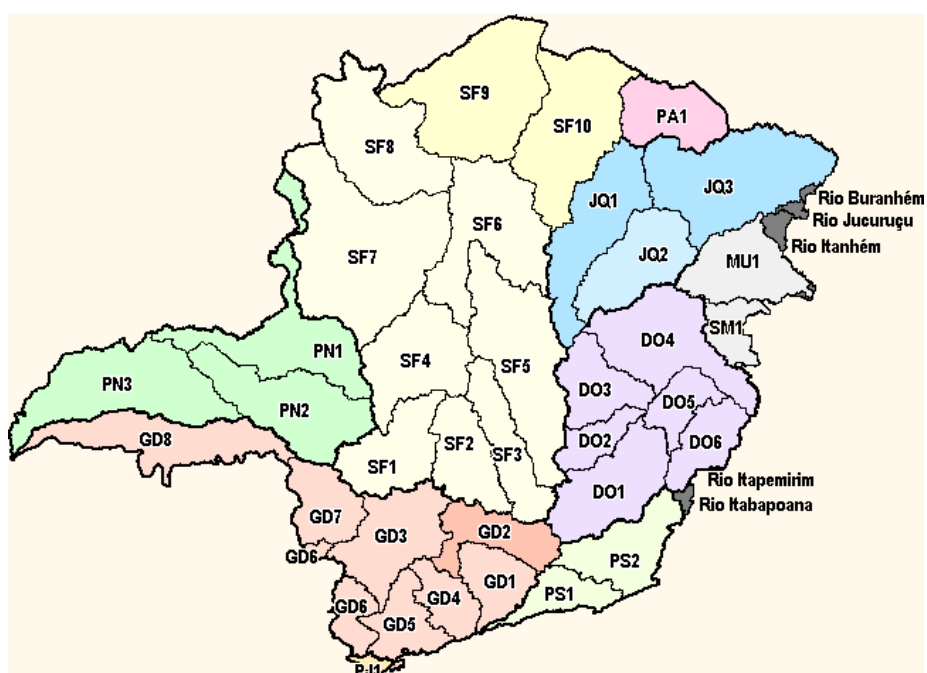


Figura 1: Bacias Hidrográficas do Estado de Minas Gerais. Fonte: <http://www.igam.mg.gov.br/geoprocessamento/mapas> acessado em 01/10/09

A Bacia Hidrográfica do Rio Doce possui uma enorme extensão territorial, abrangendo 83.400 km². A maior parte (86%) está localizada no

Estado de Minas Gerais e o restante no Estado do Espírito Santo. Possui grande capacidade de geração de energia elétrica, calculada em cerca de, 4.055 MW de energia, dos quais cerca de 10% já são produzidos por meio de usinas hidrelétricas instaladas, enquanto a infra-estrutura do restante do potencial energético encontra-se em construção, através de projetos básicos, de estudos de viabilidade, inventariados ou apenas parcialmente aproveitados por meio das PCH's. A economia principal das regiões situadas nesta bacia baseia-se na agricultura, indústria ou mineração.



Figura 2: Localização da Pequena Central Hidrelétrica (PCH Areia Branca); Estação Biológica de Caratinga (EBC/RPPN_FMA); Municípios de Caratinga e Ipanema, Minas Gerais.

Fonte: <http://www.earth.google.com> acessado em 01/10/09.

A PCH Areia Branca está localizada aproximadamente 12 Km, por estrada não pavimentada, do distrito de Santo Antônio do Manhuaçu, a

nordeste do município de Caratinga. A menor distância por via rodoviária da área até Belo Horizonte é aproximadamente 365 Km (figura 2). O acesso rodoviário pode ser através da cidade de Manhuaçu, seguindo 80 Km pela rodovia MG-111, até o município de Ipanema, e mais adiante, 26 Km por estrada não pavimentada, até a localidade de Santo Antônio do Manhuaçu; ou através da cidade de Caratinga, pela rodovia BR-474 até o distrito de Santo Antônio do Manhuaçu, seguindo mais 12 Km por estrada vicinal, pela margem esquerda do Rio Manhuaçu até a Cachoeira Bonita, Região da PCH Areia Branca.

O município de Caratinga responde ao Comitê da Bacia Hidrográfica do Rio Caratinga, representado na figura 1, pelo código D05, enquanto pela margem direita do Rio Manhuaçu encontra-se o município de Ipanema, o qual responde ao Comitê da Bacia Hidrográfica Águas do rio Manhuaçu (D06). A área da PCH Areia Branca está inserida na microrregião de Caratinga e Mesorregião do Vale do Rio Doce.

A PCH Areia Branca localiza-se à 60 Km da Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) - Feliciano Miguel Abdala, unidade de preservação da biodiversidade animal do Estado de Minas Gerais, também denominada de Estação Biológica de Caratinga (EBC) (Drummond *et al*, 2005).

Na região do município de Caratinga, a PCH Areia Branca está localizada em zona tropical, com altitudes variando de 290 a 380 metros, apresentando um clima úmido sub-tropical, sendo o período com menor pluviosidade de abril a setembro, marcado por temperaturas mais baixas variando entre 15°C e 20°C e o período com maior pluviosidade se estendendo de outubro a março, com variações de temperatura entre 20°C a 22°C, com uma precipitação média anual de 1.146,3mm. Essa região possui poucos fragmentos remanescentes de Mata Atlântica (Floresta Estacional Semidecidual Submontana), característicos da região (Melo e Salino, 2002). A maior parte se constitui de vegetação secundária já muito alterada por meio de ações antrópicas, como a retirada de madeira, a expansão urbana, as atividades de lazer, além do uso de áreas para pastoreio, que atende a animais domésticos, em geral, bovinos, equinos e cães (Drummond *et al*, 2005).

A vegetação das matas ciliares de alguns pontos desses fragmentos está sendo cortada em um perímetro de 30 a 50 metros das margens do rio

para que ocorra a inundação pelas águas represadas da hidrelétrica (figura 3). Os animais silvestres estão sendo catalogados e remanejados para fragmentos de mata localizados em pontos mais afastados do rio.

O município de Caratinga possui características de atividades economicamente agrárias, apesar de apresentar um comércio local atuante. Em 1992, em sua área peri-urbana, ocorreu um surto, classificado como epidêmico de FMB, resultando em quinze óbitos com confirmação da doença e mais um com suspeita (Galvão, 1996). Nos três anos posteriores ao surto foram notificados 157 casos suspeitos para FMB neste município, caindo gradativamente, durante os anos seguintes as notificações suspeitas (Barros *et al.*, 2005). Esse fato se deve provavelmente à introdução de medidas de controle implantadas na região, de forma sistemática, a partir dessa época.



Figura 3: Barragem da PCH Areia Branca em construção.

Foto Edvaldo Barros (29/08/2009).

A área de empreendimento da PCH Areia Branca é caracterizada por grande ação antrópica no que diz respeito à pecuária extensiva, o que está aumentado pelo próprio remanejamento de animais e da vegetação para as obras de sua construção. O aumento de tais ações poderá favorecer o maior contato entre animais silvestres e domésticos.

Além de suas características regionais, a PCH Areia Branca situa-se próxima a uma área de preservação ambiental, na qual, ocorre um extensivo ecoturismo, o que tem aumentado a circulação de turistas, profissionais e pesquisadores em suas proximidades. A mesma não apresenta até o momento nenhum trabalho caracterizando a fauna acarológica, o que é fundamental para avaliar as relações ecológicas entre riquetsias e seus hospedeiros. Podendo contribuir para a vigilância epidemiológica da região, avaliando a circulação de riquetsias e os riscos que a população das áreas adjacentes estão submetidas, tendo em vista as condições modificadoras durante o empreendimento da hidrelétrica em questão.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Identificar por meio de técnicas de diagnóstico molecular a presença de microrganismos do gênero *Rickettsia*, circulantes entre possíveis animais reservatórios e ectoparasitas vetores, em região endêmica para a FMB, na área próxima ao empreendimento PCH Areia Branca, situada no rio Manhuaçu, limite entre os municípios de Caratinga e Ipanema, vale do Rio Doce, Estado de Minas Gerais.

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1. Realizar levantamento da fauna acarológica silvestre de vida livre e em relação de parasitismo;

3.2.2. Detectar com o auxílio da Reação de PCR a presença de bactérias do gênero *Rickettsia* em amostras teciduais de ectoparasitas coletados tanto no ambiente como em animais domésticos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Área de estudo

Foi proposta a área de empreendimento da Pequena Central Hidrelétrica (PCH) Areia Branca para estudo. A seleção desta área ocorreu por suas características geofísicas e por seu bioma, além de pertencer à zona rural do município de Caratinga, Mesorregião do Vale do Rio Doce, área endêmica para febre maculosa brasileira (FMB), e, que apresenta as características necessárias ao estudo. A área de estudo está situada a cerca de 130 km da foz do Rio Manhuaçu, no limite entre os municípios de Caratinga e Ipanema, Estado de Minas Gerais, sob as coordenadas Lat.19°36'50" S e Long.41°48'20" O. O Rio Manhuaçu é um dos afluentes da margem direita do Rio Doce que pertence à Bacia Hidrográfica desse rio.

Foram selecionados sete pontos amostrais estratégicos (figura 4), caracterizados assim, por se encontrarem sob grande ação antrópica, na área de empreendimento da Pequena Central Hidrelétrica (PCH) Areia Branca e em uma fazenda próxima a região. Os pontos foram demarcados por meio de coordenadas geográficas como se segue: Ponto 01 (19°37'07,50"S e 41°48'22,60"O); Ponto 02 (19°36'57,70"S e 41°48'27,10"O); Ponto 03 (19°37'18,00"S e 41°48'09,40"O); Ponto 04 (19°37'51,30"S e 41°49'46,90"O); Ponto 05 (19°37'50,50"S e 41°49'39,80"O); Ponto 06 (19°36'51,52"S e 41°48'15,89"O) e Ponto 07 (19°40'39,36"S e 41°49'06,56"O).

Os pontos de 01 a 06 referem-se à ambiente silvestre ou de pastagem próximo a fragmento de mata ciliar ou Mata Atlântica, situados próximos à margem esquerda do Rio Manhuaçu, município de Caratinga. O ponto 07 refere-se a uma fazenda, denominada "Fazenda Estrela", situada próxima à margem direita do Rio Manhuaçu, município de Ipanema, onde foram coletados os carrapatos de animais domésticos.

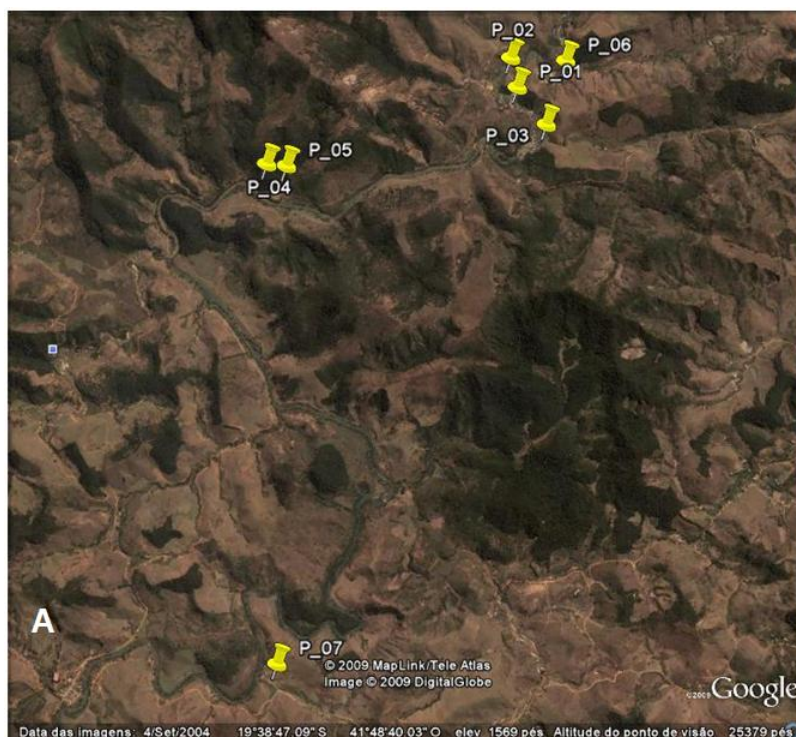


Figura 4: Distribuição dos pontos de amostragem na área de estudo. (A) Distrito de Santo Antônio do Manhuaçu, município de Caratinga, Estado de Minas Gerais. P_01 a P_07: pontos de amostragem.

Fonte: <http://www.earth.google.com> acessado em 01/10/09.



Figura 5: Perfil topográfico e vegetativo dos pontos amostrais 01, 02, 03 e 06. As setas em vermelho indicam fragmentos de Mata Atlântica.

Fonte: <http://www.earth.google.com> acessado em 01/10/09.



Figura 6: Perfil topográfico e vegetativo dos pontos amostrais 04 e 05. A seta em amarelo indica a área (ES5), utilizada para a soltura dos animais apreendidos. As setas em vermelho indicam fragmentos de Mata Atlântica próximos à área ES5.

Fonte: <http://www.earth.google.com> acessado em 01/10/09.

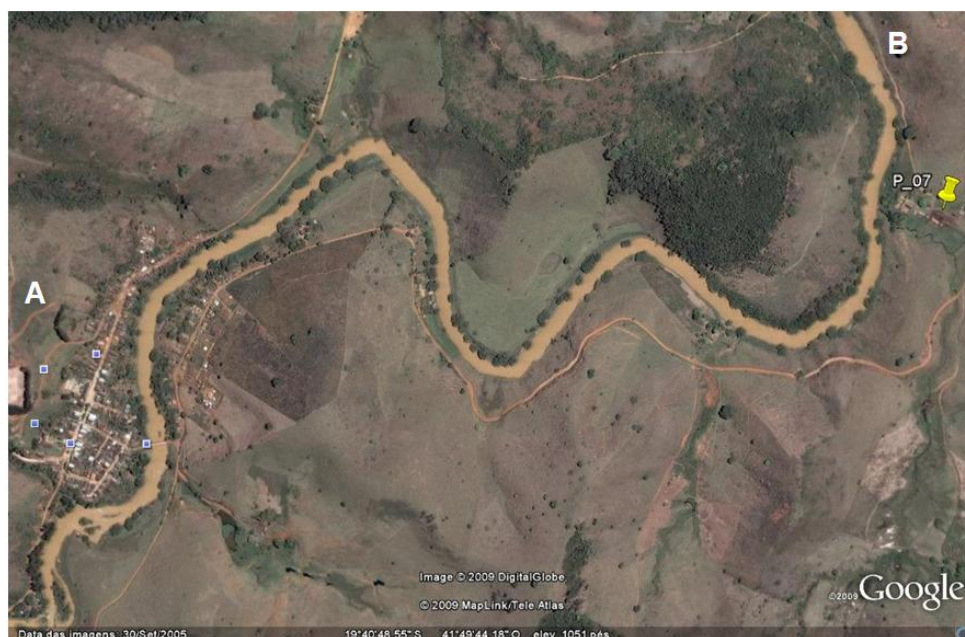


Figura 7: Ponto amostral 07 (Fazenda “Estrela”). (A) Distrito de Santo Antônio de Manhuaçu, município de Caratinga/MG; (B) margem direita do Rio Manhuaçu, município de Ipanema/MG.

Fonte: <http://www.earth.google.com> acessado em 01/10/09.

4.2. Coleta de Vetores

Foram realizadas coletas de carrapatos no ambiente (pontos de amostragem 01, 02, 04, 05 e 06) e parasitando animais domésticos (ponto 07). No período de maio a setembro de 2008, foram realizadas quatro coletas. Cada ponto tinha a extensão de, aproximadamente, 500 metros de raio e foi visitado uma ou mais vezes. A abrangência da área estudada foi de 1 Km à jusante até cerca de 12 Km à montante da barragem estabelecida pela referida hidrelétrica.

Os espécimes de carrapatos de vida livre foram coletados pela técnica de arraste de flanela branca medindo um metro de largura por dois metros de comprimento ou por armadilha de dióxido de carbono (CO₂) (figura 8), conforme Oliveira, (1998).

Os carrapatos em relação de parasitismo com animais domésticos foram coletados na pele de seus hospedeiros por meio de leves torções utilizando uma pinça (Camargo-Neves *et al.*, 2004). Foi vistoriado todo o corpo dos animais e

coletado todos os carrapatos que foram encontrados em relação de parasitismo. Os hospedeiros encontrados na Fazenda “Estrela” foram separados e numerados da seguinte forma: quatro equídeos (01 – “Caramelo”; 02 – “Pampinha”; 03 – “Farofa” e 04 – “Monalisa”) e cinco canídeos (01 – “Catrina”; 02 – “Scoob”; 03 – “filhote”; 04 – “cadela marrom” e 05 – “cão preto”). Os equídeos se encontravam nas pastagens ao redor da Fazenda, com acesso à margem direita do Rio Manhuaçu, área de empreendimento da PCH Areia Branca. Os equídeos foram agrupados no curral para que fosse executada a coleta. Já os canídeos foram abordados nos arredores da casa (sede da fazenda).

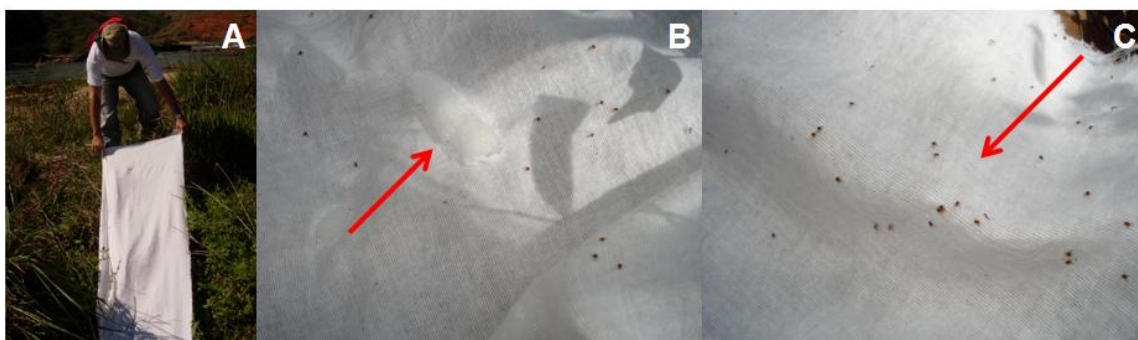


Figura 8: Técnicas utilizadas para a coleta de carrapatos de vida livre. (A) Técnica de arraste de flanela branca; (B) Técnica de armadilha de CO₂ mostrando a disposição da pedra de gelo seco; (C) Técnica de armadilha de CO₂ mostrando a entrada dos carrapatos na flanela.

Foto Edvaldo Barros (29/08/2008).

Os carrapatos capturados foram mantidos vivos, armazenados em embalagens plásticas devidamente fechadas, contendo pequenos orifícios para a oxigenação dos mesmos. Esses recipientes foram acondicionados em embalagens térmicas refrigeradas, no mesmo dia da coleta e, posteriormente, encaminhadas ao Laboratório de Parasitologia e Epidemiologia Molecular (LAPEM) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa/MG (DBB/UFV).

O trabalho de coleta dos ácaros baseou-se em Licença Permanente de nº 14840-1 de 07/03/2008, para coleta de material zoológico expedida pelo Sistema

de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO/Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA.

Nas áreas particulares integrantes da área de estudo, todas as coletas foram executadas com autorização de seus proprietários ou de seus representantes. Na coleta realizada no ponto de amostragem 07, houve a contribuição de funcionários da Vigilância Epidemiológica de Caratinga, Estado de Minas Gerais.

4.3. Identificação taxonômica e acondicionamento dos carrapatos

Os carrapatos coletados foram levados para o LAPEM/DBB/UFV, e, imediatamente incubados a 37°C em uma estufa tipo BOD, por 48 horas. Após este período foram mantidos em freezer -20°C por aproximadamente 24 horas.

Os carrapatos coletados foram acondicionados em tubos para centrifuga de 1,5mL ou 2,0mL novos e estéreis. Os carrapatos foram distribuídos da seguinte forma: estágio de larva, cada tubo agrupou de 1 a 30 carrapatos; estágio de ninfa, cada tubo agrupou de 1 a 20 carrapatos; estágio adulto, cada tubo agrupou um carrapato. Foram preparados 126 tubos que corresponderam a 126 amostras. Os carrapatos foram distribuídos de acordo com o estágio de desenvolvimento, o local e a data da coleta e quanto ao sexo, observado nos carrapatos adultos.

Os carrapatos adultos foram identificados taxonomicamente em nível de espécie e os estádios de ninfa e larva, em nível de gênero, por meio de observação morfológica ao microscópio estereoscópico, seguindo a chave de Aragão e Fonseca (1961).

As 126 amostras foram identificadas e numeradas de EPCH_01 até EPCH_126 e armazenadas a -20°C para posterior extração de DNA.

4.4. Extração de DNA dos carrapatos

Para a extração de DNA foi utilizado o método de maceração com bastão de vidro estéril, seguido da purificação com fenol/clorofórmio, de acordo com o protocolo adaptado descrito por Billings et al. (1998), Hill & Gutierrez (2003) e Halos *et al.* (2004). Foi extraído o DNA genômico das 126 amostras de carrapatos e os passos da extração para cada tubo estão descritos a seguir:

- a) Lavagem dos carrapatos. Foi adicionado 200 µL de hipoclorito de sódio 2%, por 5 minutos e, logo depois, a solução foi descartada. Foi adicionado etanol 70% por 5 minutos, e, logo depois, a solução foi descartada. Foi adicionada água ultra-pura, por 8 minutos, e, logo depois, a solução foi descartada. O último procedimento foi repetido por duas vezes.
- b) Após a lavagem foram adicionados 100µl de tampão de lise (NaCl 0,1M; TRIS-HCL 0,21M pH 8,0; EDTA 0,05M e SDS 0,5%) os carrapatos foram macerados, dentro dos próprios tubos, com bastão de vidro esmerilhado, estéril, para extração do DNA. Após a maceração, os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C, por 30 minutos;
- c) Os tubos foram centrifugados a 4000xg por 12 minutos. Feito isso, o sobrenadante de cada tubo foi transferido para novos tubos para centrifuga. Foi adicionado nos tubos 0,5µl de proteinase K (100ug/ml) e os mesmos foram incubados por 1 hora a 50°C. Após esse período, foi adicionado 0,2µl de RNase em cada tubo, posteriormente, estes foram incubados por 2 horas a 37°C;
- d) Foi realizada a desproteíntização (purificação) do DNA pela adição de 100µl de fenol e 100µl de clorofórmio (1:1) em cada tubo, centrifugado a 5000xg por 5 minutos, logo em seguida. A fase aquosa ou sobrenadante era transferido para outro tubo e o restante descartado. Esta etapa foi repetida de 2 a 8 vezes, observando a cada vez o grau de transparência da fase aquosa de cada tubo. O objetivo dessa etapa é a máxima desproteíntização da amostra.

- e) Foi adicionado 100µl de clorofórmio para a extração do fenol residual, contido juntamente com o DNA na fase aquosa transferida. Em seguida, foi centrifugado a 5000xg por 5 minutos e retirado o sobrenadante.
- f) O DNA extraído, contido no sobrenadante, foi precipitado pela adição de 10µl de NaCl 5M e 100µl de isopropanol 100%. Neste passo, o DNA foi armazenado a -20°C por no mínimo 12 horas.
- g) O DNA foi precipitado por meio de centrifugação a 5000xg por 12 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet de DNA formado foi lavado com etanol 70%, e o DNA foi ressuspenso em 30µl de tampão de armazenamento TE (10mM TRIS-HCl, pH 8,0 e 1mM EDTA, pH 8).

4.5. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a investigação molecular de bactérias do gênero *Rickettsia*, o DNA extraído das 126 amostras teciduais dos carrapatos foi agrupado em 34 lotes de acordo com o estágio de desenvolvimento, o local e a data da coleta e quanto ao sexo, observado nos carrapatos adultos (tabela 1).

Os lotes de DNA genômico de carrapatos foram submetidos à *nested*-PCR utilizando dois pares de *primers* que amplificam fragmentos do gene *htrA* responsável por codificar uma proteína antigênica de membrana, gênero específica, de 17 kDa. Este gene é altamente conservado nas riquetsias do grupo da febre maculosa (Parola *et al.*, 2005).

O par de iniciadores 17k-5 (5' GCTTTACAAAATTCTAAAAACCATATA 3') e 17k-3 (5' TGTCTATCAATTCACAACCTTGCC 3') foi utilizado para a primeira reação, amplificando um fragmento de 549pb (Labruna *et al.*, 2004b). Para a segunda reação, a de fragmento interno, foi utilizado o par de iniciadores 17kD1 (5' GCTCTTGCAACTTCTATGTT 3') e 17kD2 (5' CATTGTTCGTCAGGTTGGGG 3'), amplificando um fragmento de 434 pb (Webb *et al.*, 1990; Labruna *et al.*, 2004b).

Tabela 1: Lotes de DNA genômico de carrapatos para a realização da *nested-PCR*.

Lote	Número das amostras	Lote	Número das amostras
01	EPCH_01 a EPCH_04	18	EPCH_91 a EPCH_96
02	EPCH_07 a EPCH_12	19	EPCH_97 a EPCH_102
03	EPCH_13 a EPCH_15	20	EPCH_103 a EPCH_108
04	EPCH_16 a EPCH_18	21	EPCH_110 a EPCH_114
05	EPCH_19 a EPCH_24	22	EPCH_116 a EPCH_119
06	EPCH_25 a EPCH_30	23	EPCH_121 e EPCH_122
07	EPCH_31 a EPCH_36	24	EPCH_123 e EPCH_124
08	EPCH_37 a EPCH_42	25	EPCH_125 e EPCH_126
09	EPCH_43 a EPCH_48	26	EPCH_05
10	EPCH_49 e EPCH_50	27	EPCH_06
11	EPCH_51 a EPCH_54	28	EPCH_72
12	EPCH_55 a EPCH_60	29	EPCH_89
13	EPCH_61 a EPCH_66	30	EPCH_90
14	EPCH_68 a EPCH_71	31	EPCH_109
15	EPCH_73 a EPCH_78	32	EPCH_115
16	EPCH_79 a EPCH_84	33	EPCH_67
17	EPCH_85 a EPCH_88	34	EPCH_120

As reações da *nested-PCR* foram realizadas no Laboratório de Parasitologia e Epidemiologia Molecular (LAPEM) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa/MG (DBB/UFV). Cada reação foi realizada para um volume final de 25µL, contendo 2,5µL de tampão PCR 1X; 1,0µL de cada iniciador; 1,75µL de MgCl₂ 25mM; 0,625µL de cada dNTP 2mM; 0,2µL de Taq DNA Polimerase; 1,0µL de DNA purificado, extraído das amostras (Webb *et al.*, 1990; Labruna *et al.*, 2004b). O volume final foi completado utilizando água ultrapura. Para o controle negativo foi utilizado 1,0µL de água ultrapura. Já para o controle positivo foi utilizado 1,0µL de DNA de *R. rickettsii* purificado disponibilizado pelo Dr. Marcelo Bahia Labruna, da Faculdade de

Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo – USP, Brasil. Para a segunda reação o molde utilizado foi 1µL do produto da primeira reação diluído pelo fator 10^{-3} .

A reação externa foi desenvolvida nas seguintes condições: uma etapa de pré-desnaturação a 95°C, por três minutos; seguida por 40 ciclos de desnaturação a 95°C, por 15 segundos; anelamento dos iniciadores a 48°C, por 30 segundos e extensão a 72°C, por 30 segundos. Logo após os ciclos, segue uma etapa de extensão final a 72°C, por sete minutos (Labruna *et al.*, 2004b). Para a reação interna procedeu-se os seguintes passos: pré-desnaturação a 94°C, por três minutos; seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94°C, por 15 segundos; anelamento dos iniciadores a 57°C, por dois minutos e extensão a 70°C, por dois minutos. Logo após os ciclos, segue uma etapa de extensão final a 70°C, por cinco minutos (Webb *et al.*, 1990). As reações da *n*-PCR foram feitas em um termociclador da Biosystems, modelo Biocycler MJ25+.

Após a realização da *n*-PCR, cinco microlitros dos produtos das reações foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 1,5%, sendo em seguida visualizados num transiluminador para a identificação das bandas.

4.6. Cálculo da taxa mínima de infecção

A taxa mínima de infecção é definida como o menor número de carrapatos infectados presentes em uma determinada população analisada (Guedes *et al.*, 2005). Para o cálculo da taxa mínima de infecção foi mensurado os lotes de carrapatos positivos para a reação da *nested*-PCR, assumindo que no mínimo um carrapato de cada lote positivo analisado estava infectado por riquetsias. O número foi extrapolado para a população de carrapatos do lote analisado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Identificação dos carrapatos coletados

Foram coletados 863 carrapatos de vida livre e 90 carrapatos parasitando animais domésticos no perímetro da área de estudo, perfazendo um total de 953 carrapatos em diferentes estádios de desenvolvimento.

Todos os carrapatos de vida livre coletados pertenciam ao gênero *Amblyomma* (tabela 2), o que sugere o predomínio deste gênero na área de estudo. Resultado semelhante foi encontrado em trabalhos realizados em áreas endêmicas para FMB, em São Paulo (Lemos *et al.*, 1997a; Labruna *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2006) e em Minas Gerais (Lemos *et al.*, 1997b; Oliveira *et al.*, 2000; Cardoso *et al.*, 2006). Em levantamento de carrapatos de vida livre realizado em regiões de Floresta Atlântica Úmida no território brasileiro e de carrapatos parasitando aves que frequentavam estas matas, foi encontrado o predomínio do gênero *Amblyomma* em ambas as condições (Ogrzewalska *et al.*, 2009).

Dos 90 carrapatos coletados em relação de parasitismo com animais domésticos predominou a espécie *A. cajennense*, dos quais apenas um estava parasitando um cão e os demais em eqüídeos (tabela 3). Novamente este resultado sugere o predomínio do gênero *Amblyomma* e, em particular, do *A. cajennense* na região estudada. A segunda espécie de carrapatos mais abundante nos animais domésticos foi a *R. sanguineus* que apresentou um alto percentual de infestação nos cães (tabela 3). Resultado semelhante foi obtido com um estudo de cães em uma área endêmica para FMB no Estado de São Paulo, onde cerca de 65,7% dos carrapatos coletados foram identificados como *R. sanguineus* (Moraes-Filho *et al.*, 2009).

Dos quatro eqüídeos estudados, apenas um apresentou nível de infestação muito baixo, estando os demais parasitados por mais de uma espécie de carrapatos. Dos cinco cães estudados, apenas um estava infestado por carrapatos das espécies *A. cajennense* e *R. sanguineus* (tabela 3).

Tabela 2: Carrapatos de vida livre coletados pelos métodos de arraste de flanela e armadilha de CO₂. Carrapatos de vida livre coletados na área de empreendimento da Pequena Central Hidrelétrica Areia Branca, Vale do Rio Doce, Estado de Minas Gerais.

Identificação	Estádio de Desenvolvimento		Arraste de Flanela	Armadilha de CO ₂	Total (%)
<i>Amblyomma</i> spp.	Larva		150	0	150(17,4)
<i>Amblyomma</i> spp.	Ninfa		6	700	706(81,8)
<i>Amblyomma cajennense</i>	Adulto	Macho	3	0	03(0,3)
<i>Amblyomma cajennense</i>		Fêmea	4	0	04(0,5)
Total (%)			163(18,9)	700(81,1)	863(100)

O estágio de ninfa prevaleceu entre os carrapatos de vida livre coletados (tabela 2), corroborando com os resultados encontrados anteriormente para a espécie *Amblyomma cajennense*, tanto no Estado de Minas Gerais (Oliveira *et al.*, 2000) quanto no Estado de São Paulo (Lemos *et al.*, 1997a; Souza *et al.*, 2006). O período de abrangência sazonal do estágio de ninfa do *A. cajennense* inicia-se em junho e termina em dezembro com pico entre julho a setembro, dependendo das condições climáticas da região em estudo (Lemos *et al.*, 1997a; Oliveira *et al.*, 2000; Souza *et al.*, 2006).

Pode ser observado que a eficiência da técnica de coleta de carrapatos varia de acordo com seu estágio de desenvolvimento (tabela 2). A armadilha de dióxido de carbono (CO₂) (figura 8) apresentou maior eficiência para a coleta de carrapatos de vida livre no estágio de ninfa, enquanto que o método de arraste de flanela branca mostrou ser mais eficiente para o estágio de larva. Oliveira *et al.* (2000), relataram que o método da armadilha de CO₂ é muito eficiente para a coleta de carrapatos no estágio adulto e medianamente eficiente para aqueles no estágio de ninfa e para a coleta de carrapatos que se encontram no estágio larval, a técnica de arraste de flanela apresenta melhores resultados.

Tabela 3: Carrapatos coletados em relação de parasitismo em animais domésticos do ponto amostral 07. Esse ponto amostral refere-se à Fazenda “Estrela”, localizada na área de empreendimento da PCH Areia Branca, no município de Ipanema, Vale do Rio Doce, Estado de Minas Gerais.

Hospedeiro	Carrapatos coletados					Total (%)
	<i>A.cajennense</i>	<i>D. nitens</i>	<i>R.microplus</i>	<i>R.sanguineus</i>	Ixodideo	
Equideo 01	08	08	04	00	00	20(22.22)
Equideo 02	15	00	01	00	00	16(17.78)
Equideo 03	01	00	00	00	00	01(1.11)
Equideo 04	12	00	07	00	02	21(23.33)
Canideo 01	00	00	00	07	00	07(7.78)
Canideo 02	00	00	00	07	00	07(7.78)
Canideo 03	01	00	00	07	00	08(8.89)
Canideo 04	00	00	00	06	00	06(6.67)
Canideo 05	00	00	00	04	00	04(4.44)
Total(%)	37(41.12)	08(8.89)	12(13.33)	31(34.44)	02(2.22)	90(100)

5.2. Detecção de *Rickettsia* spp. por *nested*-PCR

Dos 34 lotes de amostras de DNA genômico de carrapatos testados por *nested*-PCR, sete foram reativos para *Rickettsia* spp., apresentando o fragmento amplificado de 434pb, tamanho esperado na segunda reação (figura 9).

Dos 953 carrapatos coletados neste estudo, pelo menos sete carrapatos, ou seja, um em cada lote positivo para *Rickettsia* spp., amplificaram o fragmento do gene riquetsial. Contudo, podemos observar que carrapatos de diferentes espécies e origens foram positivos pela *nested*-PCR (tabela 4).

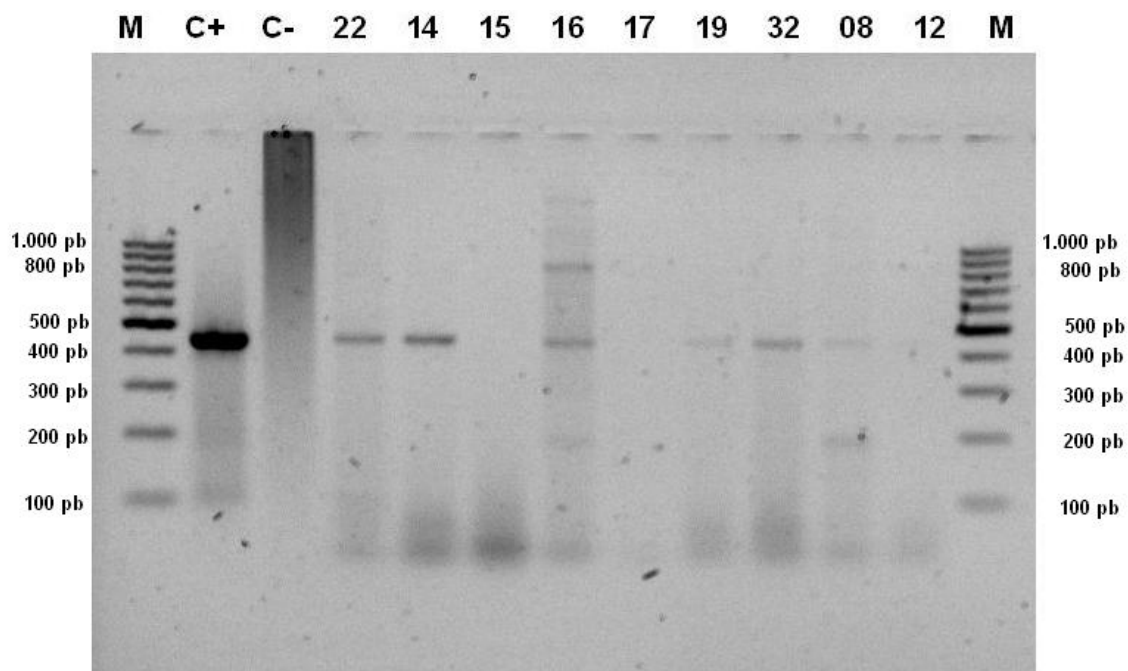


Figura 9: Análise eletroforética da *n*-PCR em gel de agarose 1,2%, para os lotes de carrapatos 08, 12, 14, 15, 16, 17, 19, 22 e 32. M=DNA Ladder/100pb; C+=controle positivo; C-=controle negativo.

A taxa mínima de infecção para os carrapatos do gênero *Amblyomma* coletados tanto em vida livre quanto em relação de parasitismo com animais domésticos, neste trabalho, foi de 0,22%. Entretanto, a taxa mínima de infecção riquetsial em carrapatos de vida livre coletados em uma fazenda experimental da EMBRAPA, situada numa região considerada endêmica para a FMB, no município de Coronel Pacheco, Estado de Minas Gerais, foi de 0,64% para carrapatos do gênero *Amblyomma* (Guedes *et al.*, 2005). Em um trabalho realizado no município de Campinas, área endêmica para FMB do Estado de São Paulo, foi encontrada uma taxa mínima de infecção de 0,50% para carrapatos do gênero *Amblyomma* (Estrada *et al.*, 2006). A diferença entre os resultados destes trabalhos pode ter ocorrido devido ao número amostral utilizado e às características ambientais distintas envolvidas.

A taxa mínima de infecção riquetsial encontrada nos carrapatos de vida livre foi de 0,12%, enquanto nos carrapatos em fase parasitária foi de 6,7%. Portanto, os carrapatos infectados com riquetsia em fase parasitária foi aproximadamente

55 vezes maior, do que os em na fase de vida livre. Valores semelhantes foram verificados por Estrada e colaboradores (2006), que encontraram uma taxa mínima de infecção de 0,29% para carrapatos de vida livre e 5,33% para carrapatos em relação de parasitismo em capivaras. A maior variação na taxa mínima de infecção encontrada nos carrapatos de vida livre pode ter ocorrido em função do número de espécimes e do estágio de desenvolvimento em que foram coletados. A proporção visivelmente maior de contaminação de carrapatos de vida parasitária em relação aos de vida livre, muito provavelmente deve ser em função, também, do tempo de alimentação destes ectoparasitas em hospedeiros contaminados.

A tabela 4 demonstra a taxa mínima de infecção riquetsial distribuídas de acordo com as espécies de carrapatos encontradas neste trabalho, positivos para *Rickettsia* spp. na segunda reação da *nested*-PCR.

Tabela 4: Taxa mínima de infecção riquetsial dos carrapatos coletados, positivos para *Rickettsia* spp. na segunda reação da *nested*-PCR.

Origem	Identificação de Carrapatos	Taxa mínima de infecção
Ambiente	<i>Amblyomma</i> spp.	0,12%
Equídeo	<i>Dermacentor nitens</i>	12,5%
Equídeo	<i>Rhipicephalus microplus</i>	16,67%
Equídeo e Ambiente	<i>Amblyomma cajennense</i>	2,27%
Canídeo	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	6,45%

Guedes e colaboradores (2005) encontraram a taxa mínima de infecção de 1,28% para *A. cajennense*. Estrada e colaboradores (2006) encontraram 0,98% para *A. cajennense*. Oliveira (2005) encontrou uma taxa mínima de infecção riquetsial de 2,6% em *R. sanguineus* parasitando hospedeiros vertebrados, principalmente cães. Observa-se que a diferença entre os resultados obtidos neste e nos trabalhos mencionados, pode ser atribuída a diversos fatores, tais como: o número amostral utilizado por seus autores; a presença de capivaras

contaminadas em área de pastagens de animais domésticos; o tempo de permanência dos animais domésticos em locais de risco, aumentando a possibilidade de infecção destes, e o estado sanitário dos animais da área de coleta.

Dos carrapatos coletados em fase parasitária tanto em cães quanto em equídeos, houve a amplificação de DNA riquetsial em ambos. Cardoso e colaboradores (2006) classificaram esses animais como sentinelas para a FMB em regiões endêmicas e não endêmicas para a doença, por meio de exame sorológico RIFI.

Em relação à área de coleta, na maioria dos pontos retratados neste trabalho houve registro de vestígios que caracterizavam a presença de capivara (figura 10).



Figura 10: Vestígios que caracterizam a presença de capivara em dois pontos da área estudada. (A) Fotografia aérea com a localização dos pontos 01, 02 e 06 da área estudada; (B) Vestígio (fezes) encontrado no ponto 01; (C) Vestígio (fezes) encontrado no ponto 06.

O fato desse mamífero apresentar alta taxa reprodutiva e possuir vida intensamente gregária, permitindo a passagem de carrapatos entre os indivíduos, sugere que essa espécie está diretamente vinculada com a manutenção da população de carrapatos em níveis elevados no ambiente natural (Camargo-Neves *et al.*, 2004). Lemos e colaboradores (1996b) caracterizam esse mamífero como um ótimo hospedeiro vertebrado para o carrapato do gênero *Amblyomma*. Esses registros corroboram o elevado número de espécimes do gênero

Amblyomma em diversos estádios de desenvolvimento encontrados neste trabalho.

Os animais silvestres (capivaras, marsupiais, pequenos roedores, dentre outros) são forçados a migrar para outras áreas em busca de abrigo ou de comida, devido a ação antrópica sobre seu ambiente natural. Essa migração pode aumentar o contato entre animais silvestres e domésticos, elevando também o risco de transmissão de agentes patogênicos ao homem (Cunha *et al.*, 2009).

Após um longo período sem notificações suspeitas para FMB no município de Caratinga/MG e arredores, foram notificados nove casos suspeitos no ano de 2008. Uma destas chamou a atenção: Uma criança de onze anos residente na Fazenda Estrela, dentro da área de estudo, apresentou evolução para óbito cerca de duas semanas após o início do seu quadro clínico sem confirmação posterior (Vigilância Epidemiológica do Município de Caratinga – comunicação pessoal). Além desta, duas outras notificações referem-se a pacientes que residem nas proximidades da PCH Areia Branca.

Com base nesta informação, fomos à Fazenda Estrela localizada próximo à margem direita do Rio Manhuaçu, onde foram coletados os carrapatos em vida parasitária deste estudo (tabela 3). Não se pode afirmar que a *Rickettsia* spp. circulante nos carrapatos do ambiente e de animais domésticos seja uma espécie patogênica ao homem, porém, há indícios que possam ser.

Devido a região de Caratinga ser comprovadamente uma área endêmica para FMB, com ocorrência de casos comprovados em humanos, novos estudos devem ser feitos neste local para favorecer um monitoramento mais eficiente de riquetisioses dentro do sistema de vigilância epidemiológica da região.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, pode ser concluído que:

1. Na área estudada, situada na zona rural do município de Caratinga, Estado de Minas Gerais, verificou-se a ocorrência de três gêneros de carrapatos: *Amblyomma*, *Dermacentor* e *Rhipicephalus*.
2. Para os carrapatos do gênero *Amblyomma*, o estágio evolutivo predominante na área durante o período estudado foi de ninfa.
3. A taxa mínima de infecção riquetsial nos carrapatos coletados neste estudo foi de 0,73%.
4. Há riquetsias circulantes em carrapatos coletados na área estudada.
5. Existe o risco da transmissão de febre maculosa na região.

7. PERSPECTIVAS

Para fornecer dados mais precisos de estudos populacionais de carrapatos de vida livre e parasitária, além do melhor entendimento das relações ecológicas existentes entre riquetsia-carrapato-hospedeiro vertebrado, sendo esses últimos tanto animais domésticos quanto silvestres, é preciso dar continuidade a este trabalho, para a qual são sugeridos as seguintes ações:

- ✓ Seqüenciar todas as amostras positivas para *Rickettsia* spp. encontradas neste trabalho;
- ✓ Realizar estudo por um período prolongado, representativo, coletando carrapatos de forma quinzenal para observar a variação sazonal na distribuição dos carrapatos capturados com a finalidade de estudar a atividade sazonal, a dinâmica de população e o nível de infecção de riquetsias nesses ectoparasitas;
- ✓ Realizar coletas por um período prolongado de carrapatos de vida livre e parasitária em animais silvestres e domésticos da região, com a finalidade de observar a distribuição e o nível de infecção destes ectoparasitas;
- ✓ Realizar coleta periódica de soro de animais silvestres e domésticos da região, com a finalidade de detectar a presença de anticorpos anti-riquetsiais;
- ✓ Realizar o monitoramento dos diferentes animais silvestres que estão diretamente envolvidos com o ciclo enzoótico das riquetsias, com a finalidade de obter dados referentes a densidade da população e a forma de dispersão utilizadas pelos mesmos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAGÃO, H.B.; FONSECA, F. 1961. Notas de ixodologia. VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 59(2):115-129.
- BARROS, E.; CASTILHO-SILVA, A.W.; GALVÃO, C.; MAFRA, C.L.; GALVÃO, M.A.M.; SANTOS, P.S. 2005. Levantamento das notificações suspeitas para febre maculosa em Caratinga, Vale do Rio Doce, Minas Gerais, no período pós-surto. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 9(1): S236.
- BARROS-BATESTI, D.M.; ARZUA, M.; BECHARA, G.H. 2006. **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, 223pp.
- BILLINGS, A.N.; TELTOW, G.J.; WEAVER, S.C.; WALKER, D.H. 1998. Molecular characterization of a novel *Rickettsia* species from *Ixodes scapularis* in Texas. **Emerging Infectious Diseases**, 4(2):305-309.
- BRATTON, R.L.; COREY, G.R. 2005. Tick-borne disease. **American Family Physician**, 71(12):2323-2330.
- CAMARGO-NEVES, V.L.F.; VIEIRA, A.M.L.; SOUZA, C.E.; LABRUNA, M.B.; MAYO, R.C. & SOUZA, S.S.L. 2004. **Manual de vigilância acarológica**. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 63 pp.,
- CARDOSO, L.D.; FREITAS, R.N.; MAFRA, C.L.; NEVES, C.V.B.; FIGUEIRA, F.C.B.; LABRUNA, M.B.; GENNARI, S.M.; WALKER, D.H.; GALVÃO, M.A.M. 2006. Caracterização de *Rickettsia* spp. circulante em foco silencioso de febre maculosa brasileira no Município de Caratinga, Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, 22(3):495-501.

- CUNHA, N.C.; FONSECA, A.H.; REZENDE, J.; ROZENTAL, T.; FAVACHO, A.R.M.; BARREIRA, J.D.; MASSARD, C.; LEMOS, E.R.S. 2009. First identification of natural infection of *Rickettsia rickettsii* in the *Rhipicephalus sanguineus* tick, in the State of Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 29(2):105-108.
- DRUMMOND, G.M.; MARTINS, C.S.; MACHADO, A.B.M.; SEBAIO, F.A.; ANTONINI, Y. 2005. **Biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para sua conservação**. 2^a.ed. Fundação Biodiversitas. Belo Horizonte. 222 pp.
- ESTRADA, D.A.; SCHUMAKER, T.T.S.; SOUZA, C.E.; NETO, E.J.R.; LINHARES, A.X. 2006. Detecção de riquetsias em carrapatos do gênero *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) coletados em parque urbano do município de Campinas, SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 39(1):68-71.
- GALVÃO, M.A.M. **Febre maculosa em Minas Gerais: um estudo sobre a distribuição da doença no estado e seu comportamento em área de foco peri-urbano**. 1996. 60f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1996.
- GALVÃO, M.A.M.; RIBEIRO, J.G.L; MACHADO-PINTO, J.; LEITE, R.C.; BRITO, M.G.; REZENDE, S.M.; CALIC, S.B.; SEVALHO, G. 2001. **Informe técnico de febre maculosa**. In: Informe técnico de febre maculosa, 2^a edição. Coordenação Estadual de Controle de Zoonoses. Belo Horizonte, 26 pp.
- GALVÃO, M.A.M.; LAMOUNIER, J.A.; BONOMO, E.; TROPIA, M.S.; 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. 2002. Rickettsioses emergentes e reemergentes numa região endêmica do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, 18(6):1593-1597.
- GALVÃO, M.A.M.; DUMLER, J.S.; MAFRA, C.L.; CALIC, S.B.; CHAMONE, C.B.; CESARINO-FILHO, G; OLANO, J.P.; WALKER, D.H. 2003. Fatal spotted

- fever rickettsiosis, Minas Gerais, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, 9(11): 1402-1405.
- GAYLE, A.; RINGDAHL, E. 2001. Tick-borne disease. **American Family Physician**, 64(3):461-466.
- GUEDES, E.; LEITE, R.C.; PRATA, M.C.A.; PACHECO, R.C.; WALKER, D.H.; LABRUNA, M.L. 2005. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new brazilian spotted fever-endemic area in the State of Minas Gerais. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 100 (8): 841-845.
- HALOS, L.; JAMAL, T.; VIAL, L.; MAILLARD, R.; SUAUI, A.; MENACH, A.L.; BOULOUIS, H.J.; TAUSSAT, M.V. 2004. Determination of an efficient and reliable method for DNA extraction from ticks. **Veterinary Research**, 35:709-713.
- HILL, C.A. and GUTIERREZ, J.A. 2003. A method for extraction and analysis of high quality genomic DNA from ixodid ticks. **Medical and Veterinary Entomology**, 17:224-227.
- KAUFMAN, W.R. 1989. Tick-host interaction: A synthesis of current concepts. **Parasitology Today**, 5(2):45-46.
- LABRUNA, M.B.; KASAI, N.; FERREIRA, F.; FACCINI, J.L.H.; GENNARI, S.M. 2002. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, 105:65-77.
- LABRUNA, M.B.; LEITE, R.C.; GOBESSO, A.A.O.; GENNARI, S.M.; KASAI, N. 2004(a). Controle estratégico do carrapato *Amblyomma cajennense* em equinos. **Ciência Rural**, 34(1):195-200.
- LABRUNA, M.B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M.C.; BOUYER, D.H.; McBRIDE, J.W.; PINTER, A.; POPOV, V.; GENNARI, S.M.; WALKER, D.H. 2004(b). *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the

State of São Paulo, Brazil, where brazilian spotted fever is endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, 42(1):90-98.

LABRUNA, M.B. 2009. Ecology of rickettsia in South America. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1166: 156-166.

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

LEMOS, E.R.S. **Aspectos epidemiológicos da riquetsiose do grupo da febre maculosa em uma área endêmica do Estado de Minas Gerais, Brasil.** 1991. 46f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, 1991.

LEMOS, E.R.S.; MACHADO, R.D.; COURA, J.R.; GUIMARÃES, M.A.A.M.; CHAGAS, N. 1996(a). Epidemiological aspects of the brazilian spotted fever: Serological survey of dogs and horses in an endemic area in the State of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 38(6):427-430.

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

LEMOS, E.R.S.; MACHADO, R.D.; COURA, J.R.; GUIMARÃES, M.A.A.; SERRA-FREIRE, N.M.; AMORIM, M.; GAZETA, G.S. 1997(a). Epidemiological aspects of the brazilian spotted fever: Seasonal activity of ticks collected in an endemic area in São Paulo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 30(3):181-185.

LEMOS, E.R.S.; MACHADO, R.D.; PIRES, F.D.A.; MACHADO, S.L.; COSTA, L.M.C.; COURA, J.R. 1997(b). Rickettsiae-infected ticks in an endemic area

of spotted fever in the State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 92(4):477-481.

McLEOD, M.P.; QIN, X.; KARPATY, S.E.; GIOIA, J.; HIGHLANDER, S.K.; FOX, G.E.; McNEILL, T.Z.; JIANG, H.; MUZNY, D.; JACOB, L.S.; HAWES, A.C.; SODERGREN, E.; GILL, R.; HUME, J.; MORGAN, M.; FAN, G.; AMIN, A.G.; GIBBS, R.A.; HONG, C.; YU, X.J.; WALKER, D.H.; WEINSTOCK, G.M. 2004. Complete genome sequence of *Rickettsia typhi* and comparison with sequences of other Rickettsiae. **Journal of Bacteriology**, 186(17): 5842-5855.

MELO, L.C.N.; SALINO, A. 2002. Pteridófitas de duas áreas de florestas da bacia do Rio Doce no Estado de Minas Gerais, Brasil. **Lundiana**, 3(2): 129-139.

MORAES-FILHO, J.; PINTER, A.; PACHECO, R.C.; GUTMANN, T.B.; BARBOSA, S.O.; GONZÁLES, M.A.R.M.; MURARO, M.A.; CECÍLIO, S.R.M.; LABRUNA, M.B. 2009. New epidemiological data on brazilian spotted fever in an endemic area of the State of São Paulo, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, 9(1):73-78.

OGRZEWSKA, M.; PACHECO, R.C.; UEZU, A.; RICHTZENHAIN, L.J.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M.B. 2009. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting birds in na Atlantic rain Forest region of Brazil. **Journal of Medical Entomology**, 46(5):1225-1229.

OLIVEIRA, K.A. 2005. **Investigação Molecular de Organismos da Ordem Rickettsiales em Ectoparasitos de Animais de Área Endêmica para a Febre Maculosa Brasileira**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 89 pp.

OLIVEIRA, K.A.; OLIVEIRA, L.S.; DIAS, C.C.A.; SILVA-JÚNIOR, A.; ALMEIDA, M.R.; ALMADA, G.; BOUYER, D.H.; GALVÃO, M.A.M.; MAFRA, C.L. 2008. Molecular identification of *Rickettsia felis* in ticks and fleas from an endemic

area for brazilian spotted fever. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 103(2):191-194.

OLIVEIRA, P.R. ***Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae): avaliação de técnicas para o estudo de dinâmica populacional e biotecnologia**. 1998. 56f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1998.

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

PACHECO, R.C.; HORTA, M.C.; PINTER, A.; MORAES-FILHO, J.; MARTINS, T.F.; NARDI, M.S.; SOUZA, S.S.A.L.; SOUZA, C.E.; SZABÓ, M.P.J.; RICHTZENHAIN, L.J.; LABRUNA, M.B. 2009. Pesquisa de *Rickettsia* spp. em carrapatos *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* no Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 42(3):351-353.

PAROLA, P.; PADDOCK, C.D.; RAOULT, D. 2005. Tick-borne rickettsioses around the world: Emerging diseases challenging old concepts. **Clinical Microbiology Reviews**, 18(4):719-756.

PISA, J.T. 1932. **Considerações epidemiológicas e clínicas sobre o tifo exantemático de São Paulo**. In: Piza, J.T.; Meyer, J.R.; Salles Gomes, L.; editors. Tifo Exantemático de São Paulo. São Paulo (SP): Sociedade Imprensa Paulista. P.11-119.

RAOULT, D.; PAROLA, P. 2007. **Rickettsial diseases**. In: Raoult, D. & Parola, P. editors. Rickettsial Diseases. London: Informa Healthcare, 379p.

RAOULT, D.; ROUX, V. 1997. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, 10(4):694-619.

- RICKETTS, H.T. 1909. Some aspects of Rocky Mountain Spotted Fever as shown by recent investigations. **Medical Record**, 76:843-855.
- ROJAS, R.; MARINI, M.A.; COUTINHO, M.T.Z. 1999. Wild birds as hosts of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, 94(3):315-322.
- SOUZA, S.S.A.L.; SOUZA, C.E.; NETO, E.J.R.; PRADO, A.P. 2006. Dinâmica sazonal de carrapatos (Acari: Ixodidae) na mata ciliar de uma área endêmica para febre maculosa na região de Campinas, São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, 36(3):887-891.
- STENOS, J.; GRAVES, S.; POPOV, V.L.; WALKER, D.H. 2003. *Aponomma Hydrosauri*, the reptile-associated tick reservoir of *Rickettsia honei* on Flinders Island, Australia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 69(3):314-317.
- VALBUENA, G.; FENG, H.M.; WALKER, D.H. 2002. Mechanisms of immunity against rickettsiae. New perspectives and opportunities offered by unusual intracellular parasites. **Microbes and Infection**, 4:625-633.
- WALKER, D.H. 1998. Tick-transmitted infectious diseases in the United States. **Annual Review of - Public Health**, 19:237-269.
- WEBB, L.; CARL, M.; MALLOY, D.C.; DASCH, G.A.; AZAD, A.F. 1990. Detection of murine typhus infection in fleas by using the polimerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, 28(3):530-534.

9. APÊNDICE

1. Extração de DNA:

TE (pH = 7,4)

10 mM de Tris-HCl (pH = 7,4)

1 mM de EDTA (pH = 8,0)

Aferir o pH, completar o volume com H₂O ultrapura e autoclavar a solução.

Tampão de Extração (200 mL)

Tris-HCl 0,1 M pH = 8,0 20 mL

EDTA 0,5 M pH = 8,0 40 µL

SDS 10% 10 mL

RNAse pancreática 400 µL

H₂O ultrapure q.s.p. 200 mL

A RNAse deve ser adicionada após autoclavar a solução