

KARLA ANDRADE OLIVEIRA

INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE ORGANISMOS DA ORDEM RICKETTSIALES
EM ECTOPARASITOS DE ANIMAIS DE ÁREA ENDÊMICA PARA A FEBRE
MACULOSA BRASILEIRA

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2005

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

O48i
2005

Oliveira, Karla Andrade, 1977-

Investigação molecular de organismos da ordem
rickettsiales em ectoparasitos de animais de área endêmi-
ca para a febre maculosa brasileira / Karla Andrade Oli-
veira. – Viçosa: UFV, 2005.
xii, 89f : il. ; 29cm.

Inclui anexo.

Orientador: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referência bibliográfica: f. 66-85

1. *Rickettsia* - Identificação. 2. *Rickettsia* - Filogenia.
3. Febre maculosa - Epidemiologia. 4. Animais
domésticos - Parasito. 5. Animais silvestres - Parasito.
6. Biologia molecular. 7. Reação em cadeia de polimerase.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 636.0896

KARLA ANDRADE OLIVEIRA

INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE ORGANISMOS DA ORDEM RICKETTSIALES
EM ECTOPARASITOS DE ANIMAIS DE ÁREA ENDÊMICA PARA A FEBRE
MACULOSA BRASILEIRA

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

APROVADA EM: 28 de Julho de 2005

Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo
(Conselheira)

Márcio Antônio Moreira Galvão
(Conselheiro)

Tânia Toledo de Oliveira

Jorge Abdala Dergam dos Santos

Cláudio Lísias Mafra de Siqueira
(Orientador)

“Tenho apenas duas mãos e o sentimento do mundo...” Carlos Drumond de Andrade

Aos meus pais que acreditaram e sonharam comigo os meus sonhos, proporcionando-me todo apoio de que precisei, e às minhas queridas irmãs que torceram e participaram das minhas conquistas, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por mais essa conquista em minha vida.

À minha família por todo apoio e estímulo.

Ao Juliano pelo carinho e companheirismo.

Aos meus amigos Raquel, Cristiane, Karla, Evaldo, Shirlene, Paula, Heraldo, Jaqueline, Sheila, Nataly, Veridiana e Fabiana, pelo consolo em momentos difíceis.

Ao professor Mafra pela orientação, amizade, paciência, e por acreditar em mim, fazendo-me também acreditar na minha capacidade em desenvolver este trabalho.

À professora Márcia Rogéria pelas orientações e por proporcionar a realização dos experimentos em seu laboratório.

Ao professor Márcio Galvão pela credibilidade na realização deste trabalho.

À Camila e à Luciana pela grande colaboração na obtenção dos resultados desta dissertação.

Ao Sr. Valdir pela disposição em ajudar sempre.

Aos amigos do Laboratório de Virologia Molecular Animal, Abelardo, Fernanda Miquelito e Luíza, pelo auxílio no meu aprendizado e aos demais, pela força e companheirismo.

Aos Drs. David Walker e Donald Bouyer, da University of Texas Medical Branch, EUA, pelo apoio científico e financeiro.

Ao Dr. Gilton Luiz Almada, pelo apoio, participação e disponibilização das informações necessárias para este trabalho.

Aos funcionários da Secretaria de Vigilância em Saúde, MS, Marcelo Yoshito Wada, Marcelo Santalucia e Antônio Lima Neto, pelo apoio na coleta dos ectoparasitos.

Aos colaboradores, Augusto Marchon Zago, Maxwell Marchito de Freitas da Secretaria de Saúde do Espírito Santo, Marllus Cavalcante da Secretaria de Municipal Saúde de Nova Venécia, Marcelo Renan de Deus Santos e Gilberto Marcos Junior do Centro Universitário Vila Velha, e Celso Eduardo de Souza da SUCEN/SP, pelo auxílio na coleta dos ectoparasitos e apoio logístico.

Ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica Agrícola do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa.

À CAPES pelo fornecimento da bolsa.

ÍNDICE

Lista de Tabelas, Figuras e Quadros	viii
Lista de Termos e Abreviações	x
Resumo	xii
Abstract	xiii
1- Introdução	1
2- Revisão Bibliográfica	4
2.1-Etiologia	5
2.2-Febre Maculosa	6
2.2.1- Histórico	6
2.2.2- Dinâmica de Interação <i>Rickettsia</i> -vetor	8
2.2.3- Ecologia	10
2.2.4- Patogenia e Características Clínicas por <i>Rickettsia rickettsii</i>	13
2.2.5- Aspectos Epidemiológicos	15
2.2.6- Diagnóstico Laboratorial	17
2.2.7- Investigação Molecular	18
2.3-Rickettsiose felis.	20
2.4- Ehrlichiose	22
3- Justificativa	25
4- Objetivos	27
4.1- Objetivo Geral	28
4.2- Objetivos específicos	28
5- Materiais e Métodos	29
5.1- Caracterização da região de estudo	30
5.2- Coleta de Carrapatos e Pulgas	31
5.3- Reação em Cadeia da Polimerase	32
5.3.1- Extração de DNA	32
5.3.2- Protocolo da Reação em Cadeia da Polimerase	33
5.3.2.1- Reação <i>Rickettsia</i> gênero-específica	37
5.3.2.2- Reação <i>Ehrlichia</i> gênero- específica	38
5.3.2.3- Reação para detecção de outros gêneros	39
5.4- Sequenciamento	39
5.4.1- Clonagem	39
5.4.2- Transformação em célula bacteriana competente	40
5.4.3- Triagem das colônias recombinantes	40
5.4.4- Purificação dos plasmídios recombinantes	41

5.4.5- Purificação dos produtos da Reação em Cadeia da Polimerase	41
5.4.6- Reação de sequenciamento	41
5.4.7- Análise da seqüência nucleotídica	42
6- Resultados e Discussão	43
6.1- Identificação dos ectoparasitos	44
6.2- Detecção de patógenos	48
6.2.1- Detecção de <i>Rickettsia</i> através do gene proteína 17kDa	48
6.2.2- Detecção de <i>Ehrlichia</i>	53
6.2.3- Detecção de gêneros relacionados	55
6.3- Análise de similaridade	56
6.4- Análise Filogenética	58
7- Conclusões	62
8- Considerações Finais	64
9- Bibliografia	66
10- Anexo	82

LISTA DE TABELAS, FIGURAS E QUADROS

Tabela 1: Manifestações clínicas dentre os casos suspeitos de rickettsiose humana na localidade de Patrimônio do XV, Nova Venécia, Espírito Santo, 2003.....	31
Tabela 2: Identificação das espécies de ectoparasitos e distribuição por número de lotes coletados para cada estágio de desenvolvimento, Nova Venécia, ES, 2003.....	44
Tabela 3: Porcentagem de lotes de ectoparasitos positivos para <i>Rickettsia</i> em relação ao número de lotes coletados para cada espécie, Nova Venécia, Espírito Santo, 2003.....	52
Tabela 4: Identificação das espécies de <i>Rickettsia</i> segundo espécies de ectoparasitos de origem, Nova Venécia, Espírito Santo, 2003.....	57
Figura 1: Vista da região central de Patrimônio do XV, município de Nova Venécia, Espírito Santo.....	30
Figura 2: Coleta de carrapatos de vida livre em Patrimônio do XV, Nova Venécia, Espírito Santo, 2003.....	32
Figura 3: Evidência da presença de capivaras no local de coleta de ectoparasitos, Nova Venécia, Espírito Santo, 2003.....	45
Figura 4: Resultado de PCR e <i>nested</i> -PCR para detecção de <i>Rickettsia</i> , em gel de agarose 1%.....	50
Figura 5: Resultado de PCR e <i>nested</i> -PCR para detecção de <i>Rickettsia</i> , em gel de agarose 1%.....	51
Figura 6: Resultado de PCR para detecção de <i>Ehrlichia</i> , em gel de agarose 1%.....	54

Figura 7: PCR (purificado) de DNA extraído de carrapato e pulga com os <i>primers</i> Rpcs1258n e RpCs877 para amplificação de fragmento de DNA que codifica para citrato sintase, em gel de agarose 1%.....	55
Figura 8: Filograma baseado em seqüência parcial do gene da proteína 17kDa mostrando o relacionamento filogenético entre as seqüências de <i>R. felis</i> (UFV1 e UFV2) e espécies de <i>Rickettsia</i> validadas, com seqüências depositadas no GenBank, pelo método evolução mínima.....	60
Figura 9: Filograma baseado em seqüência parcial do gene da proteína 17kDa mostrando o relacionamento filogenético entre as seqüências de <i>R. felis</i> (UFV1 e UFV2) e espécies de <i>Rickettsia</i> validadas, com seqüências depositadas no GenBank, pelo método máxima parsimônia.....	61
Quadro 1: Conteúdo dos lotes de ectoparasitos coletados na área de estudo, Nova Venécia, Espírito Santo, 2003.....	33
Quadro 2: Lista dos lotes de ectoparasitos positivos para <i>Rickettsia spp.</i> , Nova Venécia, Espírito Santo, 2003.....	49

LISTA DE TERMOS E ABREVIações

μL	Microlitro, 10^{-6}L
μM	Micromolar, 10^{-6}M
BOD	Demanda biológica de oxigênio
BSA	Albumina de soro bovino
BSF	Brazilian spotted fever
ddNTPs	Dideoxynucleotídeos trifosfatados
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxynucleotídeos trifosfatados
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
<i>et al.</i>	e colaboradores
FMB	Febre maculosa brasileira
GFM	Grupo da febre maculosa
GT	Grupo do tifo
HGE	Ehrlichiose granulocítica humana
HME	Ehrlichiose monocítica humana
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactosídeo
KDa	KiloDalton
LB	Meio Luria-Bertani
M	Molar
MgCl_2	Cloreto de Magnésio
ML	Mililitro, 10^{-3}L
mM	Milimolar, 10^{-3}M
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanogramas, 10^{-9} gramas
<i>n</i> -PCR	<i>neted</i> -PCR
pb	Pares de bases
PBS	Solução de fosfato tamponada
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pg	Picogramas, 10^{-12} gramas
pH	Potencial hidrogeniônico
<i>primer</i>	Oligonucleotídeo iniciador
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta

RMSF	<i>Rocky Mountain Spotted Fever</i>
rOmpA	<i>Rickettsial outer membrane protein A</i> (proteína rickettsial de superfície de membrana A)
rOmpB	<i>Rickettsial outer membrane protein B</i> (proteína rickettsial de superfície de membrana B)
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TAE	Tampão tris-acetato EDTA
Taq	<i>Termus aquaticus</i>
x g	Múltiplos da gravidade terrestre (9,8m/s ²)
X-Gal	5-Bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactosídeo

RESUMO

OLIVEIRA, Karla Andrade. M.S. Universidade Federal de Viçosa. Julho de 2005
Investigação molecular de organismos da Ordem Rickettsiales em ectoparasitos de animais de área endêmica para a Febre Maculosa Brasileira. Orientador: Cláudio Lísias Mafrá de Siqueira. Conselheiros: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo e Márcio Antônio Moreira Galvão.

As rickettsioses constituem um grupo de doenças causadas por parasitas intracelulares obrigatórios da Ordem Rickettsiales. A febre maculosa brasileira (FMB) é a doença rickettsial mais prevalente no Brasil. Este trabalho teve como objetivo a detecção e caracterização molecular desses agentes para o conhecimento dos seus ciclos em ectoparasitos de animais domésticos e do ambiente em uma área endêmica para FMB no Estado do Espírito Santo. Foram coletados 502 ectoparasitos das espécies *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma cooperi*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Anocentor nitens* e *Ctenocephalides felis*, de animais domésticos (cães e eqüinos) e do ambiente, os quais foram divididos em 152 lotes de acordo com a origem. Em lotes de todas as espécies de ectoparasitos citadas detectaram-se *Rickettsia* spp. em prevalências de 21,5%, 26%, 11,5%, 23,5% e 25%, respectivamente, pela amplificação de fragmentos do gene que codificam para a proteína 17kDa. *Ehrlichia* sp foi encontrada em 1,4% de lotes de *R. sanguineus* e em 4,0% de *C. felis* a partir de iniciadores gênero específicos para o gene do rRNA 16S. Fragmentos de 381pb do gene que codifica para a enzima citrato sintase foram amplificados de seis lotes, três dos quais foram negativos à amplificação por *primers* para o gene da proteína 17kDa. *Rickettsia felis* foi identificada em *R. sanguineus* e *C. felis* e *Rickettsia prowazekii* foi identificada em *A. cooperi*, *C. felis* e *R. sanguineus*. Com base nos resultados de comparação de seqüências do gene que codifica para a proteína 17kDa, dois fragmentos de *R. felis* amplificados neste estudo relacionaram-se mais proximamente com espécies de *Rickettsia* do grupo da febre maculosa, com seqüências nucleotídicas depositadas no GenBank, formando um sub-grupo com *R. australis*. Este é o primeiro relato no Brasil de *Rickettsia prowazekii* em carrapatos e pulgas e o primeiro achado de infecção de *A. cooperi* por este patógeno. Estudos mais detalhados são necessários para o entendimento da ecologia de *Rickettsia* e da epidemiologia de rickettsioses na área de estudo.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Karla Andrade. M.S. Universidade Federal de Viçosa. July, 2005.
Molecular investigation of Rickettsiales order organisms in ectoparasites of domestic animals in an endemic area for the Brazilian spotted fever.
Adviser: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira. Committee members: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo and Márcio Antônio Moreira Galvão.

The rickettsioses constitute a group of diseases caused by obligate intracellular parasites of the Order Rickettsiales. The Brazilian spotted fever (BSF) is the most prevalent rickettsial disease in Brazil. This work aimed the detection and molecular characterization of those agents to know their biological cycles in ticks and fleas of domestic animals and the environment in an endemic area for BSF in the State of Espírito Santo. Five hundred and two ectoparasites were collected, among *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma cooperi*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Anocentor nitens* and *Ctenocephalides felis* from domestic animals (dogs and equines) and from the environment and they were divided in 152 lots according to the origin. *Rickettsia* spp were detected in lots of all the species of ectoparasites cited, in a prevalence 21.5%, 26%, 11.5%, 23.5% and 25%, respectively, by amplification of fragments of the 17kDa protein- encoding gene. *Ehrlichia* sp. was found in 1.4% of lots of *R. sanguineus* and in 4.0% of *C. felis* by amplification of 16S rRNA (rDNA) gene fragments. Fragments of 381 bp of the citrate synthase-encoding gene were amplified from six lots, three of them were negative to the amplification with primers for 17kDa-antigen gene. *Rickettsia felis* was identified in *R. sanguineus* and *C. felis* and *Rickettsia prowazekii* was identified in *A. cooperi*, *C. felis* and *R. sanguineus*. On the basis of the results 17 kDa-protein gene sequences comparisons, two *R. felis* fragments amplified in this study were closely related to species of *Rickettsia* of spotted fever group, with nucleotides sequences deposited in the GenBank, and they formed a cluster with *R. australis*. This is the first report in Brazil of *R. prowazekii* in ticks and fleas and the first discovery of infection of *A. cooperi* by this pathogen. More detailed studies are necessary to understanding the *Rickettsia* ecology and its epidemiology in the studied area.

1- INTRODUÇÃO

A Febre Maculosa Brasileira (FMB) é a mais prevalente doença rickettsial no Brasil (Lemos et al., 2001). A enfermidade é causada pela *Rickettsia rickettsii*, uma bactéria pertencente à Ordem Rickettsiales, família Rickettsiaceae, cujos membros foram descritos como microorganismos intracelulares obrigatórios, muitos dos quais causando doenças de distribuição mundial, em humanos e outros hospedeiros vertebrados e invertebrados (Raoult e Roux, 1997).

Devido à sua sobrevivência estritamente intracelular, estes organismos são classicamente transmitidos ao homem através da picada de vetores artrópodes, sendo o carrapato *Amblyomma cajennense*, o principal vetor de *Rickettsia rickettsii* no Brasil (Labruna et al., 2004), um dos principais reservatórios da FMB (Aragão & Fonseca, 1961; Figueiredo et al., 1999).

A FMB vem se consolidando como uma antropozoonose de difícil controle, significativa morbidade e elevada letalidade (Angerami, 2004). De caráter emergente, a doença é considerada, desde o ano de 2002, um agravo de notificação compulsória (SVS, 2002), apresentando-se, clinicamente, com febre alta, início brusco, cefaléia, mialgias e prostração, seguidos de exantema máculo papular, que predomina nos membros, atingindo as palmas das mãos e plantas dos pés, podendo evoluir para petéquias, equimoses e hemorragias (Melles et al., 1992).

No Brasil, a ocorrência da FMB tem sido reportada em Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia, sendo monitorada por um sistema de vigilância epidemiológica com uma rede de laboratórios de referência para enfermidades rickettsiais. Esse sistema de vigilância foi iniciado nos Estados de Minas Gerais e São Paulo.

Ainda agrupados na ordem Rickettsiales, destacam-se os organismos pertencentes ao gênero *Ehrlichia*, que compreende bactérias pequenas, pleomórficas e intracelulares obrigatórias que parasitam fagossomos de leucócitos (Dumler et al., 1998). Também as ehrlichioses, como as rickettsioses, são, em todo o mundo, atualmente, reconhecidas como infecções emergentes humanas transmitidas por vetores artrópodes, principalmente o carrapato (Dumler e Bakken, 1995 e 1998).

Três ehrlichioses humanas têm sido relatadas: ehrlichiose monocítica humana devido a *Ehrlichia chaffeensis*, infecções devido a *Ehrlichia ewingii* e ehrlichiose granulocítica humana devido ao *Anaplasma phagocytophilum*, conhecida como *HGE agent* (Dumler e Bakken, 1995). Os sintomas incluem febre, dor de cabeça, mialgia, confusão mental, falha renal, desordens de coagulação intravascular, meningoencefalite, síndrome da deficiência respiratória do adulto e

coma, nos casos mais graves, entre outros (Jennifer e Stephen, 2004). No Brasil, foram encontrados os primeiros relatos de casos humanos confirmados desta enfermidade por Calic et al. (2004).

A implementação de técnicas que permitem distinguir as diferentes rickettsioses tem sido fundamental para elucidar infecções tais como ehrlichioses e outras doenças rickettsiais (Calic et al., 2004). Destaca-se, aqui, a aplicação de diagnóstico molecular, que tem possibilitado a descoberta de novas espécies de rickettsias em todo o mundo (Eremeeva et al., 1994, Billings et al., 1998), a caracterização molecular dos gêneros *Rickettsia* e *Ehrlichia*, bem como, esclarecimentos importantes com relação a outras já descritas (Fournier et al., 1998).

O presente estudo propôs a identificação e o estudo dos ciclos doméstico e silvestre de agentes rickettsiais em ectoparasitos de animais domésticos e silvestres em áreas endêmicas para Febre Maculosa Brasileira, pela utilização de técnicas moleculares, buscando mais informações a respeito de espécies de *Rickettsia* e *Ehrlichia* circulantes nessas mesmas áreas.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- ETIOLOGIA

As rickettsioses constituem um grupo de doenças causadas por parasitas intracelulares obrigatórios com características de bactérias gram-negativas da Ordem Rickettsiales (Dumler et al., 2001).

A ordem Rickettsiales compreende os gêneros *Rickettsia*, *Orientia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia* e *Wolbachia*.

Tradicionalmente, o gênero *Rickettsia* tem sido dividido em dois grupos, chamados o Grupo do Tifo (GT) e o Grupo das Febres Maculosas (GFM), com base em análises fenotípicas e genotípicas, sendo tal divisão reforçada por análise de seqüências dos genes 16S rRNA, antígeno 17-kDa, comum ao gênero, citrato sintase e proteínas rickettsiais de superfície de membrana A (*outer membrane protein/rOmpA*) e B (*rOmpB*) (Simser et al., 2002).

O grupo do tifo é composto pela *Rickettsia prowazekii* e *Rickettsia typhi* (Eremeeva e Dasch, 2000).

O número de membros reconhecidos do GFM vem aumentando, seguindo o desenvolvimento de técnicas moleculares e de isolamento em cultura celular e o crescente interesse em doenças transmitidas por artrópodes, podendo-se citar: *R. rickettsii* (agente da *Rocky Mountain spotted fever* e da febre maculosa brasileira), *Rickettsia conorii* (agente da febre maculosa do Mediterrâneo ou febre botonosa), *Rickettsia africae* (agente da Febre da Picada do Carrapato), *Rickettsia sibirica* (agente do tifo do Carrapato do Norte da Ásia ou Tifo Siberiano), *Rickettsia honei* (Tifo da Ilha Flinders), *Rickettsia japonica* (Febre Maculosa Japonesa), *Rickettsia australis* (Tifo do Carrapato de Queensland), *Rickettsia akari* (Rickettsiose Vesicular), *Rickettsia felis*, *Rickettsia slovaca*, *Israeli tick typhus Rickettsia*, *Astrakhan fever Rickettsia*, *Rickettsia mongolotimonae*, *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia heilongjiangii*, *Rickettsia parkeri* (também patogênicas). Existem ainda espécies consideradas não patogênicas ou de patogenicidade desconhecida como: *Rickettsia rhipicephali*, *Rickettsia massiliae*, *Rickettsia Bar 29*, *Rickettsia aeschlimannii*, *Rickettsia montanensis* e *Rickettsia peacockii* (Fournier, 2003; Simser et al., 2002; Ishikura et al., 2003; Máximo e Ferran, 2005; Lemos et al., 2001).

Um terceiro grupo, denominado ancestral, compreendendo as espécies *Rickettsia bellii* e *Rickettsia canadensis*, tem sido proposto a partir da análise da seqüência dos genes 16S rRNA e 23S rRNA, indicando que essas bactérias não pertencem aos outros grupos citados, sugerindo tratar-se de organismos de características ancestrais aos mesmos (Sthortad, 1994; Fournier, 2003).

2.2- FEBRE MACULOSA

2.2.1- Histórico

Rickettsioses do grupo da febre maculosa estão amplamente distribuídas por todo o mundo, em focos endêmicos, ocorrendo como surtos esporádicos, acometendo humanos e outros hospedeiros vertebrados e invertebrados (Parola & Raoult, 2001; Raoult e Raoux, 1997).

O primeiro caso descrito de *Rocky Mountain Spotted Fever* (RMSF) ocorreu em 1873 entre colonos do *Bitterroot Valley* no Lado Oeste do Estado de Montana, EUA, sendo a primeira descrição clínica dessa rickettsiose, publicada em 1899 por Maxey (Maxey, 1899; Galvão et al., 2002).

Wilson e Chowning, em 1904, também tiveram grande contribuição nos passos iniciais de determinação da história natural das rickettsioses do grupo da Febre Maculosa (Walker, 1989), descrevendo sua distribuição geográfica e sazonal, a especificidade de incidência quanto ao sexo e idade, as taxas de mortalidade, os sinais clínicos e sintomas e as lesões patológicas. Esses autores documentaram, ainda, a ausência de um agente etiológico bacteriano convencional e predisseram que a doença tinha um agente etiológico infeccioso e um carrapato como vetor.

No período de 1906 a 1909, Ricketts e colaboradores demonstraram que RMSF era causada por organismos infecciosos que estavam presentes no sangue de pacientes, poderiam ser transmitidos para porquinhos da Índia e macacos, eram similares à bactéria pelo fato de serem retidos por um filtro, conferiam imunidade a animais que sobreviviam à infecção e estimulavam a produção de anticorpos em organismos infectados. O carrapato também foi incriminado por estes autores como vetor dessa doença. Entre 1916 e 1919, Wolbach visualizou o agente etiológico por microscopia de luz, demonstrando ainda sua presença em ovos e em todos os estágios de desenvolvimento do carrapato, bem como em endotélio e musculatura lisa vascular de humanos, entre outros vertebrados (Walker, 1989).

No ano de 1929, em São Paulo, José Toledo Piza iniciou a distinção da febre maculosa das demais doenças exantemáticas no Brasil, inclusive chegando a demonstrar sua semelhança com a entidade nosológica descrita pelos americanos como *Rocky Mountain Spotted Fever* (Piza, 1932; Galvão et al., 2002). O agente etiológico (*R. rickettsii*) e seu carrapato vetor (*A. cajennense*) foram subsequentemente identificados (Schoeler et al., 2005).

Nos anos da segunda guerra mundial, produziram-se alguns avanços importantes no controle das rickettsioses, como o uso de inseticidas no ataque aos

artrópodes vetores e, ainda na década de 40, com o advento dos antibióticos, alcançaram-se resultados surpreendentes no tratamento dessas enfermidades, embora seu uso indiscriminado tenha contribuído para dificultar o diagnóstico por mascarar o aparecimento do exantema máculo papular, principal sinal da doença (Galvão, 1996).

Em 1952, Octávio de Magalhães, estudando a febre maculosa no estado de Minas Gerais, publicou extenso trabalho sobre seu comportamento no período de 1929 a 1944. Este autor levantou a hipótese de transmissão peridomiciliar, em que o cão poderia desempenhar papel importante, trazendo para o domicílio carrapatos contaminados ou mesmo se infectando em áreas de foco e passando a atuar como reservatório domiciliar (Magalhães, 1952). De acordo com Galvão (1996), seria questionável a atuação dos cães como reservatórios de rickettsia.

Após o trabalho de Octávio de Magalhães, nenhum outro foi publicado em Minas Gerais ou mesmo fora do Estado, sobre a febre maculosa de Minas até o ano de 1983, quando Galvão e colaboradores descreveram uma epidemia pela doença no município de Grão Mogol, Vale do Jequitinhonha (Galvão, 1983). A partir de então, surgiram outros relatos como em 1984 no Vale do Mucuri, nos municípios de Ouro Verde de Minas e Bertópolis (Galvão e Ribeiro, 1994; Galvão, 1989); em 1989, em Virgíópolis - Vale do Rio Doce (Souza et al., 1991) e em 1992, na periferia de Caratinga. Além desses, há descrição de casos isolados ou de ocorrência em pequeno número, mas de alta letalidade, em todo o Estado, com exceção do sul de Minas e Triângulo Mineiro (Galvão, 1996).

Em São Paulo, onde foi inicialmente descrita na década de 1920, o primeiro foco reconhecido de febre maculosa brasileira foi numa área reconhecida hoje como os bairros Sumaré e Perdizes, sendo mais tarde descritos novos focos na periferia da região metropolitana da grande São Paulo, como os de Mogi das Cruzes e Santo Amaro, embora estes fossem desaparecendo ou se tornando inativos com a urbanização. Atualmente, há apenas um foco bem conhecido no Estado de São Paulo, na bacia dos rios Atibaia e Jaguari, municípios de Campinas, Pedreira, Jaguariúna e Santo Antônio de Posse, que vem, entretanto, expandindo-se, abrangendo também a bacia do rio Piracicaba. Nos últimos anos, casos de febre maculosa brasileira têm sido descritos na região Sul da Grande São Paulo, em áreas onde já haviam sido notificados casos na década de 1950 (Galvão, 2004).

Em 1996, Lemos et al. realizaram estudo com cães e eqüinos na área endêmica de Pedreira, destacando sua importância como animais sentinelas em

relação à febre maculosa (Lemos et al., 1996a). Nesse mesmo ano, foi relatado o primeiro isolamento de rickettsia em São Paulo, a partir do carrapato *Amblyomma cooperi*, não tendo sido, porém, identificada a espécie (Lemos et al., 1996b).

2.2.2- Dinâmica de Interação *Rickettsia*-vetor

Rickettsias estão associadas a artrópodes, que podem agir como vetores, reservatórios e amplificadores no ciclo de vida da bactéria (Raoult e Roux, 1997; Sekeyová et al., 2000). Seu relacionamento íntimo com esses invertebrados é caracterizado pela eficiente multiplicação, manutenção por longo período de tempo, transmissão transovariana/transtadial e larga distribuição geográfica e ecológica (Azad e Beard, 1998).

Os carrapatos ixodídeos são os principais vetores e reservatórios de *Rickettsias* do GFM, adquiridas durante alimentação em hospedeiros rickettsêmicos (transmissão horizontal) ou através da transmissão vertical (passagem transovariana e transtadial), infectando quase todos os órgãos desses hospedeiros (Raoult e Roux, 1997; Macaluso et al., 2002). Nestes, a *Rickettsia* é mantida mesmo em prolongada ausência de hematofagia pelo hospedeiro, porém em forma avirulenta, tendo sua virulência reativada por fatores nutricionais presentes no sangue, ou quando da exposição à temperatura adequada (Raoult e Roux, 1997; Walker, 1989).

A transmissão transovariana, ou seja, a passagem de organismos rickettsiais de carrapato fêmea adulto infectado para sua progênie e sua sobrevivência transtadial, qual seja, a permanência do agente infeccioso durante a mudança do estágio de desenvolvimento do artrópode, são os principais mecanismos de manutenção de *Rickettsias* de baixa ou nenhuma patogenicidade na natureza. Pode, porém, desempenhar um papel menor na manutenção de *Rickettsias* patogênicas, como evidenciado pelo efeito letal de *R. rickettsii* ao seu vetor (Labruna, 2004a; Macaluso et al., 2002; Burgdorfer e Brinton, 1975; Mulenga et al., 2003). Burgdorfer e Brinton (1975), em estudo de transmissão vertical de *R. rickettsii*, relataram a reduzida sobrevivência e fecundidade de fêmeas infectadas após sucessivas gerações. Niebylski et al. (1999), ao quantificarem o efeito pernicioso de *R. rickettsii* em seu carrapato vetor, encontraram alta taxa de mortalidade em larvas e ninfas infectadas experimentalmente, bem como menor desenvolvimento da progênie de fêmeas infectadas em relação à de não infectadas.

A eficiência da transmissão transovariana dependerá do estágio do carrapato que se infectou com a *Rickettsia*, como demonstrado por Burgdorfer e

Brinton (1975). Segundo eles, quando larvas de *Dermacentor andersoni* se infectavam com *R. rickettsii*, as fêmeas adultas originadas transmitiam o agente para 100% dos ovos e larvas. No entanto, quando o carrapato se infectava somente no estágio de fêmea adulta, esta transmitia a *Rickettsia* transovarianamente para menos de 100% de seus ovos e larvas, chegando a 10% em alguns casos (Labruna, 2004a).

Para sua manutenção na natureza, *R. rickettsii* depende ainda da presença de reservatórios em vertebrados, que atuam na transmissão horizontal (transmissão entre carrapatos alimentando-se em um mesmo animal hospedeiro) desse patógeno, funcionando, dessa forma, como amplificadores horizontais da *Rickettsia* na população de carrapatos (Ricketts, 1909; Burgdorfer, 1988). Segundo Walker (2004), se a transmissão horizontal não ocorresse, os efeitos deletérios dessa bactéria altamente virulenta resultariam em sua extinção e, de acordo com Niebylski et al. (1999), tais efeitos limitam a incidência natural da mesma e oferecem uma plausível explicação para as baixas taxas de infecção em carrapatos adultos (menor do que 1%).

Raoult e Roux (1997) explicam que, para os vertebrados serem eficientes reservatórios de *Rickettsia*, eles precisam ser hospedeiros naturais do seu vetor, ser susceptíveis à *Rickettsia*, devendo desenvolver rickettsemia de duração relativamente longa; chamando a atenção para o preenchimento de tais critérios, sem os quais, os carrapatos não seriam capazes de adquirir a bactéria de seus hospedeiros. No Brasil, alguns pesquisadores têm aventado a hipótese de a capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) ser um potencial reservatório natural de *R. rickettsii*, uma vez que foi demonstrada, por infecção experimental, sua capacidade de manter o agente circulante em níveis suficientes para infectar carrapatos *A. cajennense* durante a hematofagia, sem apresentação de sinais clínicos da doença (Travassos e Vallejo, 1942a). Ressalta-se, porém, a necessidade de mais estudos para confirmar essa consideração.

Existe ainda, potencialmente, um outro meio pelo qual a *Rickettsia* pode ser transmitida entre os artrópodes vetores, aumentando sua taxa de infecção: a transmissão entre carrapatos coalimentando-se em um mesmo hospedeiro (Niebylski et al., 1999). Como descrito por Raoult e Roux (1997), alguns feromônios são responsáveis pela agregação de carrapatos no hospedeiro, aumentando a chance para encontro e copulação. Sob tais circunstâncias, enquanto os carrapatos estariam se alimentando, haveria uma proximidade muito grande entre seus aparelhos bucais, o que permitiria o espalhamento direto de *Rickettsia* para carrapatos não infectados sem causar infecção no animal hospedeiro.

Transmissão sexual de *Rickettsia* entre carrapatos também tem sido relatada. Wolbach (1916), sugeriu a presença de *Rickettsia* pertencente ao grupo da febre maculosa em espermatozoides do carrapato vetor *D. andersoni* e, em 1933, Philip e Parker (citados por Hayes et al., 1980) demonstraram a ocorrência de transmissão sexual de *R. rickettsii* por machos infectados para fêmeas não infectadas. Como comentam esses autores, tais observações levaram a especulações de que este tipo de transmissão representaria um importante fator ecológico na manutenção na natureza de *Rickettsia* do GFM; também observaram, através de microscopia eletrônica, infecção massiva rickettsial nos tecidos testiculares de carrapatos.

Fator intrigante a ser ainda considerado na dinâmica de interação *Rickettsia*-vetor é o fenômeno de interferência da transmissão transovariana, no qual carrapatos infectados por uma espécie de *Rickettsia* são incapazes de transmitir uma segunda espécie para sua progênie, como demonstrado sob condições laboratoriais (Macaluso et al., 2003a). Este fenômeno é reforçado pelo fato de nenhum carrapato ter sido encontrado, na natureza, infectado por mais de uma espécie de *Rickettsia* (Labruna, 2004a). Isto parece favorecer a prevalência de espécies não patogênicas em relação às patogênicas e tem sua descrição original nos relatos de Burgdorfer et al. (citados por Macaluso et al., 2003b). Burgdorfer et al. (1981) observaram que o “agente do lado leste” (recentemente denominado *R. peacockii*) presente em altos números nos carrapatos do lado leste do *Bitterroot Valley*, Montana, tinham a habilidade de bloquear infecção por *R. rickettsii* dos tecidos ovarianos, prevenindo a transmissão transovariana dessa rickettsia patogênica. O(s) mecanismo(s) que permite(m) tal interferência entre *Rickettsia* do GFM permanece(m) desconhecido(s). Macaluso et al. (2003a) e Mulenga et al. (2003) propuseram a hipótese de que, em resposta a uma infecção primária, moléculas diferencialmente reguladas preveniriam uma infecção secundária. Em seus estudos, os autores detectaram transcritos diferencialmente expressos após a infecção, sendo esses classificados por Mulenga em quatro grupos de moléculas: fatores de resposta imune do carrapato, receptores ou moléculas de adesão celular, fatores de resposta ao stress e agentes detoxificantes.

2.2.3- Ecologia

Das 3500 espécies de acarinos existentes, 840 são carrapatos que compõem a subordem Ixodida, que inclui as famílias Argasidae e Ixodidae (Oliveira, 2004).

A família Ixodidae possui cerca de 650 espécies descritas, constituindo um dos mais importantes grupos de ectoparasitos. Aragão e Fonseca (1961) publicaram uma lista de 57 espécies de ixodídeos existentes no Brasil, distribuídos em 10 gêneros, como parasitos de animais domésticos e silvestres. Guimarães et al. (2001) relataram a presença de 54 espécies válidas no território brasileiro, 32 das quais pertencentes ao gênero *Amblyomma*.

Cinco espécies de *Rickettsia* foram identificadas e associadas a carrapatos dos gêneros *Amblyomma*, *Ixodes* e *Haemaphysalis* no Brasil (Labruna, 2004a).

Carrapatos do gênero *Amblyomma* - *A. cajennense*, *Amblyomma aureolatum* e *A. cooperi* -, têm sido responsabilizados pela manutenção enzoótica e veiculação da *R. rickettsii*, agente etiológico da Febre Maculosa Brasileira no homem (Fonseca, 1935; Dias & Martins, 1939; Lima et al., 1995; Lemos et al., 1996a,b). *A. cajennense* se destaca como a principal espécie (Aragão & Fonseca, 1961; Figueiredo et al., 1999). Trata-se de um carrapato heteroxênico, necessitando de três hospedeiros para a realização de suas diferentes fases parasitárias (larva, ninfa e adulto) (Oliveira, 2004), possuindo baixa especificidade, principalmente nos estágios imaturos, o que o torna um importante transmissor de patógenos na natureza, já que facilita o intercâmbio destes entre seus hospedeiros. Apresentando como hospedeiros primários, os eqüinos, as antas e capivaras, o parasitismo em humanos é associado a altas infestações desse carrapato nos hospedeiros primários (Labruna et al., 2001).

Amblyomma aureolatum, cujos hospedeiros primários são os carnívoros silvestres para o estágio adulto e roedores e aves silvestres para larvas e ninfas, foi incriminado como vetor da FMB em São Paulo, onde em um foco endêmico na cidade de Mogi das Cruzes, foi a única espécie encontrada em grande número nos animais domésticos e humanos (Fontes et al., 2000). Em investigação realizada nesta área, através de técnicas moleculares, Pinter (2003) confirmou a presença de *R. rickettsii* nesse carrapato.

Todos os estágios parasíticos de *A. cooperi* alimentam-se primariamente em capivaras, não existindo indicação de que seja agressivo para humanos (Labruna et al., 2004). Sua possível participação no ciclo enzoótico da *rickettsia* na natureza baseia-se no fato de seus hospedeiros primários serem considerados potenciais reservatórios de *R. rickettsii* (Travassos e Vallejo, 1942 a e b). Grandes populações deste artrópode têm sido encontradas em áreas endêmicas para a FMB (Souza et al., 2001; Labruna et al., 2004), mostrando a necessidade da realização de estudos para esclarecimento dos papéis do carrapato e de seu hospedeiro primário na circulação de *rickettsias* do grupo da febre maculosa.

Também possivelmente associada a casos de rickettsioses do grupo da febre maculosa em humanos no Brasil, cita-se *R. parkeri*, encontrada infectando os carrapatos *A. triste* e *A. cooperi* (Labruna, 2004a).

Rickettsias apatogênicas ou de patogenicidade desconhecida, pertencentes ao grupo das febres maculosas, tais como *R. rhipicephali* em *Haemaphysalis juxtakochi* e *R. amblyommii* em *Amblyomma coelebs* e *Amblyomma longirostre* têm sido identificadas através de técnicas moleculares. *R. amblyommii* foi detectada ainda, por isolamento em cultura de célula, em *A. cajennense* (Labruna, 2004a). Outra espécie não patogênica, *R. bellii*, tem sido identificada, seja através de técnicas moleculares ou isolamento em cultura de célula, em várias espécies de carrapatos vetores, citando-se: *A. cooperi*, *A. ovale*, *Amblyomma oblongoguttatum*, *Amblyomma humerale*, *Amblyomma scalpturatum*, *Amblyomma rotundatum*, *A. aureolatum* e *Ixodes loricatus* (Labruna, 2004a; Pinter, 2003). Não foram detectadas, até o momento, em hospedeiros vertebrados e apresentam possibilidade de ampla distribuição no Brasil (Nascimento e Schumacker, 2004). Acredita-se que a instalação destas bactérias em populações de carrapatos desempenhe um importante papel, como já descrito que a presença de *Rickettsia* aparentemente não patogênica, cujo vetor e distribuição geográfica sobrepõem-se aos de espécies patogênicas, possa interferir na transmissão de rickettsias virulentas para humanos e, conseqüentemente, diminuir a prevalência das enfermidades por elas provocadas (Macaluso et al., 2003a, Walker, 1989).

Organismos rickettsiais do GFM, cuja identificação não foi realizada, foram ainda observados na hemolinfa de *Anocentor nitens*, *Boophilus microplus* e *R. sanguineus*, coletados em áreas endêmicas para FMB (Lemos, 2002, citado por Nascimento e Schumacker, 2004).

R. felis, pertencente ao GFM (Higgins1994, Higgins et al., 1996; Raoult et al., 2001), é transmitida por *Ctenocephalides felis*, pulga dos cães e gatos e tem sido detectada em áreas endêmicas para FMB, causando rickettsiose felis (Nascimento e Schumaker, 2004).

A FMB tem como hospedeiros vertebrados, vários grupos de mamíferos, como cães, cavalos, gatos, capivaras, marsupiais, roedores silvestres e morcegos, dentre outros (Dias, 1938; Dias e Martins, 1939; Vianna 2002; Lemos, 2002). Equinos e cães são considerados animais sentinelas, já que freqüentemente são encontradas sorologias positivas a partir destes em áreas endêmicas (Lemos et al., 1996a; Cardoso, 2004). Os roedores poderiam atuar no ciclo silvestre de *Rickettsia*, como é o caso da capivara, para a qual se tem sugerido um papel potencial como

elo entre os ciclos enzoóticos e zoonóticos de *R. rickettsii* (Nascimento e Schumaker, 2004).

Capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) são os maiores roedores do mundo e podem viver em regiões alagadas de áreas florestais e ao longo das bordas dos rios em contato com fazendas, que são freqüentemente invadidas por esses animais para se alimentarem de plantações de grãos. De acordo com Figueiredo et al. (1999), a capivara pode ser reservatório de zoonoses em áreas quase completamente deflorestadas, como no caso do Estado de São Paulo. Vivendo perto de fazendas ou mesmo cidades, poderiam favorecer a transferência de seus ectoparasitos, juntamente com os patógenos por eles veiculados, para animais domésticos, dispersando estes agentes zoonóticos e oferecendo risco para o homem.

Humanos não são bons reservatórios para *Rickettsia*, pois a rickettsemia é, geralmente, somente de curta duração, especialmente com intervenção antibiótica (Raoult e Roux, 1997). A *Rickettsia* não é bem adaptada ao crescimento no endotélio humano, sendo este considerado mesmo um hospedeiro acidental deste patógeno intracelular obrigatório (Walker, 1989).

Pouco ainda se conhece sobre a ecologia das Rickettsias e seus vetores no Brasil. De acordo com Mafrá, em comunicação pessoal, o baixo número de espécies rickettsiais detectadas na América do Sul é resultado dos poucos estudos conduzidos com o objetivo de detecção das mesmas. Assim, ressalta-se a necessidade de mais investimento em estudos, de campo e laboratoriais, visando a um melhor entendimento sobre as rickettsioses, o que facilitaria a tomada de decisão na escolha das medidas de prevenção.

2.2.4- Patogenia e Características Clínicas da infecção por *Rickettsia rickettsii*

A patogenia das rickettsioses do GFM consiste em uma vasculite de pequenos vasos por infecção direta das células endoteliais, causando edema, hemorragia, trombose, necrose e um infiltrado celular perivascular (Walker, 1989).

De acordo com Walker (1989), o primeiro passo na patogênese da doença rickettsial do GFM, após a injeção da *Rickettsia* na pele humana pela picada do carrapato, é o ataque dessa bactéria intracelular obrigatória às células alvo (Li e Walker, 1992). A *Rickettsia*, primeiramente, infecta células endoteliais dos hospedeiros, nas quais penetra via endocitose induzida, escapando do endossomo no citoplasma das mesmas por um mecanismo possivelmente envolvendo atividade

de fosfolipase A2 e aí proliferando através de divisão binária (Valbuena et al., 2002).

Da pele, sua porta de entrada, as rickettsias espalham-se via corrente sangüínea e linfática para todas as partes do corpo, incluindo cérebro, pulmão, rins, coração, fígado, baço, pâncreas e trato gastrointestinal (Walker, 1989). Em cada órgão ou tecido, após a proliferação dentro das células endoteliais, as rickettsias são liberadas e espalhadas célula a célula devido a sua capacidade para movimento intracelular através da polimerização direcional da actina, infectando células endoteliais adjacentes ou invadindo mais profundamente a parede dos vasos sanguíneos por infectar células musculares lisas (Valbuena et al., 2002; Walker, 1989).

Atividade enzimática, particularmente de fosfolipase A e proteases, tem sido proposta como mecanismo patogênico rickettsial, bem como o papel da peroxidação lipídica de membrana, devido à presença de radicais livres e injúrias provocadas pelo ferro intracelular, as quais são associadas à infecção rickettsial (Silverman, 1984; Walker, 1989).

As características clínicas das doenças rickettsiais correspondem aos danos das principais células-alvo: células endoteliais, particularmente nos pulmões e cérebro (Valbuena et al., 2002). A doença apresenta um período de incubação de 2 a 14 dias e se inicia bruscamente com febre contínua, mialgias, artralgias, prostração, mal estar e cefaléia (Melles et al., 1992). Em casos graves, a rickettsia causa edema pulmonar não cardiogênico e síndrome do “stress” respiratório do adulto, pneumonia intersticial, falha aguda renal, manchas hemorrágicas, edema periférico e hipotensão hipovolêmica devido a extravasamento de fluido no espaço extravascular. O sistema nervoso central é um órgão alvo crucial afetado e, se não tratado, o paciente pode evoluir para um estágio torporoso, de confusão mental, com freqüentes alterações psicomotoras (hemiplegia ou paralisia completa), chegando ao coma profundo (Valbuena et al., 2002; Raoult e Roux, 1997).

Em geral, entre o segundo e o sexto dias da doença, surge o exantema maculo papular, predominando nos membros, acometendo palmas das mãos e plantas dos pés, em 50 a 80% dos pacientes. Com a evolução, o exantema vai se transformando em petequial, posteriormente hemorrágico, constituído principalmente por equimoses, que, no paciente não tratado, tendem à confluência, podendo evoluir para necrose.

As seqüelas em pacientes gravemente doentes incluem amputação, surdez, visão debilitada, déficit intelectual, paraplegia, distúrbio comportamental e outros defeitos neurológicos (Valbuena et al., 2002).

A letalidade varia de 5 a 80% dos casos e é determinada, em parte, pela idade do paciente, virulência da cepa existente no local e tratamento adequado (Price, 1954), podendo diminuir de forma significativa quando realizado em tempo hábil. As rickettsias respondem muito bem aos antibióticos (oxitetraciclina e cloranfenicol), que, associados a um diagnóstico e tratamento precoces, torna bastante reduzida a ocorrência de casos fatais (CDC, 2005).

2.2.5- Aspectos Epidemiológicos

A distribuição geográfica de *Rickettsia spp.* é determinada pela incidência de seu hospedeiro artrópode, e a incidência sazonal da doença mantém um paralelo com a atividade do carrapato (Raoult e Roux, 1997).

O *A. cajennense*, mais importante vetor de *R. rickettsii* no Brasil, apresenta uma ampla distribuição no país, sendo a principal espécie de carrapato parasitando humanos no centro-sul brasileiro e freqüentemente associado a casos de febre maculosa em áreas endêmicas desta região (Phillip et al., 1978; Ereemeeva et al., 1999; Lemos, 2002; Horta, 2002; Nascimento, 2003).

Estudos realizados na região sudeste demonstram que esse carrapato possui um ciclo anual, ou seja, completa somente uma geração por ano, com picos populacionais bem definidos ao longo do ano para cada estágio de desenvolvimento (Serra-Freire, 1982; Souza, 1990; Labruna et al., 2002, Oliveira, 2004). Suas larvas predominam nos meses de abril a agosto; as ninfas, de junho a outubro; e os adultos nos meses quentes e chuvosos, de setembro a março (Oliveira, 2004).

Geralmente, o maior número de casos de FMB se dá no segundo semestre do ano, com pico no mês de outubro, o que mostra a possibilidade de relação da incidência da doença com o ciclo evolutivo desses vetores, já que as formas infectantes (ninfas e adultos) ocorrem, predominantemente e coincidentemente, no mesmo período (Galvão, 1996).

De acordo com Raoult e Roux (1997), o risco de o carrapato transmitir a *Rickettsia* e, conseqüentemente, a prevalência da doença específica, é dependente de alguns parâmetros, tais como: taxa do vetor infectado, sua afinidade pelo homem e sua abundância na natureza, a qual depende de fatores climáticos e ecológicos, entre outros. Entretanto, Lemos et al. (1997) afirmaram que, embora a presença dos carrapatos infectados seja necessária não é suficiente para produzir casos humanos, como foi mostrado por Magnarelli et al. (1981). Estes autores observaram que o número de carrapatos infectados, detectados por

imunofluorescência direta, provenientes de área endêmica, não variou em relação ao número daqueles coletados em locais onde a febre maculosa nunca havia sido relatada. Além disso, segundo Walker (2004), em geral, a prevalência de *R. rickettsii* em carrapatos é muito baixa, menor que 0,1%, sendo desconhecidas as razões para ocorrência de epidemias provocadas por esse patógeno.

Em algumas regiões, a FMB ocorre esporadicamente, quando o homem, trabalhando ou em atividades de lazer (pescaria, acampamentos etc), adentra em matas onde ocorre o ciclo silvestre, foco natural da doença (Galvão, 1988). Também existe a possibilidade de transmissão peridomiciliar, em que o cão poderia desempenhar um importante papel ao trazer para o domicílio e peridomicílio, carrapatos infectados (Magalhães, 1952).

Essa enfermidade vem se consolidando como uma antroponose de difícil controle e associada à significativa morbidade e elevada letalidade (Angerami, 2004), tendo sua ocorrência reconhecida nos Estados de Minas Gerais (Dias & Martins, 1937; Galvão et al., 1999; Magalhães, 1952), São Paulo (Melles et al., 1992), Rio Janeiro (Gonçalves et al., 1981), Bahia e Espírito Santo (Mancini, 1983; Galvão et al., 2002).

Em Minas Gerais, a FMB passou novamente a ser descrita a partir da década de 80 sob a forma epidêmica e em “clusters” (ocorrência de vários casos em uma mesma residência), tendo sido também relatada sob a forma de casos isolados (Silva e Galvão, 2004). O final da década de 80 e início dos anos 90 caracterizaram-se pelo aparecimento de casos em áreas periurbanas do Vale do Rio Doce (Galvão, 1996). Destaca-se, aqui, um aumento na taxa de letalidade, que era de 10% no período de 1981 a 1994, para 18% no período de 1995 a 2003 (Silva e Galvão, 2004).

Em São Paulo, no período de 1985 a 2004, foram confirmados laboratorialmente 114 casos de FMB com uma taxa de letalidade média de 46,5% (Angerami, 2004), tornando-se de notificação compulsória desde 1996 na região de Campinas, atualmente o principal foco da doença no Estado (Silva e Galvão, 2004).

No Estado de Santa Catarina, onde até 2003 a FMB não havia sido diagnosticada, a infecção por *Rickettsia* sp., pertencente ao grupo da febre maculosa, foi notificada e confirmada, encontrando-se 10 casos no período de março de 2003 a maio de 2004 (Madeira e Wiesbrich, 2004).

Segundo Galvão (1988), é possível que os casos de FMB estejam sendo sub-notificados devido às dificuldades de seu diagnóstico clínico, podendo ser facilmente confundida com outras doenças, tais como: meningococemia

estafilocócica, leptospirose, infecção por enterovírus, febre tifóide e outros quadros purpúricos.

2.2.6- Diagnóstico Laboratorial

No Brasil, o diagnóstico das rickettsioses tem sido realizado por alguns laboratórios de saúde pública (Instituto Adolfo Lutz-IAL/SP, Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ/RJ e Fundação Ezequiel Dias/MG) que empregam usualmente testes sorológicos, destacando-se a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), padrão de referência utilizado pelo *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) (Nascimento e Schumaker, 2004). A confirmação sorológica de infecção ativa por esta técnica requer um aumento de quatro vezes nos títulos de anticorpos da primeira para a segunda coleta de amostra sanguínea (Galvão, em comunicação pessoal). Segundo Melles et al. (1999), a reação apresenta uma sensibilidade de 94 a 100% e especificidade de 100%, podendo ser utilizada para detectar imunoglobulinas G (IgG) e M (IgM).

Ressalta-se, porém, que estes testes não podem distinguir a espécie de *Rickettsia* envolvida devido à ocorrência de reações cruzadas entre os membros dos diferentes grupos (Phillip, 1978; McDade e Newhouse, 1986) e mesmo entre os grupos (Calic, 2004).

Métodos baseados no padrão eletroforético e na identificação imunológica de epitopos específicos de rickettsias (*Western Blotting*) (Anacker et al., 1984) apresentam algumas limitações técnicas. Para o propósito de diferenciação entre espécies do GFM, o método exige que a amostra analisada sofra uma purificação rigorosa, eliminando restos celulares do meio de cultura, sem que ocorram modificações estruturais importantes nas proteínas e epitopos da bactéria (Regnery et al., 1991). No entanto, o *western blotting* tem-se mostrado uma boa ferramenta para confirmação sorológica de diagnósticos obtidos através de testes convencionais. É especialmente útil na diferenciação de falsos positivos gerados por reações cruzadas entre espécies do mesmo grupo ou de grupos diferentes (La Scola e Raoult, 1997).

Outros testes sorológicos também podem ser empregados como: fixação de complemento, microaglutinação, hemaglutinação indireta, aglutinação em látex e ELISA.

Entretanto, os testes sorológicos não são capazes de detectar precocemente a doença, já que, os títulos de anticorpos não aumentam antes de duas ou três semanas, contribuindo pouco para o diagnóstico durante sua fase

aguda, tornando-se, assim, dispensável a confirmação sorológica à instituição do tratamento.

A identificação imuno-histoquímica nas biópsias cutâneas das lesões máculo papulares oferece uma alternativa viável para diagnosticar essa fase (Dumler et al., 1990). Outra metodologia que pode ser utilizada na detecção de casos agudos é o isolamento do agente em cultura de células (Melles et al., 1992), porém são raros os laboratórios de saúde pública ou de pesquisa no Brasil que possuem estas facilidades.

Para se diagnosticar a presença de *Rickettsia* do GFM em carrapatos, os testes geralmente utilizados são a avaliação da hemolinfa, imunofluorescência direta, ELISA e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

O teste da hemolinfa é uma técnica econômica e rápida para detecção de *Rickettsia* em carrapatos vivos, sem danificá-los ou destruí-los, permitindo sua utilização posterior em todas as outras disponíveis. Vem sendo utilizado como triagem (Zhang et al., 1995), porém não é capaz de diferenciar espécies patogênicas e apatogênicas ou mesmo outras bactérias (Burgdorfer 1970; Gimenez, 1964). A pequena concentração de *Rickettsia* no carrapato pode ser contornada pela incubação prévia destes a 37°C, por 24 a 48 horas, o que estimula a replicação dos patógenos. Entretanto, o número de hemócitos entre diferentes espécimes é bastante variável, e nem todas as células estarão infectadas. Assim, as chances de um erro do diagnóstico existem, sendo maiores quando pequenas quantidades de hemolinfa estão disponíveis (Burgdorfer, 1970).

A visualização da morfologia dos microorganismos nos hemócitos do carrapato auxilia em uma classificação preliminar, mas se a determinação das espécies for necessária, esta deverá ser realizada através de imunofluorescência direta, de métodos de isolamento ou da PCR, sendo a última considerada de maior sensibilidade e especificidade, possibilitando a determinação de gênero e espécies (Radulovic et al., 1994).

2.2.7- Investigação Molecular

A implementação de técnicas da biologia molecular vem possibilitando a detecção de novas espécies de *Rickettsia* em todo o mundo e produzindo esclarecimentos importantes com relação a outras já descritas.

Com o desenvolvimento de seqüenciadores automáticos de nucleotídeos, a análise de seqüências de base de produtos de PCR tornou-se uma rápida, conveniente e sensível abordagem para identificação de *Rickettsia* (La Scola e

Raoult, 1997) e alguns genes têm sido propostos para uso em trabalhos com esse objetivo: aqueles codificando o rRNA 16S, a proteína de 17kDa, citrato sintase, rOmpA, e rOmpB (Roux e Raoult, 1995).

A análise da sequência dos nucleotídeos do gene para rRNA 16S é útil para identificação a nível de gênero, mas, desde que várias espécies partilhem sequências similares deste gene, o estudo do mesmo não fornece acurada identificação a nível de espécie (La Scola e Raoult, 1997).

Raoux et al. (1996) inferiram relacionamentos filogenéticos de espécies de *Rickettsia* pela comparação de sequências de evolução mais rápida do gene que codifica para a enzima respiratória citrato sintase, mostrando que esta ferramenta é mais sensível que comparações feitas a partir de rRNA 16S. Entretanto, é conhecido que a sequência de DNA que codifica para essa enzima de grande importância fisiológica sofre uma elevada pressão seletiva para se manter inalterada (Inokuma et al., 2001), traduzindo para uma proteína altamente conservada. Assim, relacionamentos filogenéticos confiáveis a partir da mesma, só poderiam ser obtidos entre rickettsias que divergissem precocemente do ancestral comum do GFM (*spotted fever group*) (Fournier et al., 1998), já que, como explicado por Raoux et al. (1996), o gene não é divergente o suficiente para permitir distinção entre todas as espécies de *Rickettsia*. Em acordo, Roux e Raoult (2000) relatam que sequências obtidas deste gene só diferiram significativamente entre organismos distantemente relacionados. O gene tem sido utilizado em combinação com outros (rOmpA, rOmpB e 17 kDa) para melhor caracterização de agentes rickettsiais (Roux et al., 1995; Fournier, 1998; Ishikura, 2003), podendo identificar também outros gêneros, além de *Rickettsia* (Ishikura, 2003).

Azad et al. (1990) propuseram iniciadores que identificam uma sequência do gene 17KDa, que codifica para um antígeno de superfície de membrana de gênero específico, podendo ser utilizados em conjunto com iniciadores internos (*nested primers*) da mesma sequência, aumentando a sensibilidade da técnica (Schrieffer et al., 1994).

Para a detecção de rickettsias do GFM, foram propostos iniciadores que localizam as sequências genômicas responsáveis por codificar as proteínas de membrana rOmpA e rOmpB, que estão mais sujeitas a mutações persistentes do genoma por serem antígenos imunoexpostos, representando uma ferramenta para classificação e filogenia das diferentes espécies (Regnery et al., 1991; Ereemeeva et al., 1994).

Baseando-se em análise de PCR-RFLP do gene que codifica a proteína OmpA (proteína externa de membrana), foi realizada por Regnery et al. (1991) a

diferenciação de nove espécies de *Rickettsias* do GFM estudadas. Posteriormente, Ereemeeva et al. (1994) conseguiram a diferenciação de 36 cepas deste grupo, por uma combinação dessa abordagem com um método baseado em análise de PCR-RFLP do gene para a proteína rOmpB.

No Brasil, a investigação molecular de *Rickettsia* tem sido realizada através da amplificação por PCR e seqüenciamento de fragmentos de DNA dos genes para as proteínas 17kDa, citrato sintase e rOmpA, bem como por análise de PCR/ RFLP, permitindo avanços significativos no conhecimento das rickettsioses neste país, incluindo a caracterização molecular de algumas espécies (Nascimento 2003; Pinter 2003; Horta,2002). O diagnóstico por esta metodologia já se encontra implementado em alguns núcleos de pesquisa, auxiliando na resolução dos casos não solucionados por métodos laboratoriais convencionais (Nascimento e Schumacker, 2004).

2.3- RICKETTSIOSE FELIS

Rickettsiose felis é causada pela *R. felis*, um organismo recentemente validado como espécie e reconhecido como patogênico (Raoult et al., 2001).

R. felis foi provavelmente primeiro detectada como *Rickettsia ctenocephali*, na Europa, na pulga do gato (*Ctenocephalides felis*), em 1918, e então redescoberta nos Estados Unidos em 1990 (Parola et al., 2003), onde foi observada em células epiteliais do intestino desse artrópode e descrita como agente ELB pelo Laboratório EL (Soquel, Califórnia, EUA) (Raoult et al., 2001). Em 1996, essa bactéria foi proposta como uma espécie distinta e foi caracterizada como uma *Rickettsia* tifo-like, já que anticorpos monoclonais específicos para *R. typhi*, patógeno causador do tifo murino, reagiram com esse organismo, e sua estrutura e distribuição nos tecidos da pulga assemelhavam-se àquelas de *R. typhi* (Adams et al., 1990). Entretanto, dados moleculares, que foram obtidos pelo seqüenciamento e análise filogenética dos genes que codificam para as proteínas 17kDa, citrato sintase, 155kDa, 120kDa, e dos genes metK, ftsY, polA, e dnaE, classificaram *R. felis* no GFM (Azad et al., 1992; Bouyer et al., 2001). Em estudo recente, Fang e Raoult (2003) confirmaram a hipótese de que esse agente seja fenotipicamente e proximamente relacionado às rickettsias desse grupo através de SDS-PAGE e *immunoblotting* com anti-soro policlonal murino. Ainda, sorotipagem por ensaio de microimunofluorescência, também utilizada neste trabalho, demonstrou a intensa relação antigênica de *R. felis* com as rickettsias do grupo da febre maculosa, assim

como, as reações cruzadas entre essas *Rickettsias* em testes com anti-soro para espécies GFM.

Ctenocephalides felis é aparentemente o principal vetor desta nova doença rickettsial e *R. felis* tem sido encontrada nesta pulga em vários países, incluindo Estados Unidos, Brasil, Espanha, França, Alemanha, Inglaterra, México, Nova Zelândia, Argélia e Etiópia (Azad et al., 1992; Kelly et al., 2004; Zavala-Velazquez et al., 2000; Rolain et al., 2003). Neste hospedeiro, o patógeno é mantido por transmissão transovariana sem lhe causar efeito letal, representando um fator de grande importância para a epidemiologia dessa rickettsiose emergente (Rolain et al., 2003).

Adultos de *C. felis* são parasitas semi-obrigatórios em seus hospedeiros preferenciais, gato e cão (Shaw et al., 2004). Porém, como a *C. felis* apresenta baixa especificidade parasitária, também é encontrada em outros animais como gambás, ratos, camundongos e espécies selvagens periurbanas, para as quais *R. felis* poderia ser transmitida horizontalmente, podendo estes vertebrados, juntamente com seus ectoparasitos, desempenhar papel importante na manutenção do ciclo de *R. felis* e sua transmissão para humanos. Boostrom et al. (2002) documentam o envolvimento da tríade gambá / *Rickettsia* / pulga do gato no ciclo de transmissão rickettsial associada à pulga em áreas urbanas e suburbanas do sul do Texas e sul da Califórnia, nos Estados Unidos; e comentam que relacionamentos similares hospedeiro / parasita podem operar em outras partes do mundo, onde casos humanos recentes de rickettsiose felis têm sido relatados.

Desde que *C. felis* tem uma distribuição mundial e infestações com esta pulga são muito comuns, assume-se que *R. felis* e a enfermidade por ela provocada devam também ocorrer mundialmente (Fang e Raoult, 2003). O papel patogênico e a importância dessa rickettsia têm sido demonstrados em estudos com pacientes do Texas, México, Brasil, França e Alemanha por PCR ou testes sorológicos (Fang e Raoult, 2003). Em humanos, *R. felis* pode produzir uma síndrome clínica similar ao tifo murino, sendo, assim, considerada como um componente do ciclo de transmissão dessa doença (Márquez et al., 2002; Boostrom et al., 2002). Segundo Márquez et al (2002), *R. felis* poderia estar implicada em casos compatíveis com tifo murino detectado no sul da Espanha, onde a pulga do rato (*Xenopsylla cheopis*), principal vetor de *R. typhi*, é ausente. Adicionalmente, *R. typhi* e *R. felis* foram encontradas em pulgas e tecidos de gambás de áreas endêmicas de tifo murino no Texas e na Califórnia e, uma investigação com cinco pacientes com diagnóstico para esta patologia no Texas demonstrou que pelo menos um estava infectado com *R. felis* (Boostrom et al., 2002). Na América Latina, casos humanos

de rickettsioses causados por *R. felis* têm sido relatados no México e no Brasil (Galvão et al., 2004), apresentando-se clinicamente como: febre, dor de cabeça e mialgia, sugerindo resposta sistêmica de fase aguda; exantema, refletindo uma vasculite; e dor abdominal, náuseas, vômitos e diarreia, indicando envolvimento visceral e sintomas neurológicos, mostrando tratar-se de uma doença rickettsial potencialmente severa.

Considerando que, por ser uma enfermidade emergencial, pouco ainda se conhece sobre essa nova rickettsiose, ressalta-se a necessidade de mais estudos para o estabelecimento da real frequência dos sintomas presentes em rickettsiose felis, da verdadeira taxa de letalidade associada à mesma, bem como da epidemiologia e do papel de *R. felis* como um importante patógeno (Galvão et al., 2004).

2.4- EHRLICHIOSE

Ehrlichiose é uma doença infecciosa e sistêmica transmitida por carrapatos a humanos, bem como a animais, por bactérias da família Anaplasmataceae, predominantemente do gênero *Ehrlichia* e *Anaplasma* (Inayoshi et al., 2004; Park et al., 2003 a,b), patógenos intracelulares obrigatórios que parasitam leucócitos, induzindo um quadro febril não específico caracterizado por leucopenia, trombocitopenia e injúria hepática (Park et al., 2003 b).

Inicialmente classificados de acordo com a célula parasitada - granulócito, linfócito, monócito e plaqueta -, os organismos do gênero *Ehrlichia* são atualmente agrupados, baseando-se em suas características moleculares, em três grupos: *Ehrlichia risticii* e *Ehrlichia sennetsu* formam o primeiro grupo; *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis* e *Ehrlichia ewingii* compõem o segundo; *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila* e o HGE agent - agente da ehrlichiose granulocítica humana, *Anaplasma phagocytophilum* - incluem-se em um terceiro agrupamento (Carter et al., 2001). Este último, porém, vem sendo considerado como similar ou idêntico a *E. equi* e *E. phagocytophila*, carecendo de mais estudos para a sua classificação (Dumler e Bakken, 1995; Dumler et al., 1995).

Das espécies listadas, existem relatos humanos de ehrlichioses veiculadas por carrapatos para *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, HGE agent e uma *Ehrlichia canis-like* (*Ehrlichia* humana venezuelana - VHE), sugerida como uma nova cepa ou uma subespécie de *E. canis* que pode causar infecção assintomática e persistente (Buller et al., 1999; Dumler et al., 1995; Dumler e Bakken, 1995; McDade, 1990; Perez et al., 1996).

A ehrlichiose monocítica humana (HME) foi primeiramente descrita em 1987 nos Estados Unidos e, quatro anos mais tarde, o agente etiológico *Ehrlichia chaffeensis* foi isolado de um paciente e classificado no gênero *Ehrlichia* baseado na análise da sequência do gene para a subunidade 16S do rRNA (Olano, 2003).

Em 1994, uma segunda ehrlichiose humana foi descrita e nomeada ehrlichiose granulocítica humana (HGE), devido ao tropismo celular do agente infeccioso *A. phagocytophilum*. Em 1999, *E. ewingii* foi detectada causando uma ehrlichiose também granulocitotrópica, apresentando um curso aparentemente mais ameno que HME e afetando mais comumente pacientes imunodeprimidos (Olano, 2003).

O ciclo de vida de *Ehrlichia* envolve um carrapato vetor (Ixodídeos) e um hospedeiro vertebrado, que adquire a bactéria pela picada de vetores infectados, podendo transmiti-la para outros carrapatos não infectados que dele se alimentarem (Zhang et al., 2003). Como a *Ehrlichia* não é transmitida pela modalidade transovariana de uma geração de carrapatos para a próxima, a presença do hospedeiro vertebrado é essencial para sua manutenção em a natureza (Allen et al., 2003; Zhang et al., 2003), destacando-se, como potenciais reservatórios, o veado da cauda branca e o cão, nos quais têm sido detectadas espécies desse patógeno, por sorologia ou através de PCR e *Southern hybridization* (Zhang, Jian-Zhi, 2004; Zhang et al., 2003, Dagnone et al., 2003).

A ehrlichiose é transmitida para humanos pelas secreções salivares de carrapatos infectados, eliminadas no sítio da picada, através do qual o patógeno penetra a pele para invadir células-alvo (sistema imune), replicando-se no interior de seus fagossomos e espalhando-se para outras partes do corpo por meio da corrente sanguínea, dentro de leucócitos e plaquetas. Assim, além da ação patogênica da bactéria no próprio sistema imune, há também o acometimento do sistema nervoso central, pulmões, rins, aparelho digestivo, fígado, entre outros, levando a uma expressão clínica bastante diversa. Entre as manifestações clínicas notificadas, destacam-se febre, cefaléia, mialgia, mal-estar geral, exantemas, náuseas, dor abdominal, vômito e diarreia, sendo comum os pacientes apresentarem leucopenia, trombocitopenia, anemia e nível aumentado de transaminases hepáticas (Tami et al., 2004).

Os métodos de diagnóstico de infecções ehrlichiais incluem isolamento do agente em cultura de células, sorologia e técnicas moleculares. O isolamento é o melhor método para diagnóstico, porém é demorado e difícil. A sorologia é o método mais freqüentemente utilizado para diagnóstico, mas reações cruzadas ocorrem levando a falsos diagnósticos (Parola e Raoult, 2001). PCR e

seqüenciamento têm sido também utilizados para a detecção de agentes ehrlichiais (La Scola e Raoult, 1997; Regnery et al., 1991; Yu e Walker, 2003). A seqüência do gene que codifica o rRNA 16S é a mais freqüentemente usada para a identificação de *Ehrlichia*.

Os agentes ehrlichiais encontram-se mundialmente distribuídos. Pacientes com evidência sorológica de infecção com *E. chaffeensis* têm sido identificados em diversos países como Estados Unidos, Argentina, Bélgica, Israel, Itália, México, Portugal, Tailândia e, recentemente, no Brasil. Similarmente, infecções humanas com a *A. phagocytophila* têm sido confirmadas na Bélgica, Dinamarca, Eslovênia e Sudão e pessoas com anticorpos reativos para ehrlichia granulocítica têm sido identificadas na Alemanha, Israel e Itália (Buller et al., 1999; Gongorra-Biachi et al., 1999; Parola e Raoult, 2001; Petrovec et al., 1997).

No Brasil, pouco se conhece sobre ehrlichiose humana, seus agentes etiológicos, prevalência ou ecologia. Porém, sabe-se da presença de espécies de *Ehrlichia* circulando entre cães e seus ectoparasitos (Galvão et al., 2002; Dagnone et al., 2003), denotando a possibilidade de acometimento humano dessa enfermidade. Associando-se a isto o relato da ocorrência dos primeiros três casos de ehrlichiose humana no Brasil (Calic et al., 2004), ressalta-se a necessidade de estudos para o melhor conhecimento da história natural da patologia, o que possibilitará o desenvolvimento de estratégias de vigilância epidemiológica e, conseqüentemente a prevenção de novos casos.

3- JUSTIFICATIVA

A FMB, a mais severa das rickettsioses, vem se consolidando como uma antroponose de difícil controle, associada à significativa morbidade e elevada letalidade (Angerami, 2004), sem o conhecimento das razões para a ocorrência de epidemias e extrema severidade da doença (Walker, 2004).

Apesar dos avanços significativos no conhecimento sobre as rickettsias no Brasil, incluindo a caracterização molecular de algumas espécies, várias e importantes perguntas precisam ser respondidas. Alguns trabalhos (Phillip et al., 1978; Pinter, 2003; Oliveira et al., 2002; Vianna, 2002; Horta, 2002) indicam que, pelo menos, duas espécies de rickettsias patogênicas (*R. rickettsii* e *R. felis*) devem circular nos focos endêmicos para FMB, não estando, porém, seus ciclos bem esclarecidos (Nascimento e Schumaker, 2004).

Considera-se que o baixo número relatado de espécies de rickettsias seja o resultado de poucos estudos e, certamente aumentará quando mais áreas forem investigadas. Além disso, muito pouco se sabe sobre a dinâmica da infecção por diferentes espécies de rickettsias em uma mesma população de carrapatos, e estudos neste campo poderiam ajudar a resolver questões, tais como: o porquê de algumas áreas consideradas endêmicas para FMB passarem por um longo período sem a ocorrência de novos casos humanos, assim como a distribuição da doença em relação à distribuição geográfica da população do vetor (Labruna, 2004a). Dúvidas quanto ao papel dos animais silvestres, incluindo a capivara, e de determinadas espécies de carrapatos na circulação de rickettsias GFM, precisam ser esclarecidas.

Diante disto, maiores investimentos em estudos de campo e laboratoriais, visando a um melhor entendimento sobre as rickettsioses, precisam ser realizados, já que facilitariam o planejamento e a implantação de medidas de prevenção e controle destas enfermidades.

Assim, neste trabalho, buscaram-se mais informações a respeito de espécies de *Rickettsia* e *Ehrlichia* circulantes em um foco de FMB, objetivando contribuir para a ampliação do conhecimento das rickettsioses relacionadas a esses agentes no Brasil.

4- OBJETIVOS

4.1- OBJETIVO GERAL

Estudar os ciclos doméstico e silvestre de agentes rickettsiais em ectoparasitos de animais domésticos e silvestres na área de estudo.

4.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Realizar levantamento da fauna acarológica silvestre da região em estudo;
- 2- Verificar, por PCR, a ocorrência de *Rickettsia* em carrapatos e pulgas coletados de animais domésticos e da vegetação;
- 3- Verificar, por PCR, a ocorrência de *Ehrlichia* em carrapatos e pulgas coletados de animais domésticos e da vegetação;
- 4- Identificar, por seqüenciamento, os produtos de amplificação genômica das espécies de *Rickettsia* em carrapatos e pulgas coletados de animais domésticos e da vegetação;
- 5- Identificar as seqüências de nucleotídeos obtidos por aplicativos de bioinformática em bancos de dados de domínio público; e
- 6- Analisar o papel dos animais silvestres e domésticos e sua importância na manutenção de vetores de *Rickettsias* e *Ehrlichias* na área de estudo.

5- MATERIAIS E MÉTODOS

5.1- CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO DE ESTUDO

O estudo foi realizado em uma localidade endêmica para Febre Maculosa Brasileira: o município de Nova Venécia, no estado do Espírito Santo.

Nova Venécia localiza-se na região noroeste do estado do Espírito Santo, cidade relativamente próxima da divisa com o estado de Minas Gerais, apresentando em 2000 uma população urbana de 27.390 e rural de 15.625 (IBGE).

Em outubro de 2003, a Vigilância Ambiental da Secretaria Estadual de Saúde do Espírito Santo (SESA/ES) passou a ser notificada pelas Secretarias Municipais de Saúde da região noroeste do Espírito Santo, da ocorrência de casos suspeitos de febre maculosa brasileira, sendo a Coordenação de Doenças Transmitidas por Vetores e Antropozoonoses (COVEV), da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), notificada e convidada a participar da investigação epidemiológica no município de Nova Venécia, pela Diretoria de Vigilância Ambiental da SESA/ES.

Foram identificados 16 casos suspeitos de rickettsiose, com a ocorrência de um óbito, no período de 01 de agosto a 31 de outubro de 2003, sendo a maioria concentrada numa localidade chamada Patrimônio do XV (Figura 1), zona rural, com cerca de 1.200 habitantes, 400 famílias.



Figura 1- Vista da região central de Patrimônio do XV, município de Nova Venécia, Espírito Santo.

Destes casos, 85% pertenciam ao sexo masculino, com idade média de 28 anos, variando de 06 a 42 anos, apresentando-se clinicamente com manifestações variadas (Tabela 1).

Tabela 1- Manifestações clínicas dentre os casos suspeitos de rickettsiose humana na localidade de Patrimônio do XV, Nova Venécia, Espírito Santo, 2003.

Sintoma / Sinal Clínico	Ocorrência (%)
Febre, cefaléia, mialgia	100
Fraqueza, artralgia, icterícia	83
Tosse, perda de apetite, tontura	67
Sudorese	50
Náusea, vômito, diarreia	33
Dor de garganta, oligúria	33
Dor abdominal, petéquias, desmaio	33
Exantema, hemorragia, dispnéia, convulsão	15

Em exames laboratoriais com a utilização da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), cinco casos foram considerados confirmados, pois apresentaram conversão sorológica de pelo menos quatro vezes nos títulos de anticorpos, com intervalo de 15 a 21 dias entre a primeira e a segunda coletas, sendo positivos para *R. rickettsii* (dado fornecido pela Secretaria de Saúde do Espírito Santo, em comunicação pessoal).

5.2- COLETA DE CARRAPATOS E PULGAS

Carrapatos e pulgas foram coletados de animais domésticos (cães e equinos) e do ambiente no mês de novembro de 2003.

Para a coleta destes ectoparasitos sobre os animais foi feita a catação manual, com o auxílio de uma pinça quando necessário. Para a coleta dos carrapatos de vida livre, foi utilizada armadilha de CO₂ (Figura 2) em locais previamente determinados como provável origem da infecção, de acordo com o inquérito epidemiológico, considerando possíveis ambientes para contato humano com carrapatos e relatos da presença de capivaras. A maioria dessas coletas ocorreu em áreas próximas ao rio São Mateus e seus afluentes.



Figura 2- Coleta de carrapatos de vida livre em Patrimônio do XV, Nova Venécia, Espírito Santo, 2003. (A) armadilha de CO₂. (B- seta) visualização de carrapato coletado da vegetação.

Os carrapatos e as pulgas coletados foram identificados de acordo com o local, data de coleta e animal hospedeiro, sendo encaminhados adequadamente acondicionados ao laboratório em lotes conforme a origem. No laboratório, os carrapatos e as pulgas foram identificados de acordo com o gênero e o estágio de desenvolvimento, e mantidos em incubadora BOD, à temperatura de 37°C por 48 horas. Esta etapa fez-se necessária para permitir a reativação e multiplicação de organismos rickettsiais no material que seria analisado (Hayes e Burgdorfer, 1982; Walker et al., 1982). A seguir, foram armazenados a -20°C até o momento da extração dos ácidos nucleicos.

5.3- REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

5.3.1- Extração de DNA

Foi utilizado o método do fenol-clorofórmio, de acordo com o protocolo descrito por Billings et al. (1998), como segue:

1. Lavar a amostra com hipoclorito de sódio 2% (duas vezes) e etanol absoluto por um período 10 minutos cada;
2. Lavar a amostra com PBS durante 5 minutos (duas vezes);
3. Adicionar 200 µL de PBS e macerar os ectoparasitos;
4. Adicionar SDS 10% v/v e proteinase K (20mg/mL) para uma concentração final de 1%;
5. Incubar em banho-maria a 37°C durante 1 hora e a 56°C por 10 minutos;

6. Adicionar à amostra digerida 200 µL de fenol/clorofórmio (1:1);
7. Centrifugar a 5000 x g por 5 minutos e recolher o sobrenadante transferindo-o para um novo tubo;
8. Repetir os passos 6 e 7 por oito vezes;
9. Adicionar 200 µL de clorofórmio, agitar e centrifugar;
10. Transferir o sobrenadante para tubo um estéril;
11. Adicionar 22 µL de NaCl 5M e dois volumes de etanol 100% gelado, armazenando a -70° C por 30 minutos, centrifugando a 5000 x g sob temperatura de 4° por 10 minutos;
12. Adicionar 200 µL de etanol 70% e centrifugar a 5000 x g sob temperatura de 4° C por 5 minutos; e
13. Descartar o sobrenadante e ressuspender o *pellet* com água deionizada esterilizada.

5.3.2- Protocolo da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As PCRs foram feitas a partir de DNA de lotes de ectoparasitos, optando-se por esta metodologia para otimização dos recursos materiais. O conteúdo de cada lote está listado no Quadro 1.

Quadro 1- Conteúdo dos lotes de ectoparasitos coletados na área de estudo, Nova Venécia, Espírito Santo, 2003.

Lote	Hospedeiro	Espécie	Estádio	Quantidade
1	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	4
2	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	2
3	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	4
4	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Ovos	-
5	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	4
6	Cão	<i>Ctenocephalides felis</i>	Adulto	1
7	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	9
8	Cão	<i>Ctenocephalides felis</i>	Adulto	9
9	Cão	<i>Ctenocephalides felis</i>	Adulto	8
10	Cão	<i>Ctenocephalides felis</i>	Adulto	7
11	Cão	<i>Ctenocephalides felis</i>	Adulto	7
12	Cão	<i>Ctenocephalides felis</i>	Adulto	7
13	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Ninfa	2
14	Cão	<i>Ctenocephalides felis</i>	Adulto	2
15	Ambiente	<i>Amblyomma cajennense</i>	Adulto/Ninfa	1/1
16	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	1

17	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	4
18	Ambiente	<i>Amblyomma cooperi</i>	Adulto	4
19	Ambiente	<i>Amblyomma cooperi</i>	Adulto	4
20	Ambiente	<i>Amblyomma cooperi</i>	Adulto	4
21	Ambiente	<i>Amblyomma cooperi</i>	Adulto	5
22	Ambiente	<i>Amblyomma cooperi</i>	Adulto	6
23	Ambiente	<i>Amblyomma cooperi</i>	Adulto	2
24	Ambiente	<i>Amblyomma cooperi</i>	Ninfa	14
25	Ambiente	<i>Amblyomma cooperi</i>	Adulto	4
26	Ambiente	<i>Amblyomma cooperi</i>	Adulto	4
27	Ambiente	<i>Amblyomma cooperi</i>	Adulto	4
28	Ambiente	<i>Amblyomma cooperi</i>	Adulto	4
29	Ambiente	<i>Amblyomma cooperi</i>	Adulto	3
30	Ambiente	<i>Amblyomma cooperi</i>	Adulto	3
31	Ambiente	<i>Amblyomma cooperi</i>	Ninfa	5
32	Eqüino	<i>Anocentor nitens</i>	Adulto	3
33	Eqüino	<i>Anocentor nitens</i>	Adulto	3
34	Eqüino	<i>Anocentor nitens</i>	Ninfa	4
35	Eqüino	<i>Anocentor nitens</i>	Adulto	8
36	Eqüino	<i>Anocentor nitens</i>	Adulto	4
37	Eqüino	<i>Anocentor nitens</i>	Adulto	6
38	Equino	<i>Amblyomma cajennense</i>	Adulto	3
39	Eqüino	<i>Amblyomma cajennense</i>	Ovos	-
40	Cão	<i>Amblyomma cajennense</i>	Ninfa	1
41	Eqüino	<i>Amblyomma cajennense</i>	Adulto	1
42	Ambiente	<i>Amblyomma cooperi</i>	Adulto	3
43	Ambiente	<i>Amblyomma cooperi</i>	Adulto	2
44	Ambiente	<i>Amblyomma cooperi</i>	Ninfa	4
45	Cão	<i>Ctenocephalides felis</i>	Adulto	8
46	Cão	<i>Amblyomma cajennense</i>	Ninfa	1
47	Eqüino	<i>Anocentor nitens</i>	Adulto	2
48	Eqüino	<i>Anocentor nitens</i>	Adulto	2
49	Cão	<i>Ctenocephalides felis</i>	Adulto	5
50	Humano	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Ninfa	1
51	Ambiente	<i>Amblyomma cajennense</i>	Adulto	1
52	Cão	<i>Ctenocephalides felis</i>	Adulto	1
53	Ambiente	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Ninfa	10
54	Cão	<i>Ctenocephalides felis</i>	Adulto	8
55	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	1
56	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	2
57	Cão	<i>Ctenocephalides felis</i>	Adulto	2
58	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	3
59	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	4
60	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Ovos	-
61	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	5
62	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto/Ninfa	4/1
63	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	10
64	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Ovos	-
65	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	2

66	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	2
67	Cão	<i>Ctenocephalides felis</i>	Adulto	1
68	Cão	<i>Ctenocephalides felis</i>	Adulto	7
69	Cão	<i>Ctenocephalides felis</i>	Adulto	8
70	Cão	<i>Ctenocephalides felis</i>	Adulto	8
71	Cão	<i>Ctenocephalides felis</i>	Adulto	1
72	Cão	<i>Ctenocephalides felis</i>	Adulto	9
73	Cão	<i>Ctenocephalides felis</i>	Adulto	3
74	Eqüino	<i>Anocentor nitens</i>	Ninfa/Adulto	3/2
75	Eqüino	<i>Anocentor nitens</i>	Adulto/ Ninfa	4/1
76	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto/ Ninfa	3/2
77	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	5
78	Eqüino	<i>Amblyomma cajennense</i>	Adulto	5
79	Eqüino	<i>Anocentor nitens</i>	Adulto	3
80	Eqüino	<i>Amblyomma cajennense</i>	Adulto	1
81	Cão	<i>Ctenocephalides felis</i>	Adulto	2
82	Ambiente	<i>Amblyomma cajennense</i>	Adulto	1
83	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	4
84	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Ninfa	1
85	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	3
86	Cão	<i>Ctenocephalides felis</i>	Adulto	1
87	Ambiente	<i>Amblyomma cooperi</i>	Adulto	3
88	Ambiente	<i>Amblyomma cooperi</i>	Adulto/ Ninfa	3/4
89	Eqüino	<i>Anocentor nitens</i>	Adulto	2
90	Eqüino	<i>Anocentor nitens</i>	Ovos	-
91	Eqüino	<i>Amblyomma cajennense</i>	Adulto	3
92	Eqüino	<i>Anocentor nitens</i>	Adulto	1
93	Eqüino	<i>Anocentor nitens</i>	Adulto	3
94	Eqüino	<i>Anocentor nitens</i>	Adulto	3
95	Eqüino	<i>Anocentor nitens</i>	Adulto	2
96	Eqüino	<i>Anocentor nitens</i>	Ninfa	7
97	Eqüino	<i>Amblyomma cajennense</i>	Adulto	4
98	Eqüino	<i>Amblyomma cajennense</i>	Adulto	5
99	Eqüino	<i>Amblyomma cajennense</i>	Ninfa	3
100	Ambiente	<i>Amblyomma cooperi</i>	Adulto	4
101	Ambiente	<i>Amblyomma cooperi</i>	Adulto	4
102	Ambiente	<i>Amblyomma cooperi</i>	Ninfa	2
103	Ambiente	<i>Amblyomma cooperi</i>	Adulto	4
104	Ambiente	<i>Amblyomma cooperi</i>	Ninfa	1
105	Cão	<i>Ctenocephalides felis</i>	Adulto	1
106	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Ninfa	1
107	Ambiente	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	2
108	Cão	<i>Amblyomma cooperi</i>	Adulto	3
109	Cão	<i>Amblyomma cooperi</i>	Adulto	3
110	Cão	<i>Amblyomma cooperi</i>	Adulto	2
111	Cão	<i>Ctenocephalides felis</i>	Adulto	1
112	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	4
113	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	2
114	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	2

115	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	4
116	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	3
117	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	3
118	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	3
119	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	3
120	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	4
121	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	4
122	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	4
123	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	4
124	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	4
125	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Ovos	-
126	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	3
127	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	3
128	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	3
129	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	4
130	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	4
131	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	4
132	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	2
133	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	4
134	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	4
135	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	3
136	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Ovos	-
137	Cão	<i>Ctenocephalides felis</i>	Adulto	1
138	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Ovos	-
139	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	2
140	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	2
141	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	2
142	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	2
143	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	2
144	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	2
145	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	2
146	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	3
147	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	4
148	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	3
149	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	1
150	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	2
151	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto	3
152	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Ovos	-

As amplificações foram realizadas em termociclador de marca MJ Research, Inc., modelo PTC-100-Watertown, EUA, inicialmente para 30 *pools* contendo 5 lotes de ectoparasitos cada. Após a detecção dos *pools* positivos, estes foram desmembrados e, então, cada lote foi submetido a uma nova reação de PCR.

5.3.2.1- Reação *Rickettsia* gênero-específica

Para a amplificação de uma porção de 434 pb do gene codificador de uma proteína de 17 kDa *Rickettsia* gênero-específica, foram utilizados os iniciadores direcionados para o gene 17 kDa (17kD1: 5'- GCTCTTGCAACTTCTATGTT- 3'; 17kD2: 5' – CATTGTTCGTCAGGTTGGCG- 3') nas condições descritas por Azad et al. (1990) e Webb et al. (1990):

- Pré-desnaturação: 94° C por 3 minutos;
 - Desnaturação: 95° C por 1 minuto
 - Anelamento: 50° C por 1 minuto
 - Extensão: 72° C por 2 minutos
 - Extensão final a 72° C por 5 minutos;
 - 4°C.
- } 30 ciclos

As PCRs foram realizadas com 25µL contendo: 2,5 µL de tampão taq 10X; 1µL de cada primer a 10pmol; 1 µL de MgCl₂ a 25mM; 0,5 µL de mix de deoxinucleotídeos a 10mM; 0,2 µL de Taq DNA Polimerase recombinante (Invitrogen®) a 5U/µL; 2,0 µL de DNA de cada amostra ou 0,5 µL de DNA purificado do controle positivo; e água pura autoclavada completando o volume total. Para o controle negativo, todos os reagentes, exceto DNA, foram utilizados nas mesmas concentrações.

Como controle positivo, foi utilizado DNA purificado de *R. prowazekii*, fornecido pelo Dr. David H. Walker (*World Health Organization Collaborating Center for Tropical Diseases, University of Texas Medical Branch, EUA*).

Após a PCR, uma alíquota do produto amplificado foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 1,0%, corado com brometo de etídeo, sendo levado ao transiluminador sob luz ultravioleta para visualização e identificação das bandas.

As amostras negativas na primeira amplificação foram reamplificadas, utilizando outro par de iniciadores também gênero-específicos (17kN1: 5'- CATTACTTGGTTCTCAATTCGGT-3'; 17kN2: 5'-GTTTTATTAGTGGTTACGTAA-3') (Azad et al., 1990; Schriefer et al., 1994), amplificando uma região mais interna do gene da 17 Kda, de 232pb, permitindo a realização de uma PCR de maior sensibilidade (nested PCR), já que utiliza como molde, além do DNA genômico da amostra, o produto amplificado na primeira reação. Para este PCR, foram utilizadas as seguintes condições:

- Pré-desnaturação: 94° C por 3 minutos;
 - Denaturação: 95° C por 1 minuto
 - Anelamento: 50° C por 1 minuto
 - Extensão: 72° C por 2 minutos
 - Extensão final a 72° C por 5 minutos;
 - 4°C.
- } 30 ciclos

As nested PCRs foram realizadas com 25µL contendo: 2,5 µL de tampão taq 10X; 1µL de cada primer a 10pmol; 1 µL de MgCl₂ a 25mM; 0,5 µL de mix de deoxinucleotídeos 10mM; 0,2 µL de Taq DNA Polimerase recombinante (Invitrogen®) a 5U/µL; 2,0 µL da primeira reação de PCR de cada amostra ou 0,5 µL da primeira reação de PCR do controle positivo diluída 100 vezes; e água pura autoclavada completando o volume total. Para o controle negativo, todos os reagentes, exceto DNA, foram utilizados nas mesmas concentrações.

5.3.2.2- Reação *Ehrlichia* gênero- específica

Para a detecção de organismos do gênero *Ehrlichia*, foram utilizados os iniciadores ECC (5'-AGAACGAACGCTGGCGGCAAGC-3') e ECB (5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA-3') (Anderson et al., 1992; Dawson et al., 1994; Dawson et al., 1996) que amplificam um fragmento de 581 pb do DNA que codifica para rRNA 16S . Estas reações foram desenvolvidas nas seguintes condições:

- Pré-desnaturação: 94° C por 5 minutos;
 - Denaturação: 94° C por 1 minuto
 - Anelamento: 65° C por 2 minutos
 - Extensão: 72° C por 2 minutos
 - 4°C.
- } 30 ciclos

As PCRs foram realizadas com 25µL contendo: 2,5 µL de tampão taq 10X; 1µL de cada primer a 10pmol; 1 µL de MgCl₂ a 25mM; 0,5 µL de mix de deoxinucleotídeos a 10mM; 0,2 µL de Taq DNA Polimerase recombinante (Invitrogen®) a 5U/µL; 2,0 µL de DNA de cada amostra ou 1,0 µL de DNA purificado do controle positivo diluído 10 vezes; e água pura autoclavada completando o volume total. Para o controle negativo, todos os reagentes, exceto DNA, foram utilizados nas mesmas concentrações.

Como controle positivo, foi utilizado DNA purificado de *Ehrlichia sp.* fornecido pelo Dr. David H. Walker (*World Health Organization Collaborating Center for Tropical Diseases, University of Texas Medical Branch, EUA*).

Após a PCR, uma alíquota do produto amplificado foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 1,0%, o produto foi corado com brometo de etídeo, sendo levado ao transiluminador sob luz UV para visualização e identificação das bandas.

5.3.2.3- Reação para detecção de outros gêneros

Para a amplificação de organismos de outros gêneros relacionados, foram utilizados os iniciadores RpCs1258n (5'-ATTGCAAAAAGTACAGTGAAC-3') e RpCs877p (5'-GGGGGCCTGCTCACGGCGG-3'). Estas reações foram realizadas nas condições descritas abaixo:

- Pré-desnaturação: 95° C por 2 minutos;
 - Denaturação: 95° C por 30 segundos
 - Anelamento: 45° C por 30 segundos
 - Extensão: 65° C por 55 segundos
 - Extensão final a 72° C por 3 minutos;
 - 4°C.
- } 35 ciclos

As PCRs foram realizadas com 25µL contendo: 2,5 µL de tampão Taq 10X; 1µL de cada primer a 10pmol; 1 µL de MgCl₂ à 25mM; 0,5 µL de mix de deoxinucleotídeos 10mM; 0,2 µL de Taq DNA Polimerase recombinante (Invitrogen®) à 5U/µL; 2,0 µL de DNA de cada amostra ou 0,5 µL de DNA purificado do controle positivo; e água pura autoclavada completando o volume total. Para o controle negativo, todos os reagentes, exceto DNA, foram utilizados nas mesmas concentrações.

Como controle positivo, foi utilizado DNA purificado de *R. prowazekii*.

Após a PCR, uma alíquota do produto amplificado foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 1,0%, o produto foi corado com brometo de etídeo, sendo levado ao transiluminador sob luz UV para visualização e identificação das bandas.

5.4- SEQUENCIAMENTO

O produto de amplificação de oito lotes de ectoparasitos foram submetidos a sequenciamento.

5.4.1- Clonagem

Os produtos amplificados de três lotes de ectoparasitos (45, 88 e 104) (Quadro 1) foram clonados no vetor pCR[®] 2.1-TOPO do kit TOPO TA cloning[®] da Invitrogen[®]. O vetor pCR[®] 2.1-TOPO fornecido nesse kit é um plasmídeo de fita dupla linearizado, de 3,9 kb que contém genes que conferem resistência à ampicilina e à kanamicina e ao sistema operon *Lac Z* de *Escherichia coli*, dentro do qual se encontra o sítio de clonagem. O sítio de clonagem é caracterizado pela presença de uma timina despareada 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 em temperatura ambiente durante 5 minutos. Foram utilizados 3 µL do produto de PCR; 1 µL do plasmídeo vetor (10 ng/µl) em Tris-HCL 50 mM pH 7,4 (a 25°C); EDTA 1 mM, DTT 1 mM; Triton X-100 0,1%; BSA 100 µg/mL; glicerol 50%, 1 µL de solução salina contendo NaCl 1,2 M; MgCl₂ 0,06 M; e 1 µL de água estéril, resultando um volume final de 6 µL de produto de ligação.

5.4.2- Transformação em célula bacteriana competente

As células competentes DH5 AlphaClones (cedidas pelo Laboratório de Virologia Molecular Animal/BIOAGRO/UFV) que estavam armazenadas a -80°C foram retiradas e procedeu-se ao descongelamento lento no gelo por aproximadamente 30 minutos sem movimentos bruscos. Cerca de 4 µL da reação de clonagem foram adicionados a 200 µL de células competentes. Incubou-se no gelo por 30 minutos (o volume adicionado pode ser de no máximo 5% do volume de células competentes utilizadas). As células foram então submetidas a um choque térmico a 42°C por 45 segundos. Após o choque térmico, os tubos foram colocados novamente no gelo e, então, foram adicionados 800 µl de SOC (mesmo meio SOB, acrescido de 20 mL de glicose 1 M) pré-aquecido (37°C). A solução foi incubada a 37°C por 60 minutos sob 150 rpm de agitação. Em seguida, as células foram plaqueadas em meio seletivo (LB/ampicilina/X-gal/IPTG) e incubadas a 37°C durante a noite.

5.4.3- Triagem das colônias recombinantes

A triagem das colônias recombinantes foi feita visualmente. As colônias brancas (recombinantes) que surgiram após a transformação, foram transferidas para um tubo contendo 4mL de meio LB líquido e 4 µL de ampicilina e mantidas a 37°C e 180rpm por 24 horas, para o crescimento das colônias.

5.4.4- Purificação dos plasmídios recombinantes

Para extração do DNA plasmidial, foi utilizado o kit *High Pure Plasmid Isolation* (Roche Diagnostic), de acordo com as recomendações do fabricante. O produto obtido foi então quantificado em gel de agarose 1% em TAE 0,5X, corado com brometo de etídio (0,5mg/mL), e submetido ao seqüenciamento.

5.4.5- Purificação dos produtos da PCR

Os produtos amplificados de cinco lotes de ectoparasitos (26, 31, 71, 131, 137) (Quadro 1) foram purificados e submetidos ao seqüenciamento direto.

Para purificação dos produtos de PCR, utilizou-se o kit QIAquick PCR purification Kit (Qiagen®), de acordo com as recomendações do fabricante, sendo quantificado em gel de agarose 1% em TAE 0,5X e corado com brometo de etídio (0,5mg/mL).

5.4.6- Reação de seqüenciamento

As reações de seqüenciamento foram baseadas na técnica de terminação de cadeia por dideoxynucleotídeos (ddNTPs) descrita por Sanger et al. (1977). O DNA foi seqüenciado, utilizando-se o *ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (PE Applied Biosystems®). Para isso, de 200 a 500 ng do DNA foram empregados em uma reação contendo 4 µL de mix, fornecido no Kit de seqüenciamento, 5,0 pmoles do iniciador direto e 6 µL de tampão (Tris-HCl 200mM, pH 9,0; MgCl₂ mM) em um volume total de reação de 20µL.

Após a amplificação, o DNA foi precipitado pela adição de 80 µL de isopropanol a 75% e os tubos, deixados à temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, foi centrifugado a 15.800 g por 20 minutos, sendo o sobrenadante descartado. O *pellet* de DNA foi lavado com 250 µL de isopropanol a 75%, centrifugado a 15.800 g por 5 minutos e seco à temperatura ambiente. O *pellet* foi

ressuspenso em 15 μ L de *Template Suppression Reagent* (PE Applied Biosystems®), desnaturado a 95°C por 5 minutos e mantido no gelo até a sua aplicação. Os produtos da extensão foram separados por eletroforese capilar, utilizando-se como matriz o polímero POP6 (PE Applied Biosystems®). A fluorescência emitida foi coletada por uma câmara CCD, sendo a informação processada pelo *ABI PRISM 310 Genetic Analyzer* (PE Applied Biosystems®). Os dados foram automaticamente convertidos em seqüências de desoxinucleotídeos.

5.4.7- Análise da seqüência nucleotídica

As seqüências nucleotídicas, obtidas a partir da amplificação de fragmentos de 231 e 434pb do gene que codifica para a proteína 17kDa, foram comparadas com correspondentes homólogas disponíveis no GenBank pelo aplicativo Discontínuos MegaBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Para determinação de relacionamentos filogenéticos, seqüências nucleotídicas de 434 pb de dois fragmentos amplificados (UFV1 e UFV2) foram editadas, utilizando-se o programa Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>), e alinhadas com seqüências correspondentes (em Anexo), utilizando-se o programa de alinhamento múltiplo ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw1.82>). O relacionamento filogenético entre representantes do gênero *Rickettsia* foi determinado pela comparação de fragmentos de 381 e 382 pb, utilizando-se o software PAUP 4.0b10 (Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusset, EUA). Os filogramas foram obtidos pelos critérios máxima parcimônia, evolução mínima e máxima verossemelhança.

Para análise de máxima parcimônia, todos os caracteres foram pesados igualmente e uma procura heurística com dez replicatas com adição aleatória de seqüência foi realizada para facilitar o rearranjo (*branch swapping*), para o qual se utilizou o algoritmo *tree-bisection-reconnection* (TBR), obtendo-se seis árvores filogenéticas.

Para análise de evolução mínima, as medidas de distância foram calculadas pelo LogDet/paralinear, obtendo-se um total de seis árvores filogenéticas.

Durante a análise por máxima probabilidade, as árvores com probabilidade aproximada de 5% ou mais do escore alvo foram rejeitadas, obtendo-se o número de uma árvore filogenética.

6- RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1- IDENTIFICAÇÃO DOS ECTOPARASITOS

Um total de 502 ectoparasitos foram coletados de 24 cães, cinco eqüinos e do ambiente, nos estádios de ninfa e adulto, além de ovos, e foram divididos em 152 lotes (Quadro 1).

Os carrapatos e pulgas coletados foram identificados como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2- Identificação das espécies de ectoparasitos e distribuição por número de lotes coletados para cada estágio de desenvolvimento, Nova Venécia, Espírito Santo, 2003.

Espécie	Fonte	Estágio				Total	
		Ovo	larva	ninfa	adulto	N*	Lotes
<i>Amblyomma cooperi</i>	ambiente	0	0	26	67	93	24
	cão	0	0	0	8	8	3
<i>Amblyomma cajennense</i>	ambiente	0	0	1	3	4	3
	eqüino	0	0	1	22	23	9
	cão	0	0	2	0	2	2
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	ambiente	0	0	10	2	12	2
	cão	7**	0	11	173	184	67
	humano	0	0	1	0	1	1
<i>Anocentor nitens</i>	eqüino	0	0	27	44	71	17
<i>Ctenocephalides felis</i>	cão	0	0	-	104	104	24
Total		7**	0	79	423	502	152

* N: tamanho amostral de ectoparasitos.

** número de lotes de ovos.

Os carrapatos *A. cooperi* e *A. cajennense* coletados através de armadilhas no solo são, possivelmente, provenientes de capivaras (*H. hydrochaeris*), mamíferos silvestres que servem como hospedeiros primários destas espécies de ectoparasitos (Travassos e Vallejo, 1942 a, b) e que, segundo relatos de residentes e mediante comprovação pela observação de fezes e pegadas do animal no local de coleta (Figura 3), freqüentam as pastagens próximas ao rio, onde foram

realizadas as coletas, o que permite inferir as espécies que compõem a fauna acarológica silvestre da região.

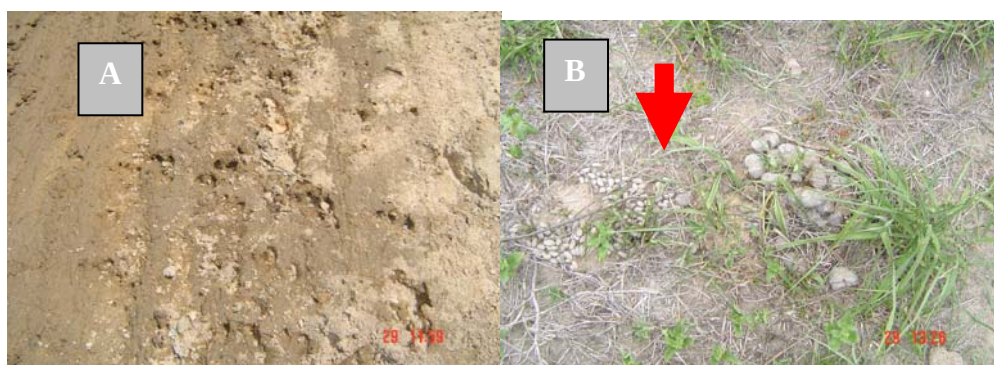


Figura 3- Evidência da presença de capivaras no local de coleta de ectoparasitos, Nova Venécia, Espírito Santo, 2003. (A) pegadas de capivaras. (B- seta) fezes de capivaras.

Embora haja controvérsias sobre o parasitismo humano pelo *A. cooperi*, sua importância médica se baseia principalmente numa possível participação no ciclo enzoótico de *Rickettsia* em a natureza (Travassos e Vallejo, 1942b). Além disso, grandes populações de *A. cooperi* têm sido encontradas, juntamente com a espécie *A. cajennense* em alguns focos de FMB na região sudeste (Souza et al., 2001). Lemos et al. (1996b) isolaram de um exemplar dessa espécie, coletado de capivara, uma *Rickettsia* do GFM, numa área endêmica da FMB em Pedreira, estado de São Paulo.

A. cajennense, popularmente conhecido em diversas regiões do país por “carrapato estrela” ou “rodoleiro” na sua fase adulta, “vermelhinho” na fase de ninfas, por “micuim” na fase de larva e por “carrapatinho” tanto na fase de larva quanto de ninfa, é encontrado com frequência infestando eqüídeos, seus hospedeiros preferenciais (Oliveira, 2004), que apresentam grande capacidade de albergar altas infestações do artrópode (Labruna, 2000). Entretanto, devido à sua baixa especificidade parasitária quanto a hospedeiros vertebrados, principalmente nos estádios imaturos, o *A. cajennense* pode infestar outros mamíferos, como bovídeos, cervídeos, canídeos domésticos e silvestres, além do próprio homem. Populações de *A. cajennense* têm sido observadas em áreas onde não existem eqüídeos, parasitando várias espécies de animais silvestres, principalmente em locais de pastagens sujas ou de cobertura vegetal mais densa, locais que estes hospedeiros freqüentam com assiduidade (Oliveira, 2004).

No centro-sul brasileiro, o *A. cajennense* é a principal espécie de carrapato que parasita humanos, sendo considerada o principal vetor da FMB (Aragão e Fonseca, 1961). Também na localidade em estudo, embora tenha sido coletado em menor número (Tabela 2), há que se considerar o papel potencial e de grande importância deste carrapato, vetor e reservatório de *Rickettsia* (Lemos et al., 1997a, b), já que foram encontrados, em áreas de trânsito comum de seus hospedeiros domésticos, amplificadores de populações do artrópode e hospedeiros silvestres, na manutenção deste patógeno e exposição do mesmo aos moradores.

Atualmente, *R. sanguineus* é considerado, juntamente com as pulgas, um dos principais ectoparasitos do cão doméstico em todo o Brasil, sendo este o único hospedeiro primário para todos os estádios parasitários (larva, ninfas e adultos) deste ixodídeo (Labruna, 2004b).

Embora não existam registros concretos de parasitismo humano por *R. sanguineus* no Brasil (Labruna, 2004b), o relato da infecção deste carrapato por algumas espécies de patógenos como *E. canis*, *R. rickettsii*, *R. conorii* e *R. felis* (Bustamante e Varela, 1947; Mariotte et al., 1944; Roux e Raoult, 1997; Cardoso, 2004; Demma et al., 2005) mostra que não se deve desconsiderar a importância deste artrópode na manutenção dessas rickettsioses. Lemos et al. (1997b) também encontraram esta espécie de carrapato em estudo realizado em áreas endêmicas para FMB no Estado de São Paulo e ressaltam que o fato de não terem sido capturados de humanos não diminui a importância desta espécie nesses locais, podendo, portanto, perpetuar a atividade rickettsial. Cardoso (2004), ao conduzir um trabalho com objetivos de detectar a presença de *Rickettsia spp.* circulante em artrópodes vetores de um foco inativo periurbano do município de Caratinga, estado de Minas Gerais, e avaliar o nível de transmissão de rickettsioses na população animal do domicílio e peridomicílio, encontrou grande infestação de cães por *R. sanguineus*, e detectou carrapatos desta espécie infectados por *R. felis*. Em estudo realizado no sudeste do Arizona (EUA), estado onde RMSF é raramente relatada, os carrapatos Dermacentor são incomuns. Demma et al. (2005) documentaram a presença da enfermidade e *R. sanguineus* como vetor de *R. rickettsii* nessa área, comentando que a ampla distribuição deste é preocupante, devido ao seu potencial de transmissão do patógeno em outras situações epidemiológicas.

Além disso, na área em estudo, a presença de *R. sanguineus* na vegetação de locais visitados pelas capivaras e de *A. cooperi* em cães domésticos, como mostra a Tabela 2, chama a atenção para o fato de que estes estão freqüentando locais comuns a animais silvestres, o que torna possível o seu contato com

carrapatos da fauna silvestre, naturalmente infectados com *Rickettsia*, e conseqüentemente sua atuação como hospedeiros de transporte mecânico desses vetores para o interior das residências da área estudada. Figueiredo et al. (1999) reportaram que mamíferos silvestres, principalmente capivaras e veados infestados por carrapatos, vivem em contato com gado, cavalos e cães, com os quais compartilham os mesmos carrapatos, oferecendo risco de transmissão de zoonoses silvestres, como rickettsioses, aos animais domésticos e ao homem.

O *Anocentor nitens*, que apresenta como hospedeiro primário os eqüídeos, tem sido também encontrado em área endêmica para FMB, mostrando-se infectado ao teste de hemolinfa, por organismos semelhantes à *Rickettsia*, mostrando que estas espécies de carrapatos podem estar implicadas na manutenção de rickettsias do GFM (Lemos et al., 1997b).

Pulgas são vetores competentes de numerosos patógenos de importância médica e veterinária (Shaw et al., 2004). Existe interesse crescente no papel da pulga do gato, *C. felis*, na epidemiologia de doenças zoonóticas transmitidas por este ectoparasito, incluindo tifo murino e rickettsiose felis. Pulgas dessa espécie, infectadas com *R. felis*, coletadas sobre cães, têm sido encontradas em diferentes regiões endêmicas para a FMB como Minas Gerais (Oliveira et al., 2002; Vianna, 2002) e São Paulo (Horta, 2002; Pinter, 2003) através do seqüenciamento de genes rickettsiais.

Embora mais bem adaptada ao parasitismo de cães e gatos domesticados, a *C. felis* também pode alimentar-se em uma gama variada de hospedeiros, incluindo espécies de vida selvagem periurbanas e, além disto, esse ectoparasito que pode instalar-se formando grandes populações dentro de casas pode picar humanos na ausência de seus hospedeiros preferenciais (Shaw et al., 2004). Coletados sobre um gambá, em estudo epidemiológico sobre rickettsiose felis no Estado de São Paulo, exemplares dessa pulga também se apresentaram infectadas por *R. felis*, indicando possível participação destes marsupiais no ciclo silvestre da enfermidade (Horta et al., 2004).

Como mostra a Tabela 2, *C. felis*, um dos ectoparasitos predominantes na coleta, foi encontrada sobre cães em áreas comumente transitadas por animais silvestres e domésticos, mostrando, mais uma vez, a possibilidade do papel deste vertebrado como um elo entre os ciclos silvestre e doméstico de rickettsioses na localidade de estudo, transportando estes ectoparasitos potencialmente infectados para as residências.

É importante ressaltar a maior prevalência de adultos coletados, em relação aos outros estágios para todos os ectoparasitos, como mostra a Tabela 2. Para o *A. cajennense*, que possui um ciclo anual bem conhecido, o resultado reflete dados encontrados na literatura (Oliveira, 2004), mostrando que a fase adulta apresenta as maiores densidades populacionais no período de setembro a março, compreendendo o período de realização da coleta. O fato é relevante desde que adultos, bem como ninfas, também detectadas em pequenas populações neste período, representam as formas mais infectantes (Galvão, 1996), apresentando, assim, maior probabilidade de transmissão de patógenos para animais e humanos, considerando-se ainda o período de ocorrência de casos suspeitos de febre maculosa na localidade de estudo (agosto a outubro). Para os outros ectoparasitos, que não têm sua sazonalidade esclarecida, ficou ressaltada a notável predominância da fase adulta no mês em que se realizou a coleta.

6.2- DETECÇÃO DE PATÓGENOS

6.2.1- Detecção de *Rickettsia* através do gene 17kDa

Utilizando-se primers específicos para detecção de espécies do gênero *Rickettsia*, através de PCR e *nested*-PCR, mostraram-se positivos os lotes de ectoparasitos apresentados no Quadro 2.

Quadro 2- Lista dos lotes de ectoparasitos positivos para *Rickettsia spp.*, Nova Venécia, Espírito Santo, 2003.

Lote	Fonte	Espécie	Estádio
4	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Ovos
10	Cão	<i>Ctenocephalides felis</i>	Adulto
26	Ambiente	<i>Amblyomma cooperi</i>	Adulto
31	Ambiente	<i>Amblyomma cooperi</i>	Ninfa
34	Eqüino	<i>Anocentor nitens</i>	Ninfa
35	Eqüino	<i>Anocentor nitens</i>	Adulto
36	Eqüino	<i>Anocentor nitens</i>	Adulto
38	Eqüino	<i>Amblyomma cajennense</i>	Adulto
42	Ambiente	<i>Amblyomma cooperi</i>	Adulto
44	Ambiente	<i>Amblyomma cooperi</i>	Ninfa
45	Cão	<i>Ctenocephalides felis</i>	Adulto
59	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto
63	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto
65	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto
69	Cão	<i>Ctenocephalides felis</i>	Adulto
70	Cão	<i>Ctenocephalides felis</i>	Adulto
71	Cão	<i>Ctenocephalides felis</i>	Adulto
74	Eqüino	<i>Anocentor nitens</i>	Ninfa
74	Eqüino	<i>Anocentor nitens</i>	Adulto
74	Eqüino	<i>Anocentor nitens</i>	Adulto
85	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto
87	Ambiente	<i>Amblyomma cooperi</i>	Adulto
88	Ambiente	<i>Amblyomma cooperi</i>	Adulto
88	Ambiente	<i>Amblyomma cooperi</i>	Ninfa
98	Eqüino	<i>Amblyomma cajennense</i>	Adulto
99	Equino	<i>Amblyomma cajennense</i>	Ninfa
104	Ambiente	<i>Amblyomma cooperi</i>	Ninfa
131	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Adulto
136	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Ovos
137	Cão	<i>Ctenocephalides felis</i>	Adulto
152	Cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Ovos

Os padrões de bandas dos fragmentos amplificados por PCR utilizando-se os *primers* externos 17kD1 e 17kD2, e por *nested*-PCR, com os *primers* internos 17kN1 e 17kN2, a partir de DNA extraído de carrapatos e pulgas coletados na região em estudo, são mostrados nas Figuras 4 e 5.

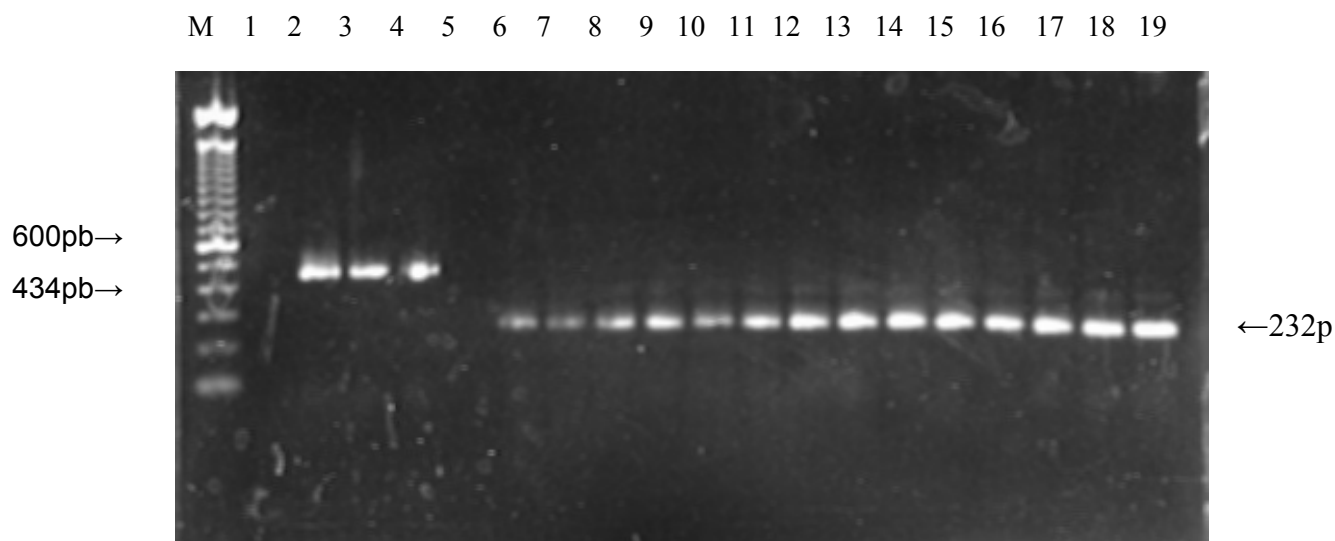


Figura 4- Resultado de PCR e *nested*-PCR para detecção de *Rickettsia*, em gel de agarose 1%. M- marcador de peso molecular 100 pb; canaleta 1- controle negativo PCR; canaleta 2- controle positivo PCR; canaletas 3 e 4- produtos de amplificação de DNA dos lotes 45 (*C. felis*, adulto) e 71 (*C. felis*, adulto) respectivamente; Canaleta 5- controle negativo *n*-PCR; canaleta 6- controle positivo *n*-PCR; canaletas 7 a 19: produtos de amplificação de DNA dos lotes 4 (*R. sanguineus*, ovos), 10 (*C. felis*, adulto), 26 (*A. cooperi*, adulto), 31 (*A. cooperi*, ninfa), 34 (*A. nitens*, ninfa), 35 (*A. nitens*, adulto), 36 (*A. nitens*, adulto), 38 (*A. cajennense*, adulto), 42 (*A. cooperi*, adulto), 44 (*A. cooperi*, ninfa), 59 (*R. sanguineus*, adulto), 63 (*R. sanguineus*, adulto), 65 (*R. sanguineus*, adulto), respectivamente.

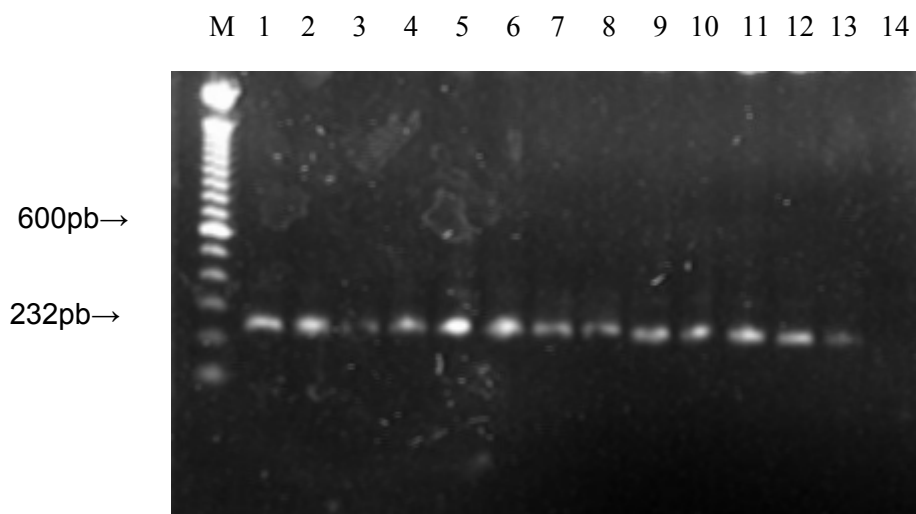


Figura 5- Resultado de PCR e *nested*-PCR para detecção de *Rickettsia*, em gel de agarose 1%. M- marcador de peso molecular 100 pb; canaletas 1 a 13- produtos de amplificação de DNA dos lotes 69 (*C. felis*, adulto), 70 (*C. felis*, adulto), 74 (*A. nitens*, ninfa), 85 (*R. sanguineus*, adulto), 87 (*A. cooperi*, adulto), 88 (*A. cooperi*, ninfa), 98 (*A. cajennense*, adulto), 99 (*A. cajennense*, ninfa), 104 (*A. cooperi*, ninfa), 131 (*R. sanguineus*, adulto), 136 (*R. sanguineus*, ovos), respectivamente; canaleta 14- controle negativo *n*-PCR.

Estes resultados apresentam uma contribuição para o conhecimento inicial da prevalência de infecção por organismos rickettsiais na área estudada. Como mostra o Quadro 2, 28 lotes de ectoparasitos apresentaram-se infectados com *Rickettsia spp.*, pela amplificação de fragmentos do gene que codifica para a proteína 17 kDa (434 e 231 pares de bases) por PCR, perfazendo um percentual (18,5%) comparável ao encontrado por Cardoso (2004), 13,44%, em um foco periurbano de FMB na cidade de Caratinga, estado de Minas Gerais, onde a enfermidade é endêmica.

O Quadro 2 mostra ainda que exemplares de *Rickettsia spp.* estão circulando entre todas as espécies de ectoparasitos coletadas na área de estudo, comprovando o papel das mesmas na manutenção desses patógenos potenciais, encontrados também, de maneira endêmica, em outras localidades no Brasil (Labruna et al., 2004; Oliveira et al., 2002; Vianna, 2002; Horta, 2002; Pinter, 2003; Lemos et al., 1997b).

A detecção de ovos de *R. sanguineus* infectados, como mostrado no Quadro 2, evidencia o fenômeno da transmissão transovariana de *Rickettsia* por estes carrapatos em a natureza, bem documentada para várias espécies de ixodídeos,

confirmando sua importância na manutenção da bactéria na área de estudo, atuando, não apenas como seu vetor, mas também como reservatório (Macaluso et al., 2002; Burgdorfer & Brinton, 1975; Mulenga et al., 2003). No Brasil, Monteiro (1932) mostrou, pela primeira vez, através de inoculação de extrato de ovos de carrapatos infectados em cobaias, a transmissão transovariana de *Rickettsia sp.* em *A. cajennense*.

A Tabela 3 mostra a prevalência de infecção por *Rickettsia* dos lotes de ectoparasitos, em relação ao número de lotes coletados para cada espécie.

Tabela 3- Porcentagem de lotes de ectoparasitos positivos para *Rickettsia* em relação ao número de lotes coletados para cada espécie, Nova Venécia, Espírito Santo, 2003.

Espécie	Lotes Positivos	
	Nº	%
<i>Amblyomma cajennense</i>	3	21,5
<i>Amblyomma cooperi</i>	7	26,0
<i>Anocentor nitens</i>	4	23,5
<i>Ctenocephalides felis</i>	6	25,0
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	8	11,5

O conhecimento da prevalência de vetores infectados por rickettsias é importante, pois, como explicam Raoult e Roux (1997), este é um dos parâmetros dos quais depende a prevalência da enfermidade específica por elas produzida.

Como mostra a Tabela 3, existe uma alta prevalência de infecção em lotes de *A. cajennense* por espécies do gênero *Rickettsia* na área estudada, indicando que pode ser até mesmo superior àquela detectada em estudos realizados em áreas endêmicas em Minas Gerais, 2,52% (Cardoso, 2004) e São Paulo, onde foram encontrados 5,5% desses carrapatos infectados (Horta, 2002; Nascimento e Schumaker, 2004), utilizando-se *primers* para amplificação de fragmentos do gene que codifica para a proteína 17kDa. No entanto, como no presente estudo a detecção de DNA rickettsial foi realizada em lotes de ectoparasitos e não em carrapatos individuais como nos trabalhos citados, faz-se necessária a confirmação dessa suposição. Em se tratando de uma espécie de artrópode com grande afinidade para humanos (Labruna et al., 2001) e de abundância reconhecida no

sudeste do país (Phillip et al., 1978; Ereemeeva et al., 1999; Lemos, 2002; Horta, 2002; Nascimento, 2003), esse resultado mostra que *A. cajennense* pode ter grande importância na ecologia de rickettsioses na área estudada, bem como em outras diferentes localidades no Brasil.

Embora o parasitismo em humanos ainda seja questionado para os outros carrapatos - *A. cooperi*, *A. nitens* e *R. sanguineus* -, como mencionado anteriormente, o conhecimento da taxa de infecção é também relevante para o entendimento da epidemiologia das rickettsioses, desde que, participando dos seus ciclos enzoóticos, podem manter organismos patogênicos ou não patogênicos. Para o *A. cooperi*, há a indicação de que a prevalência de infecção na área estudada seja inferior à encontrada por Labruna et al. (2004), que detectaram 47,5% de carrapatos desta espécie infectados com *Rickettsia*, em estudo realizado no Município de Pedreira, Estado de São Paulo, região endêmica para a enfermidade.

Apesar de as pulgas *C. felis* terem, aparentemente, apresentado uma infecção relativamente baixa (25%) por *Rickettsia*, comparada aos 42,5% encontrados por Horta et al. (2004) em pulgas desta espécie, não se pode descartar a possibilidade de sua atuação no desencadeamento de casos humanos na área de estudo, devido a sua prevalência sobre cães domésticos e à baixa especificidade parasitária bem documentada para o ectoparasito em questão, que são também parâmetros relevantes na epidemiologia de enfermidades transmitidas por vetores (Raoult e Roux, 1997).

6.2.2- Detecção de *Ehrlichia*

A amplificação do fragmento do DNA codificante do rRNA 16S foi obtida para dois lotes (1,3% do total de lotes) coletados de cães: um de *R. sanguineus* (1,4% de lotes desta espécie) e outro de *C. felis* (4% de lotes desta espécie), identificados como lotes 1 e 49, respectivamente, no Quadro 1.

A Figura 6 mostra o padrão de bandas, em gel de agarose 1%, dos produtos de amplificação de um fragmento do DNA correspondente ao rRNA 16S, extraído de pulgas e carrapatos coletados na região em estudo.

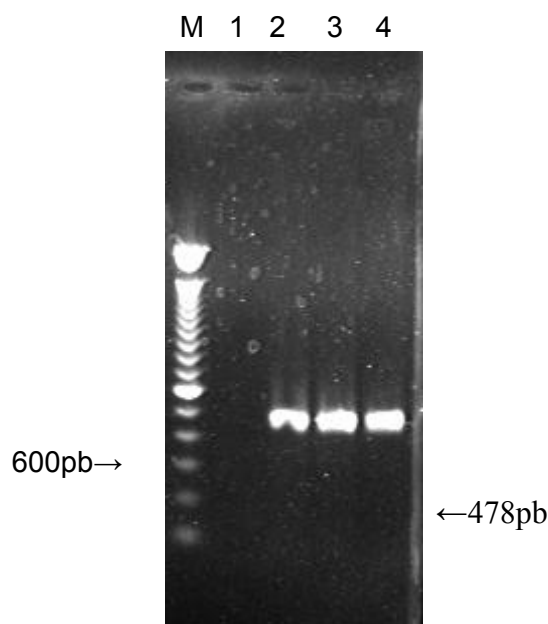


Figura 6- Resultado de PCR para detecção de *Ehrlichia*, em gel de agarose 1%. M: marcador de peso molecular 100 pb; canaleta 1- controle negativo; canaleta 2- controle positivo; canaletas 3 e 4- produtos de amplificação de DNA dos lotes 1 (*R. sanguineus*, adulto) e 49 (*C. felis*, adulto), respectivamente.

É bem documentada a infecção por organismos do gênero *Ehrlichia*, de *R. sanguineus* (Pichotano, 2004), sendo o parasitismo por este artrópode reconhecido como fator de risco para ehrlichiose canina (Botros et al., 1995; Murphy et al., 1998), como demonstrado também por Dagnone et al. (2003), os quais encontraram alto risco (odds ratio = 5,84) de soropositividade para essa enfermidade em cães infestados em relação aos não infestados por *R. sanguineus* no Brasil. Ainda, Galvão et al. (2002) encontraram alta soroprevalência destes animais para a *Ehrlichia chaffeensis* (15,07%) e *Ehrlichia canis* (17,81%), fato preocupante por se tratar de espécies potencialmente patogênicas para humanos.

No presente estudo, a prevalência de infecção de 1,4% (1 lote positivo em 70 coletados), aparentemente baixa destes carrapatos por *Ehrlichia*, pode ter sido causada pela sensibilidade da técnica de PCR, sendo provável a detecção de uma prevalência maior se tivesse sido utilizada a *nested-PCR*, mais sensível em relação à anterior (Pichotano, 2004). É preciso atentar, ainda, para a necessidade de identificação das espécies de *Ehrlichia* circulantes na região, para avaliação do risco de exposição de humanos à ehrlichiose.

A detecção de *Ehrlichia sp.* em *C. felis* é um achado de muita importância, pois sugere que a população na localidade de estudo esteja sujeita à transmissão também desta rickettsiose, dadas as características (especificidade parasitária, ampla distribuição e adaptação a diferentes ambientes) desta pulga, já mencionadas anteriormente, sendo relevante a realização de um melhor levantamento na área, com técnicas mais sensíveis: *nested*-PCR e *Real Time* PCR, da real taxa de infecção desses ectoparasitos e de seus hospedeiros, para avaliação do risco ao que estão expostos os moradores.

6.2.3- Detecção de gêneros relacionados

Utilizando os *primers* RpCs1258n e RpCs877p, foi realizada a amplificação de um fragmento de 381pb do gene que codifica para a proteína citrato sintase para três lotes (2,0%) de ectoparasitos identificados como 13, 130 e 151 no Quadro 1, que se apresentaram negativos à PCR com *primers* 17kD, específicos para o gênero *Rickettsia*. Além desses, os lotes 69, 104 e 131 apresentaram-se positivos para ambos os pares de *primers*.

A Figura 7 mostra o padrão de bandas dos produtos de PCR purificados, utilizando-se os *primers* RpCs1258n e RpCs877p.

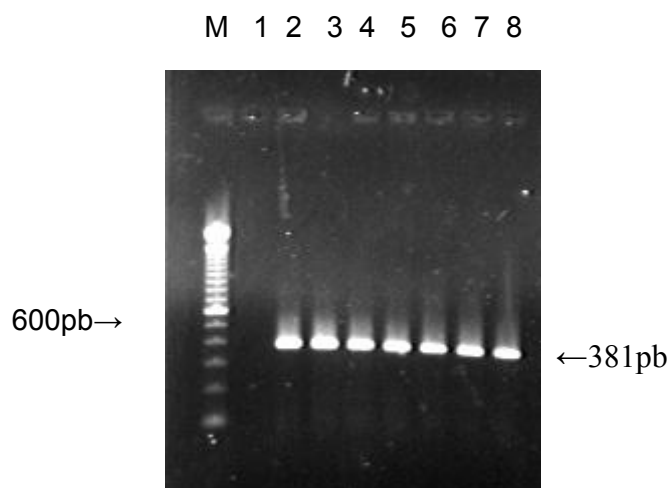


Figura 7- PCR (purificado) de DNA extraído de carrapato e pulga com os *primers* Rpcs1258n e RpCs877 para amplificação de fragmento de DNA que codifica para citrato sintase, em gel de agarose 1%. M: marcador de peso molecular 100 pb; canaleta 1- controle negativo; canaleta 2- controle positivo; canaletas 3 a 8- produtos de amplificação de DNA dos lotes 13 (*R. sanguineus*, ninfa), 69 (*C. felis*, adulto), 104 (*A. cooperi*, ninfa), 130 (*R. sanguineus*, adulto), 131 (*R. sanguineus*, adulto), 151 (*R. sanguineus*, adulto), respectivamente.

A amplificação de seqüências do gene da proteína citrato sintase tem sido utilizada como ótima ferramenta para identificação de espécies de *Rickettsia*, pois apresenta regiões de seqüência variada que permitem a separação entre algumas espécies, flanqueadas por regiões conservadas para as quais *primers* correspondentes podem ser construídos (Roux e Raoult, 1996). Entretanto, utilizando os *primers* RpCs1258n e RpCs877p, Ishikura et al. (2003) detectaram seqüências de organismos que não se agruparam com as de cepas e espécies reconhecidas de *Rickettsia* depositadas em banco de dados, supondo tratar-se de bactérias de outros gêneros. Assim, no presente estudo, a amplificação, a partir desses iniciadores de DNAs de lotes que se apresentaram negativos para *Rickettsia spp.* com os *primers* para o gene que codifica para a proteína 17kDa, pode ter sido causada também pela presença de organismos de gêneros relacionados, que podem estar interferindo com a instalação de rickettsias nesses ectoparasitos, como resultado de uma competição. Seria interessante realizar o seqüenciamento dos fragmentos amplificados para identificação dessas espécies e, conseqüentemente, obtenção de maior conhecimento sobre a dinâmica de

interação entre *Rickettsia*-vetor, seguindo-se um estudo em etapa posterior ao presente trabalho.

6.3- ANÁLISE DE SIMILARIDADE

Foram obtidas as seqüências de oito lotes que se apresentaram positivos para *Rickettsia spp.*, que, sendo comparados com seqüências disponíveis no GenBank, apresentaram os percentuais de similaridades resumidas na Tabela 4.

Tabela 4- Identificação das espécies de *Rickettsia*, segundo as espécies de ectoparasitos de origem. Nova Venécia, Espírito Santo, 2003.

Espécies	Similaridade (bases idênticas/total de bases)	Similaridade (%)	Primer	Origem	Lote
<i>R. felis</i>	225/232	96	17kN	<i>R. sanguineus</i>	88
<i>R. felis</i>	379/383	98	17kD	<i>C. felis</i>	71
<i>R. felis</i>	410/415	98	17kD	<i>C. felis</i>	45
<i>R. prowazekii</i>	190/195	97	17kN	<i>A. cooperi</i>	31
<i>R. typhi</i>	176/183	96			
<i>R. prowazekii</i>	225/230	97	17kN	<i>A. cooperi</i>	104
<i>R. typhi</i>	221/230	96			
<i>R. prowazekii</i>	181/183	98	17kN	<i>A. cooperi</i>	26
<i>R. prowazekii</i>	181/184	98	17kN	<i>C. felis</i>	137
<i>R. typhi</i>	177/184	96			
<i>R. prowazekii</i>	181/183	98	17kN	<i>R. sanguineus</i>	131

Como mostrado na Tabela 4, não foi detectada a presença de *R. rickettsii* na área estudada, embora pela técnica de imunofluorescência indireta com antígeno específico, esta espécie tenha sido diagnosticada em soros sanguíneos de pessoas enfermas, mostrando a possível ocorrência de reações cruzadas entre antígenos para *R. rickettsii* e outras rickettsias do mesmo grupo (*R. felis*), fato recentemente relatado também por outros autores (Raoult et al., 2001), e de grupos diferentes (*R. prowazekii*/*R. typhi*). Segundo La Scola e Raoult (1997), as reações cruzadas entre os dois grupos não são incomuns ao se utilizar ensaio de imunofluorescência.

Seria relevante que os soros referidos acima fossem novamente testados contra antígenos de *R. felis*, confirmando-se, dessa maneira, a possibilidade de se

estar diante, nesta área estudada, de uma patologia de caráter emergente no Brasil - rickettsiose felis. Este fato poderia contribuir para esclarecimentos sobre dados clínico-patológicos da enfermidade e sua real distribuição no Brasil, além de auxiliar na formulação de estratégias de vigilância epidemiológica mais eficazes e condizentes com a necessidade do município.

Os resultados para *R. felis* estão em acordo com aqueles encontrados em estudos recentes no Brasil com *R. sanguineus* (Cardoso, 2004) e *C. felis* (Galvão et al., 2003; Horta, 2004).

No entanto, no que se refere a *R. prowazekii*, espécie pertencente ao grupo do tifo e com a qual várias amostras apresentaram grande similaridade (97 e 98%), como mostrado na Tabela 4, trata-se do primeiro relato, no Brasil, do achado de carrapatos e pulgas infectados por este patógeno, causador do tifo epidêmico e reconhecidamente transmitido por piolhos. Além disto, embora esta *Rickettsia* tenha sido recentemente detectada em carrapatos do gênero *Amblyomma* no México (Sanches-Medina et al., 2004), não existem relatos de detecção em *A. cooperi* e *R. sanguineus*, sendo estes os primeiros achados.

Seria interessante a realização de um estudo com maior número de exemplares destes artrópodes para a confirmação e um melhor entendimento das suas participações na epidemiologia das rickettsioses no município em questão.

6.4- ANÁLISE FILOGENÉTICA

A análise filogenética foi inferida pela comparação de seqüências do gene que codifica a proteína 17 kDa de dois fragmentos de *Rickettsia felis* amplificados no presente estudo (UFV1 e UFV2- Figuras 8 e 9, com 381 e 382 pares de bases, respectivamente) com correspondentes homólogas de outras espécies de *Rickettsia*, depositadas no GenBank: *R. felis* (AF195118), *R. peacockii* (AF260571), *R. rickettsii* (AY281069), *R. parkeri* (U17008), *R. sp cooperi* (Ay362705), *R. honei* (AF027124), *R. montana* (U11017), *R. rhiphcephali* (U11020), *R. amblyommi* (U11013), *R. australis* (M74042), *R. helvetica* (AJ427881), *R. prowazekii* (AY730679), *R. typhi* (AY752489) e *R. canadensis* (AF445381). As seqüências UFV1 e UFV2 foram obtidas pelo sequenciamento dos fragmentos de DNA amplificados dos lotes 71 e 45, respectivamente (Quadro 1).

Como descrito anteriormente, para inferência dos relacionamentos filogenéticos, foram utilizadas três abordagens: máxima parcimônia, máxima verossemelhança e evolução mínima. Esses três métodos têm diferentes critérios, forças e fraquezas (Swofford et al., 1996) e a obtenção de concordância de

resultados entre eles é uma boa estimativa da acurácia de uma topologia particular em refletir a história filogenética (Avisé et al., 1995).

Organizações similares foram encontradas para um dos filogramas obtidos por cada um dos métodos evolução mínima (Figura 8) e máxima parcimônia (Figura 9), pelos quais as seqüências UFV1 e UFV2 apresentaram-se mais proximamente relacionadas com seqüências correspondentes de *Rickettsias* do grupo da febre maculosa, formando, ainda, um sub-grupo/nodo com *R. australis*. Este resultado assemelha-se ao encontrado por outros autores pela comparação de seqüências de diferentes genes, citando-se o do rRNA 16S (Stothard et al., 1995), os das proteínas citrato sintase e rompB (Raoult et al., 2001), bem como o da proteína rompA (Bouyer et al., citado por Morom et al., 2000), sendo esta última abordagem considerada a evidência mais forte para a localização de *R. felis* como um membro do GFM (Morom et al., 2000).

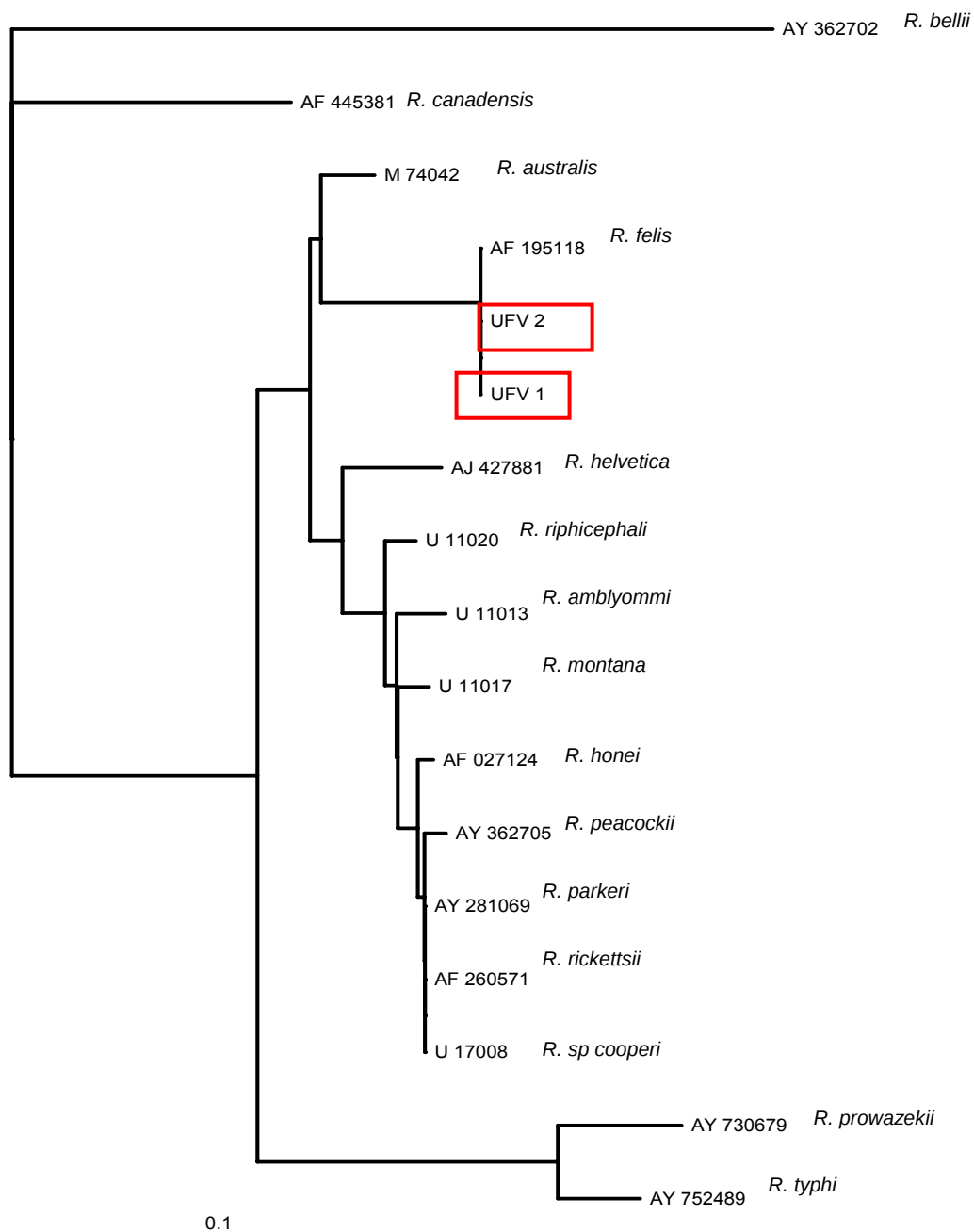
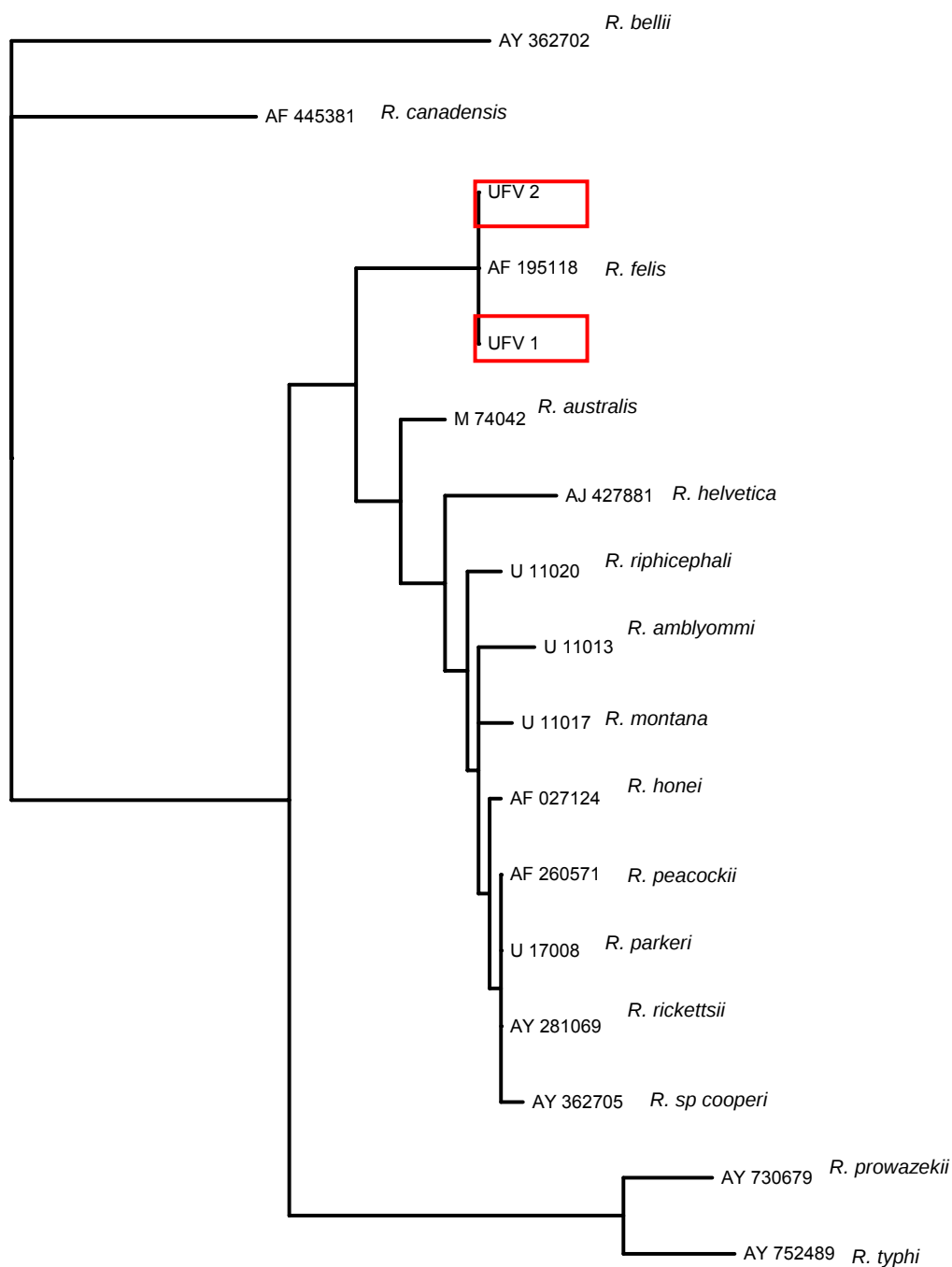


Figura 8 – Filograma baseado em seqüência parcial do gene da proteína 17kDa, mostrando o relacionamento filogenético entre as seqüências de *R. felis* (UFV1 e UFV2) e espécies de *Rickettsia* validadas, com seqüências depositadas no GenBank, pelo método evolução mínima. *R. bellii* foi utilizada como grupo externo.



_1

Figura 9 – Filograma baseado em seqüência parcial do gene da proteína 17kDa, mostrando o relacionamento filogenético entre as seqüências de *R. felis* (UFV1 e UFV2) e espécies de *Rickettsia* validadas, com seqüências depositadas no GenBank, pelo método máxima parcimônia. *R. bellii* foi utilizada como grupo externo.

7- CONCLUSÕES

A partir do presente estudo, realizado em uma área endêmica para febre maculosa brasileira, no município de Nova Venécia, Espírito Santo, foram feitas as seguintes observações:

1- Identificação, entre os artrópodes que poderiam compor a fauna acarológica da referida área, de quatro espécies de carrapatos: *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma cooperi*, *Anocentor nitens*, *Rhipicephalus sanguineus* e uma espécie de pulga, *Ctenocephalides felis*;

2- Predominância do estágio adulto de desenvolvimento para todos os ectoparasitos coletados;

3- Presença de *Rickettsia spp.* circulante entre todas as espécies de ectoparasitos coletados, constatada pela amplificação de fragmentos do gene que codifica para a proteína 17 kDa (434 e 231 pares de bases) por PCR, a uma prevalência de 18,5% dentre os lotes analisados;

4- Conhecimento da prevalência de infecção por *Rickettsia spp.* dos lotes das espécies de ectoparasitos coletados, pela amplificação de fragmentos do gene que codifica para a proteína 17 kDa (434 e 231 pares de bases) por PCR, compreendendo: *Amblyomma cajennense* (21,5%), *Amblyomma cooperi* (26%), *Anocentor nitens* (23,5%), *Rhipicephalus sanguineus* (11,5%) e *Ctenocephalides felis* (25%);

5- Detecção da circulação de *Ehrlichia spp.* entre carrapatos *R. sanguineus* e pulgas *C. felis* pela amplificação de fragmento de 478pb do gene que codifica para o rRNA 16S, por PCR, com as prevalências de 1,5% e 3,4% sobre os lotes, respectivamente;

6- Identificação das espécies de patógenos do gênero *Rickettsia* mantidas pelos artrópodes *R. sanguineus*, *C. felis* e *A. cooperi*, citando-se *Rickettsia felis* e/ou *Rickettsia prowazekii*, pela comparação da sequência parcial do gene que codifica para a proteína 17kDa, com seqüências homólogas disponíveis no GenBank;

7- Inferência filogenética a partir da comparação de seqüência parcial do gene que codifica para a proteína 17kDa de dois fragmentos de *Rickettsia felis* obtidos no presente estudo, que se relacionaram mais proximamente a *Rickettsias* do grupo da febre maculosa, formando um sub-grupo com *R. australis*, pelos métodos evolução mínima e máxima parcimônia; e

8- Registro do primeiro relato de *Rickettsia prowazekii* infectando carrapatos e pulgas no Brasil, e o primeiro relato do encontro desse patógeno com a espécie *Amblyomma cooperi* no mundo, ressaltando-se a necessidade de reprodução para confirmação do achado.

8- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Investigações sobre a interação rickettsia/vetor fornecem um melhor entendimento dos fatores que influenciam a emergência e distribuição de patógenos transmitidos por artrópodes. Estudos sobre ecologia e evolução das relações hospedeiro-patógeno auxiliam no controle de doenças infecciosas transmitidas por vetores.

O presente estudo representa uma contribuição para o aumento do conhecimento da ecologia das rickettsias no Brasil, bem como da história natural de uma rickettsiose emergente - rickettsiose felis.

Demonstrou-se por métodos moleculares neste estudo, a presença de *Rickettsia felis* e *Rickettsia* do grupo do tifo circulante em carrapatos e pulgas da região, com indicativo de envolvimento de animais silvestres na dispersão e infecção destes vetores.

Observa-se que a ocorrência de casos humanos vincula-se à invasão de áreas urbanizadas por capivaras, áreas utilizadas para atividades de plantio e lazer. Isto explicaria o perfil dos casos suspeitos.

Claramente fica evidenciada a necessidade de maiores estudos nas áreas em questão, bem como em outras futuras, abordando o levantamento da fauna ixodídica, espécies de *Rickettsia* e *Ehrlichia* predominantes, hospedeiros vertebrados domésticos e silvestres envolvidos, interação entre atores, sintomas, sinais clínicos e achados laboratoriais relacionados e utilização de antígenos específicos para um correto diagnóstico.

Sugere-se, ainda, a partir deste estudo, a realização do seqüenciamento dos fragmentos amplificados do gene da proteína citrato sintase, para identificação das espécies e, conseqüentemente, obtenção de maior conhecimento sobre a dinâmica de interação entre *Rickettsia*-vetor.

9- BIBLIOGRAFIA

- Allen, Lee-Ann H. Mechanisms of pathogenesis: evasion of killing by polymorphonuclear leukocytes. *Microbes and Infection*, 5:1329–1335. 2003.
- Anakcer, R.L.; Phillip, R.N.; Willians, J.C.; List, R.H.; Mann, R.E. Biochemical and immunochemical analysis of *Rickettsia rickettsii* strains of various degrees of virulence. *Infection and Immunity*, 44:559-564. 1984.
- Adams, J.R.; Schmidtman, E.T.; Azad, A.F. Infection of colonized cat fleas, *Ctenocephalides felis* (Bouche'), with a rickettsia-like micro-organism. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 43:400–409. 1990.
- Anderson, B.E.; Sumner, J.W.; Dawson, J.E.; Tzianabos, T.; Green, C.R.; Olson, J.G.; Fisbein, D.B.; Olsen-Rasmussen, M.; Holloway, B.P.; George, E.H; Azad, A.F. Detection of the etiologic agent of human ehrlichiosis by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30:775-780. 1992.
- Angerami, R.N. Febre Maculosa no Estado de São Paulo, aspectos clínicos e laboratoriais. In: Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses, 1., 2004. Ouro Preto (MG). Anais... Belo Horizonte, 2004.
- Aragão, H.B; Fonseca, F. Notas de Ixodologia. VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 59: 115-129. 1961.
- Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schaffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17):3389-3402. 1997.
- Avise, J.C.; Nelson, W.S. Reply. *Molecular Phylogenetics Evolution*, 4:353–356. 1995.
- Azad, A.F.; Beard, C.B. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. *Emerging Infectious Diseases*, 4(2):179-186. 1998.

- Azad, A.F.; Sacci, J.B. Jr; Nelson, W.M.; Dasch, G.A.; Schmidtman, E.T.; Carl, M. Genetic characterization and transovarial transmission of a typhus-like rickettsia found in cat fleas. *Proceedings of National Academy of Science U S A*, 89(1):43-46. 1992.
- Azad, A.F.; Webb, L.; Car, I.M.; Dasch, G.A. Detection of rickettsiae in arthropod vectors by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Annals of New York Academy of Science*, 590:557-563. 1990.
- Billings, A.N.; Yu, X.; Teel, P.D.; Walker, D.H. Detection of a Spotted Fever Group Rickettsia in *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in South Texas. *Journal of Medical Entomology*, 35(4):474-478. 1998.
- Boostrom, A.; Beier, M.S.; Macaluso, J.A.; Macaluso, K.R.; Sprenger, D.; Hayes, J.; Radulovic, S.; Azad, A.F. Geographic association of *Rickettsia felis*-infected opossums with human murine typhus, Texas. *Emerging Infectious Diseases*, 8(6):549-554. 2002.
- Botros, B.A.; Elmolla, M.S.; Salib, A.W.; Calamaio, C.A.; Dasch, G.A.; Arthur, R.R. Canine ehrlichiosis in Egypt: sero-epidemiological survey. Onderstepoort. *Journal of Veterinary Research*, 62:41-43. 1995.
- Bouyer, D.H.; Stenos, J.; Crocquet-Valdes, P.A. & 7 other authors. *Rickettsia felis*: molecular characterization of a new member of the spotted fever group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51:339-347. 2001.
- Burgdorfer, W. Ecological and epidemiological considerations of Rocky Mountain spotted fever and typhus. In: Walker, D.H. [ed], *Byology of Rickettsial Diseases*. Boca Raton (FL): CRC, Inc., v.1, p. 33-50. 1988.
- Burgdorfer, W.; Hayes, S.F.; Mavros, A.J. Nonpathogenic rickettsiae in *Dermacentor andersoni*: a limiting factor for the distribution of *Rickettsia rickettsii*. In: Burgdorfer, W.; Anacker, R.L. [eds.], *Rickettsiae and rickettsial diseases*. New York: Academic Press, Inc., p. 585-594. 1981.

- Burgdorfer, W.; Brinton, L.P. Mechanisms of transovarial infection of spotted fever rickettsiae in ticks. *Annals of New York Academy of Science*, 266:61-72. 1975.
- Burgdorfer, W. Hemolymph test. *The American Journal of Tropical Medicine and Higiene*, 19:1010-1014. 1970.
- Bustamante, M.E.; Varela, G.. Estúdios de fiebre manchada em México. Hallazgo del *Amblyomma cajennense* naturalmente infectado, en Veracruz. *Revista del Instituto de la Salud Y Enfermedades Tropicales*, 7:75-78. 1946.
- Calic, S.B.; Galvão M.A.M.; Bacellar, F.; Rocha, C.M.B.M.; Mafra, C.L.; Leite, R.C.; Walker, D.H. Human ehrlichioses in Brazil: First suspect cases. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 8(3):259-262. 2004.
- Calic, SB. Sorologia das Rickettsioses. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 13:185-187. 2004.
- Calic, S.B. Comparação do Teste de Weil-Felix com as provas de imunofluorescência indireta e o ensaio imunoenzimático, como método de triagem para a Febre Maculosa. 1996. Dissertação (Mestrado)- Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 1996.
- Cardoso, L. D. Detecção e caracterização de *Rickettsia* spp. circulante em foco inativo periurbano do município de Caratinga – MG. 2004. 84f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular)- Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG. 2004.
- Carter, S.E.; Ravyn, M.D.; Xu, Y.; Johnson, R.C. Molecular typing of the etiologic agent of human granulocytic ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(9):3398-3401. 2001.
- CDC: Center for Deseases Control. Rocky mountain spotted fever: Treatment. Disponível em : <<http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/rmsf/Treatment.htm>> Acesso em : 20/10/05.

- Dagnone, A. S.; de Moraes, H.S.A; Vidotto, M.C.; Jojima, F.S.; Vidotto. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, on tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. *Veterinary Parasitology*, 117:285–290. 2003.
- Dawson, J.E.; Biggie, K.L.; Warner, C.K.; Cookson, K.; Jenkins, S.; Levine, J.F.; Olson JG. Polymerase chain reaction evidence of *Ehrlichia chaffeensis*, an etiologic agent of human ehrlichiosis in dogs from southeast Virginia. *The American Journal of Veterinary Research*, 57:1175-1179. 1996.
- Dawson, J.E.; Stallknecht, D.E.; Howerth, E.W.; Warner, C.; Biggie, K.; Davidson, W.R.; Lockhart, J.M.; Nettles, V.F.; Olson, J.G.; Childs, J.E. Susceptibility of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to infection with *Ehrlichia chaffeensis*, the etiologic agent of human ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 32:2725-2228. 1994.
- Del Guercio, V.M.F.; Rocha, M.M.M.; Melles, H.H.B.; Lima, V.C.L.; Pignatti, M.G. Febre maculosa no município de Pedreira, SP, Brasil. Inquérito sorológico. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 30(1):47-52. 1997.
- Demma, L.J.; Traeger, M.S.; Nicholson, W.L.; Paddock, C.D.; Blau, D.M.; Eremeeva, M.E.; Dasch, G.A.; Levin, M.L.; Singleton, J. Jr; Zaki, S.R.; Cheek, J.E.; Swerdlow, D.L.; McQuiston, J.H. Rocky Mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. *New England Journal of Medicine*, 353(6):587-94. 2005.
- Dias, E.; Martins, A.V. Spotted fever in Brazil. *American Journal of Tropical Medicine*, 19:103-108. 1939.
- Dias, E. Depositários naturais e transmissores da febre maculosa brasileira. *Brasil Médico*, 52:269-278. 1938.
- Dias, E.; Martins, A.V. Aspectos do typho exanthemático em Minas Gerais. *Brasil Médico*, 14:431-441. 1937.
- Dumler, J.S.; Bakken, J.S. Human ehrlichioses: newly recognized infections transmitted by ticks. *Annual Review of Medicine*, 49:201–213. 1998.

- Dumler, J.S.; Bakken, J.S. Ehrlichial diseases of humans: emerging tick-borne infections. *Clinical Infectious Diseases*, 20:1102-1110. 1995.
- Dumler, J.S.; Asanovich, K.M.; Bakken, J.S.; Richter, P.; Kimsey, R.; Madigan, J.E.. Serologic cross-reactions among *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila*, and the human granulocytic ehrlichia. *Journal of Clinical Microbiology*, 33:1098-1103. 1995.
- Dumler, S.J.; Gage, W.R.; Pettis, G.L.; Azad, A.F.; Kuhadja, F.P. Rapid immunoperoxidase demonstration of *R. rickettsii* in fixed cutaneous specimens from patients with Rocky Mountain spotted fever. *American Journal of Clinical Pathology*, 93:410-414. 1990.
- Eremeeva, M.; Dasch, G.A. *Rickettsia*. In: Ledeberg, J. *Encyclopedia of Microbiology*. 2a. ed. New York: Academic Press., v. 4, p. 140-180. 2000.
- Eremeeva, M.; 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*, 32(3):803-810. 1994.
- Fang, R.; Raoult, D. Antigenic classification of *Rickettsia felis* by using monoclonal and polyclonal antibodies. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 221–228, 2003.
- Figueiredo, L.T.M.; Badra, S.J.; Pereira, L.E.; Szabó, M.P.J. Report on ticks collected in the Southeast and Mid-West regions of Brazil: analyzing the potential transmission of tick-borne pathogens to man. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32(6):613-619. 1999.
- Fonseca, F. Validade das espécies e ciclo evolutivo de *Amblyomma striatum* KOCH, (Acarina, Ixodidae). *Memórias do Instituto Butantan*, 9:43-58. 1935.
- Fontes, L.R. Brazilian spotted fever transmitted by *Amblyomma cajennense* (Acari) in Mogi das Cruzes, Brasil: Reported of four human cases and environmental control measures. In: *International Congress of Entomology*, 20, 2000, Brazil. Abstract Book, p. 20-26. 2000.

- Fournier,P.E; Dumler, S.; Greub,G.; Zhang,J.; Wu,Y.; Raoult,D. Gene sequence-based criteria for identification of new *Rickettsia* isolates and description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp. nov. Journal of Clinical Microbiology, 41(12): 5456–5465. 2003.
- Fournier,P.E.; Raoux, V.; Raoult,D. Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae by study of the outer surface protein rOmpA. International Journal of Systematic Bacteriology, 48: 839–849. 1998.
- Gimenez, D.F. Staining Rickettsia in yol-sac cultures. Stain Technology, 39: 135-140. 1964.
- Galvão, M.A.M. Epidemiologia das rickettsioses do gênero *Rickettsia* no Brasil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 13:197-198. 2004.
- Galvão, M.A.M.; Mafra, C.; Chamone, C.B.; Calic, S.B.; Zavala-Velazquez, J.E.; Walker, D.H. Clinical and laboratorial evidence of *Rickettsia felis* infections in Latin America. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 37(3):238-240. 2004.
- 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. Fatal Spotted Fever Rickettsiosis, Minas Gerais, Brazil. Emerging Infectious Diseases, 9(11):1402-1405. 2003.
- Galvão, M.A.M.; Mafra, C.L.; Lamounier,J.A.; Leite, R.C.; Walker, D.H. Rickettsioses Emergentes e Reemergentes em uma Área Endêmica do Estado de Minas Gerais - Brasil. Cadernos de Saúde Pública, 18(6):1593-1597. 2002.
- Galvão, M. A. M.; Chamone, C. B.; Calic, S. B.;Machado, M. C.; Otoni, M. E. A.; Dietze, R.;Moron, C.; Feng, H. M.; Olano, J. P. & Walker, D. H. Serologic evidence of spotted fever group Rickettsia in Novo Cruzeiro Municipality – Minas Gerais State – Brazil. In: Raoult, D.; Brouqui, P., ed. Rickettsial Diseases at the Turn of the Third Millennium. Marseille: Elsevier, p. 240-243. 1999.

- Galvão, M.A.M. Febre maculosa em Minas Gerais: Um estudo sobre a distribuição da doença no Estado e seu comportamento em área de foco periurbano. 1996. 114f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical)- Faculdade de Medicina da UFMG, Belo Horizonte, MG, 1996.
- Galvão M.A.M.; Ribeiro, J.G.L. Descrição clínica de três casos com comprovação sorológica de febre maculosa. Revista Médica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 4(1):48-49. 1994.
- Galvão, M.A.M. Manual de febre maculosa. Belo Horizonte: SES/MG (Informe Técnico). 1989.
- Galvão, M.A.M. A Febre Maculosa Brasileira em Minas Gerais e seus determinantes. 1988. 163f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública)- ENSP/Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1988.
- Galvão, M.A.M. Relato de investigação epidemiológica de um provável surto de rickettsiose em Grão Mogol - Minas Gerais. Cadernos do Internato Rural, Belo Horizonte, 2(12):61-79. 1983.
- Gonçalves, A.J.R.; Lopes, P.F.A.; Melo, J.C.P.; Pereira, A.A.; Pinto, A.M.M.; Lazera, M.S. Rickettsioses: A propósito de quatro casos diagnosticados no Rio de Janeiro de febre maculosa brasileira. Folha Médica, 82:127-134. 1981.
- Guimarães, J.H.; Tucci, E.C.; Barros-Battesti, D.M. Ectoparasitos de importância veterinária. São Paulo: Plêiade, 213p. 2001.
- Hayes, S.F.; Burgdorfer, W. Reactivation of *Rickettsia rickettsii* in *Dermacentor andersoni* ticks: an ultrastructural analysis. Infection and Immunity, 37(2):779-85. 1982.
- Hayes, S.F.; Burgdorfer, W. Sexual transmission of Spotted Fever Group *Rickettsiae* by infected male ticks: Detection of *Rickettsiae* in immature spermatozoa of *Ixodes ricinus*. Infection and Immunity, 27(2):638-642. 1980.
- Higgins, J.A.; Radulovi, S.; Schriefer, M.E.; Azad, A.F. *Rickettsia felis*: a new species of pathogenic *Rickettsia* isolated from cat fleas. Journal of Microbiology, 34:671-674. 1996.

- Higgins J.A.; Sacci, J.B.Jr; Schriefer, M.E.; Endris, R.G.; Azad, A.F. Molecular identification of rickettsia-like microorganisms associated with colonized cat fleas (*Ctenocephalides felis*). *Insect Molecular Biology*, 3(1):27-33. 1994.
- Horta, M.C.; Pinter, A.; Labruna, M.B.; Summ, M.E.L.; Rossi, F.W.; Linardi, P.M.; Schumaker, T.T.S. *Rickettsia felis* em pulgas de gambás *Didelphis aurita* e *Didelphis albiventris* no Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 13:359. 2004.
- Horta, M.C. Pesquisa de infecção por rickettsias do grupo da febre maculosa em humanos, eqüídeos, caninos, e em diferentes estádios de vida de *Amblyomma cajennense*, provenientes de uma área endêmica do Estado de São Paulo. 2002. 72f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses)- Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2002.
- Inayoshi, M.; Naitou, H.; Kawamoni, F.; Masuazawa, T.; Ohashi, N. Characterization of *Ehrlichia* species from *Ixodes ovatus* ticks at the foot of MT Feji, Japan. *Microbiology and Immunology*, 48(10):737-745. 2004.
- Inokuma, H.; Brouqui, P.; Drancourt, M.; Raoult, D. Citrate synthase gene sequence: a new tool for phylogenetic analysis and identification of *Ehrlichia*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(9):3031-3039. 2001.
- Ishikura, M. Phylogenetic analysis of spotted fever group *Rickettsia* based on gltA, 17fDa, and rompa genes amplified by nested PCR from ticks in Japan. *Microbiology Immunology*, 47(11):823-832. 2003.
- Jennifer, L.M.; Stephen, K.T. Treatment and prevention of rickettsial and ehrlichial infections. *Dermatologic Therapy*, 17:499–504. 2004.
- Kelly, P.J.; Meads, N.T.A.; Fournier, P.E.; Raoult, D. *Rickettsia felis*, *Bartonella henselae*, and *B. clarridgeiae*, New Zealand. *Emerging Infectious Diseases*, 10(5):968. 2004.

- Kocan, A.; Levesque, G.C.; Whitworth, L. C.; Murphy, G.L.; Ewing, S.A.; Barker, R. W. Naturally Occurring *Ehrlichia chaffeensis* Infection in coyotes from Oklahoma. *Emerging Infectious Diseases*, 6(5):477-480. 2000.
- Labruna, M.B.; Whitworth, T.; Horta, M.C.; Bouyer, D.H.; McBride, J.W.; Pinter, A.; Popov, V.; Gennari, S.M.; Walker, D.H. *Rickettsia species* infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the State of Sao Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(1):90-98. 2004.
- Labruna, M.B. Carta Acarológica. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 13: 199-201. 2004a.
- Labruna, M.B. Biologia-ecologia de *Rhipicephalus sanguineus*. (Acarí: Ixodidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 13:123-124. 2004b.
- Labruna, M.B.; Kerber, C.E.; Ferreira, F.; Faccini, J.L.; De Waal, D.T.; Gennari, S.M. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the State of São Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 97:1-14. 2001.
- Labruna, M.B. Aspectos da biologia e epidemiologia dos carrapatos de equinos no Estado de São Paulo. 2000. Tese (Doutorado)- Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2000.
- La Scola, B.; Raoult, D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *Journal Clinical Microbiology*, 35(11):2715-2727. 1997.
- Lemos, E.R.S. Disease in Brazil. *Virus Reviews and Research*, 7:7-16. 2002.
- Lemos, E.R.; Alvarenga, F.B.; Cintra, M.L.; Ramos, M.C.; Paddock, C.D.; Ferebee, T.; Zaki, S.R.; Ferreira, F.C.; Ravafnani, R.C.; Machado, R.D.; Guimarães, M.A.; Coura, J.R. Spotted fever in Brazil: a seroepidemiological study and description of clinical cases in an endemic area in the State of São Paulo. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 65:329-334. 2001.

- Lemos, E.R.; Machado, R.D.; Pires, F.D.A; 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*, 92(4):477-481. 1997a.
- Lemos, E.R.S; Machado, R.D.; Coura, J.R.; Guimarães, M.A.M.; Serra-Freire, N.N; Gazeta, G.S. Epidemiological aspects of the Brazilian spotted fever: seasonal activity of ticks collected in a endemic area in São Paulo, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 30 (3):181-185. 1997b.
- Lemos, E.R.S; Machado, R.D.; Coura, J.R.; Guimarães, M.A.M.; Chagas, N. Epidemiological aspects of the Brazilian spotted fever: serological survey of dogs and horses in a endemic area in the state of São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 38(6):427-430. 1996a.
- Lemos, E.R.; Melles, H.H.; Colombo, S.; Machado, R.D.; Coura, J.R.; Guimarães, R.A.; Sanseverino, S.R.; Moura, A. Primary isolation of spotted fever in the group *rickettsiae* from *Amblyoma cooperi* collected from *Hydrochaeris hydrochaeris* in Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91:273-275. 1996b.
- Lima, V.L.C.; Figueiredo, A.C.; Pignatti, M.G.; Modolo, M. Febre Maculosa no Município de Pedreira, Estado de São Paulo, Brasil. Relação entre ocorrência de casos e parasitismo humano por Ixodídeos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 28:135-137. 1995.
- Li, H.; Walker, D.H. Characterization of rickettsial attachment to host cells by flow cytometry. *Infection and Immunity*, 2030-2035. 1992.
- Madeira, A.; Wiesbrich, J. Surto de Febre Maculosa no Estado de Santa Catarina. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 13(1):364. 2004.
- Macaluso, K.R.; Mulenga, A.; Sinser, J.A.; Azad, A.F. Differential expression of genes in Uninfected and *Rickettsia* infected *Dermacentor variabilis* Ticks as Assessed by Differential-Display PCR. *Infection and immunity*, 71(11):6165-6170. 2003a.
- Macaluso, K.R.; Mulenga, A.; Sinser, J.A.; Azad, A.F. Interactions between *Rickettsiae* and *Dermacentor variabilis* ticks. Analysis of Gene Expression. *Annals of New York Academy of Science*, 990:568-572. 2003b.

- Macaluso, K.R.; Soneshine, D.E.; Ceraul, S.M.; Azad, A.F. Rickettsial infection in *Dermacentor variabilis* (Acari:Ixodidae) inhibits transovarial transmission of a second Rickettsia. *Journal Medical Entomology*, 39(6):809-813. 2002.
- McDade, J.E; Newhouse, V.F. Natural history of *Rickettsia rickettsii*. *Annual Review of Microbiology*, 40:187-309. 1986.
- Mafrá, C.L.; Almada, G.L.; Zago, A.M.; Freitas, M A.; Souza, C.E.; Wada, M.Y.; Santalucia, M.; Calic, S.B., Galvão, M.A.M. Capivara como agente dispersor da Febre Maculosa (?). Considerações em um surto na cidade de Nova Venécia, Estado de Espírito Santo, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 13(1):360. 2004.
- Magalhães, O. Contribuição ao Conhecimento das doenças do grupo exantemático. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional. 1952.
- Magalhães, O.; Moreira, J.A. Typho exanthemático em Minas Gerais. *Epidemiologia. Brasil Médico* 37:882-891. 1939.
- Magnarelli, L.A.; Anderson, J.F.; Philip, R.N.; Burgdorfer, W.; Casper, E.A. Endemicity of spotted fever group rickettsiae in Connecticut. *The American Journal of Tropical Medicine and Higiene*, 30:715-721. 1981.
- Mancini, D. A. P. A ocorrência de riquetsioses do grupo *Rickettsia rickettsii*. *Revista de Saúde Publica*, 17:493-499. 1983.
- Mariotte, C.O.; Bustamante, M.A.; Varella. G. Hallazgo de *Rhipicephalus sanguineus* Latreile infectado naturalmente com fiebre manchada de las montañas rocosas en Sonora, México. *Revista del Instituto de la Salud Y Enfermedades Tropicales*, 5:297-300. 1944.
- Massung, R.F.; Slater, K.G. Comparison of PCR assays for detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*. *Journal Clinical Microbiology*, 41(2):717-722. 2003.
- Márquez, F.J.; Muniain, M. A.; Pérez, J. M.; Pachón, J Presence of *Rickettsia felis* in the Cat Flea from Southwestern Europe 1. *Emerging Infectious Diseases*, 8(1):89-91. 2002.

- Maxey, E. E. Some observations on the so-called spotted fever of Idaho. *Medical Sentinel*, 7(81):433-438. 1899.
- Máximo, Bernabeu-Wittel; Ferran Segura-Porta. Enfermedades producidas por *Rickettsia*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 23(3):163-172. 2005.
- Melles, H.H.; Colombo, S.; Lemos, E.R.S. Isolamento de *Rickettsia* em cultura de célula Vero. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32 (5):469-473. 1999.
- Melles, H.H.; Colombo, S.; Siva, M.V. Febre Maculosa: isolamento de *Rickettsia* em amostra de biopsia de pele. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 34(1):37-41. 1992.
- Monteiro, J.L.; Fonseca, F. Typho exanthemático de São Paulo-Novas experiências sobre transmissão experimental por carrapatos (*Boophilus microplus* e *Amblyomma cajennense*). *Memórias do Instituto Butantan*, 7:33-40. 1932.
- Moreira, J.A.; Magalhães, O. Typho exanthemático de Minas Gerais (7 a comunicação). *Brasil Médico*, 51:388-392. 1937.
- Moron, C.G.; Bouyer, D. H.; Yu, Xue-Jie; Foil, L. D.; Crocquet-Valdes, P.; Walker, D.H. Phylogenetic analysis of the rompb genes of *Rickettsia felis* and *Rickettsia prowazekii* european-human and north American flying-squirrel strains. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 62(5):598–603. 2000.
- Mulenga, K.R.; Macaluso J.A.; Azad, A.F. Dynamics of *Rickettsia*-tick interactions: identification and characterization of differentially expressed mRNAs in uninfected and infected *Dermacentor variabilis*. *Insect Molecular Biology*, 12 (2):185-193. 2003.
- Murphy, G.L.; Ewing, S.A.; Whitworth, L.C.; Fox, J.C.; Kocan, A.A. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. *Veterinary Parasitology*, 79:325–339. 1998.

- Nascimento, E.M.M.; Schumaker, T.T.S. Isolamento e Identificação de Rickettsias no Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 13:1956-196. 2004.
- Nascimento, E.M.M. Isolamento e detecção molecular de *Rickettsia* do grupo da febre maculosa, a partir de *Amblyomma cajennense* (Fabricius 1987) e espécimes biológicos humanos, procedentes de áreas endêmicas do Estado de São Paulo. 2003. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, 2003.
- Niebylski, M. L.; Peacock, M. G.; Schwan, T. G. Lethal effect of *Rickettsia rickettsii* on its tick vector (*Dermacentor Andersoni*). *Applied and Environmental microbiology*, 65(2):773–778. 1999.
- Olano, J.P., Hogrefe, W.; Seaton, B.; Walker, D.H. Clinical Manifestations, Epidemiology, and Laboratory Diagnosis of Human Monocytotropic Ehrlichiosis in a Commercial Laboratory Setting. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 10(5):891–896. 2003.
- Oliveira, R.P. Biologia e controle de *Amblyomma cajennense*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 13:118-122. 2004.
- Oliveira, R.P.; Galvão M.A.M.; Mafra, C.L.; Walker, D.H. *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides* spp. Fleas, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 8(3):317-319. 2002.
- Park, J.; Heo, E.; Choi, K.; Dumler, J.S.; Chae, J. Detection of Antibodies to *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis* Antigens in Sera of Korean Patients by Western Immunoblotting and Indirect Immunofluorescence Assays. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10(6):1059–1064. 2003a.
- Park, J.; Choi, K.; Grab, D. J.; Dumler, J.S. Divergent interactions of *Ehrlichia chaffeensis*- and *Anaplasma phagocytophilum*-infected leukocytes with endothelial cell barriers. *Infection and Immunity*, 71:6728–6733. 2003b.
- Parola, P.; Raoult, D. Tick-borne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Europe. Clinical Infectious Disease*, 32:897-928. 2001.

- Parola, P.; Miller, R.S.; McDaniel, P.; Telford, S.R.; Rolain, Jean-Marc; Wongsrichanalai, C.; Raoult, D. Emerging Rickettsioses of the Thai-Myanmar Border 1. *Emerging Infectious Diseases*, 9 (5):592-595. 2003.
- Perez, J.M.; Martinez, D.; Debus, A.; Sheikboudou, C.; Bensaid, A. Detection of genomic polymorphisms among isolates of the intracellular bacterium *Cowdria ruminantium* by random amplified polymorphic DNA and Southern blotting. *FEMS Microbiological Letters*, 154(1):73-79. 1997.
- Perez, M.; Rikihisa, Y.; Wen, B. *Ehrlichia canis*-Like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(9):2133–2139. 1996.
- Phillip, R.N.; Casper, E.A.; Burgdorfer, W.; Gerloff, R.K.; Hughes, L.E.; Bell, E.J. Serologic typing of rickettsiae of the spotted fever group by microimmunofluorescence. *The Journal of Immunology*, 121(5):1961-1968. 1978.
- Pinter, A. Aspectos epidemiológicos da Febre maculosa em uma área endêmica no município de Mogi das Cruzes (SP) e estudo em laboratório do ciclo de vida do vetor *Amblyomma aureolatum*. 2003. Dissertação (Mestrado)- Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2003.
- Pichotano, M.E.; Varzim, F.L.S.B.; Silva, M.A.M.L. Ocorrência de Ehrlichiose canina. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 13:356. 2004.
- Piza, J.T. 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-II. Studies on the biological survival mechanism of *Rickettsia rickettsii*. *American Journal of Hygiene*, 60:292-319. 1954.
- Radulovic, S.; Feng, H.M.; Croquet-Valdes, P.; Morovic, M.; Dzalalija, B.; Walker, D.H. Antigen – capture enzyme immunoassay: a comparison with other methods for detection of spotted fever group *Rickettsia* in ticks. *The American Journal of Tropical Medicine and Higiene*, 5(3):359-364. 1994.

- Raoult, D.; La Scola B.; Enea, M.; Fournier, P.E.; Raoux, V.; Fenollar, F.; Galvão, M. A.; de Lamballerie, A. A flea-associated *Rickettsia* pathogenic for humans. *Emerging Infectious Diseases*, 7(1):73-81. 2001.
- Raoult, D.; Raoux, V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clinical Microbiology Review*, 10:694-719. 1997.
- Ricketts, H.T. Some aspects of Rocky Mountain Spotted Fever as shown by recent investigations. *Medical Record*. 76:843-855. 1909.
- Reddy, G.R.; Sulsona, C.R.; Harrison, R.H.; Mahan, S.M.; Burrige, M.J.; Barbet, A.F. Sequence heterogeneity of the major antigenic protein 1 genes from *Cowdria ruminantium* isolates from different geographical areas. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 3(4):417-422. 1996.
- Regnery, R.L.; Spruill, C.L.; Plikaytis, B.D. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *Journal of Bacteriology*, 173(5):1576-1589. 1991.
- Rolain, Jean-Marc; Franc, M.; Davoust, B.; Raoult, D. Molecular detection of *Bartonella quintana*, *B. koehlerae*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *Rickettsia felis*, and *Wolbachia pipientis* in cat fleas, France. *Emerging Infectious Diseases*, 9(3):338-342. 2003.
- Roux, V.; Raoult, D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (ompB). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50:1449-1455. 2000.
- Roux, V. Phylogenetic analysis and taxonomic relationships among the genus *Rickettsia*. In Raoult, D.; Brouqui, P. (ed.), *Rickettsiae and rickettsial diseases at the turn of the third millennium*. Marseille: Elsevier, p. 52-66. 1999.
- Roux, V.; Rydkina, E.; Ereemeeva, M.; Raoult, D. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the *Rickettsiae*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47:252-261. 1996.

- Roux, V.; Raoult, D. Phylogenetic analysis of the genus *Rickettsia* by 16S rDNA sequencing. *Research in Microbiology*, 146:385–396. 1995.
- Rozental, T.; Bustamante, M.C.; Amorim, M.; Serra-Freire, N.M.; Lemos, E.R. Evidence of spotted fever group rickettsiae in State of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 44(3):155-158. 2002.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology*, 24:104-108. 1977.
- Sanches-Medina, A; Donald, H.B.; Mafra, C.; Zavala-Castro, J.; Whitworth, T.; Popov, V.L.; Fernandes-Salas, I.; Walker, D.H. Discovery of a typhus group *Rickettsia* in *Amblyomma* ticks in the State of Nuevo Leon, México. International Conference on Rickettsiae and Rickettsial Diseases, 4., 2005. Logrono, Espanha. *Annales...* Logrono, Espanha. 2005.
- Schoeler, G. B.; Morón, C.; Richards, A.; Blair, P. J.; Olson, J. G. Human Spotted Fever Rickettsial Infections. *Emerging Infectious Diseases*, 11(4):622-624. 2005.
- Schriefer, M.E.; Sacci Jr, J.B.; Dumler, S.; Bullen, M.G.; Azad, A.F. Identification of a novel rickettsial infection in a patient diagnosed with murine typhus. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(4):949-954. 1994.
- Sekeyová, Z.; Fournier, P.E.; Rháček, J.; Raoult, D. Characterization of a new Spotted Fever Group *Rickettsia* detected in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) collected in Slovakia. *Journal of Medical Entomology*, 37(5):707-713. 2000.
- Serra-Freire, N.M. Tick paralysis in Brazil. *Tropical Animal Health Production*, 15:124-126. 1982.
- Sexton, D.J.; Kanj, S.S.; Wilson, K.; Corey, G.R.; Hegarty, B.C.; Levy, M.G.; Breitschwerdt, E.B. The use of a polymerase chain reaction as a diagnostic test for Rocky Mountain spotted fever. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 50(1):59-63. 1994.

- Shaw, S.E.; Kenny, M.J.; Tasker, S.; Birtles, R.J. Pathogen carriage by the cat flea *Ctenocephalides felis* (Bouché) in the United Kingdom. *Veterinary Microbiology*, 102:183–188. 2004.
- Silva, J.S.; Galvão, M.A.M. Epidemiologia das Rickettsioses do Gênero *Rickettsia* No Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 13: 197-198. 2004.
- Silverman, D. J. *Rickettsia rickettsii*-induced cellular injury of human vascular endothelium in vitro. *Infection and Immunity*, 44(3):545-553. 1984.
- Simser, J. A.; Palmer, A.T.; Fingerle, V.; Wilske, B.; Kurtti, T. J.; Munderloh, U.G. *Rickettsia monacensis* sp. nov., a spotted fever group *Rickettsia*, from ticks (*Ixodes ricinus*) collected in a European City Park. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9):4559–4566. 2002.
- Souza, S.S.L. et al. Aspectos ecológicos da febre maculosa: variação sazonal da fase não parasitária de Ixodídeos na mata ciliar da região de Campinas. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 21., Rio de Janeiro. 2001.
- Souza, M. A. A.; Paula, A.B.; Primo, J.D.A.; Ramos, E.P.; Magalhães, S.A.; Perpétuo, A.C. Febre Maculosa brasileira em Virginópolis - Minas Gerais. In: Congresso Brasileiro de Infectologia, 6, 1991. Salvador. Anais... Salvador: s. n, p. 60. 1991.
- Souza, A. P. Variação populacional dos principais ixodídeos parasitas de bovinos e eqüinos em diferentes condições de manejo, nos municípios de Piracambi e Itaguaí no Estado do Rio de Janeiro. 1990. 81f. Tese (Doutorado)- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1990.
- Stothard, D.R.; Clark, J.B.; Fuerst, P. Ancestral divergence of *Rickettsia bellii* from the spotted fever and typhus groups of *Rickettsia* and antiquity of the genus *Rickettsia*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(4):798-804.
- Stothard, D.R.; Fuerst, P.A. Evolutionary analysis of the spotted fever and typhus groups of rickettsia using 16S rRNA gene sequences. *Systematic and Applied Microbiology*, 18: 52–61. 1995.

Swofford, D.L.; Olsen, G. J.; Wadell, P. J.; Hillis, D. M. Phylogenetic inference. In D. M. Hillis, C. Moritz, and B. K. Mable (ed.), Molecular systematics. Sinauer, Sunderland, Mass. 1996.

Tamí, I. del Carmen; Tamí-Maury, I.M . Identificación morfológica de *Ehrlichia* sp. en las plaquetas de pacientes con infección por virus de la inmunodeficiencia humana, en Venezuela. Panamerican Journal of Public Health, 16(5):345-349. 2004.

Travassos, J.; Vallejo, A. Comportamento de alguns cavídeos (*Cavia aperea* e *Hydrochoerus capybara*) às inoculações experimentais do Vírus da Febre Maculosa. Possibilidade desses representam o papel de depositários transitórios dos vírus da natureza. Memórias do Instituto Butantan, 15:73-86. 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 Butantan, 15:87-90. 1942b.

Valbuena, G.; Feng, H.M.; Walker, D.H. Mechanisms of immunity against Rickettsiae. New perspectives and opportunities offered by unusual intracellular parasites. Microbes and infection, 4:625–633. 2002.

Vianna, M.C.B. Pesquisa de infecção por rickettsias 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. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. 2002.

Walker, D.H. Clinical, epidemiologic and control perspectives of rickettsioses and erlichioses in the Americas... In: Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses, 1., 2004. Ouro Preto (MG). Anais...Belo Horizonte, 2004.

Walker, D.H. Rocky Mountain Spotted Fever: A disease in need of microbiological concern. Clinical Microbiology Reviews, 2(3):227-240. 1989.

Walker, DH. Rickettsial diseases: an update. Monographs in Pathology, 23:188-204. 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*, 28(3):530-534. 1990.
- Wilson, L. B.; W. M. Chowning. Studies in Pox-plasmosis hominis ("spotted fever" or "tick fever" of the Rocky Mountains). *Journal of Infectious Diseases*, 1:31-57. 1904.
- Zavala-Velázquez, J. E.; Ruiz-Sosa, J.A.; Sánchez-Elias, R.A.; Becerra-Carmona, G.; Walker, D.H. *Rickettsia felis rickettsiosis* in Yucatán. *The Lancet*, 356(23):1079. 2000.
- Zhang, Jian-zhi; Sinha, M.; Luxon, B.A; Yu, Xue-jie, Survival strategy of obligately intracellular *Ehrlichia chaffeensis*: novel modulation of immune response and host cell cycles. *Infection And Immunity*, 72(1):498–507. 2004.
- Zhang, J.Z.; Fan, M.Y.; Bi, D.Z.; Cui, W.F.; Han, I.F. Genotypic identification of three new strains of spotted fever group *Rickettsia* isolated in China. *Acta Virologica*, 40:215-219. 1996.
- Zhang, Xiao-Feng; Zhang, Jian-Zhi; Long, S.W.; Ruble, R. P.; Yu, Xue-Jie. Experimental *Ehrlichia chaffeensis* infection in beagles. *Journal of Medical Microbiology*, 52:1021–1026. 1995.

10- ANEXO

Alinhamento Múltiplo de Sequências pelo Clustalw 1.82:

```

AY730679 ACAAGCTTGTAAATGGTCAGAGTGGTATGAACAAACAAGGTACCGGTACACTTCTTGGTGG60
AY752489 ACAAGCATGTAATGGTCCGGGTGGTATGAACAAACAAGGACTGGAACACTTCTTGGTGG60
UFV2 ACAAGCCTGTAACGGACCAGGCGGTATGAATAAACAAGGTACGGGAACACTTCTTGGCGG60
AF195118 ACAAGCCTGTAACGGACCAGGCGGTATGAATAAACAAGGTACGGGAACACTTCTTGGCGG59
UFV1 ACAAGCCTGTAACGGACCAGGCGGTATGAATAAACAAGGTACGGGAACACTTCTTGGCGG60
AF260571 ACAAGCCTGTAACGGTCCGGGCGGTATGAATAAACAAGGTACAGGAACACTTCTTGGCGG60
U17008 ACAAGCCTGTAACGGTCCGGGCGGTATGAATAAACAAGGTACAGGAACACTTCTTGGCGG60
AY281069 ACAAGCCTGTAACGGTCCGGGCGGTATGAATAAACAAGGTACAGGAACACTTCTTGGCGG60
AY362705 ACAAGCCTGTAACGGTCCGGGCGGTATGAATAAACAAGGTACAGGAACACTTCTTGGCGG60
AF027124 ACAAGCCTGTAACGGTCCGGGCGGTATGAATAAACAAGGTACAGGAACACTTCTTGGCGG60
U11013 ACAAGCCTGTAACGGTCCGGGCGGTATGAATAAACAAGGTACAGGAACACTTCTTGGCGG60
U11017 ACAAGCCTGTAACGGTCCGGGCGGTATGAATAAACAAGGTACAGGCACACTTCTTGGCGG60
U11020 ACAAGCCTGTAACGGTCCGGGCGGTATGAATAAACAAGGTACAGGAACACTTCTTGGCGG60
AJ427881 ACAAGCCTGTAACGGTCCGGGTGGTATGAATAAACAAGGTACAGGAACACTTCTTGGCGG60
M74042 ACAAGCCTGTAACAGTCCGGGCGGTATGAATAAACAAGGTACAGGAACACTTCTTGGCGG60
AF445381 ACAAGCATGTACCGGTTCAAGGCGGTATGAATAAGCAAGGTAGCGGTACGCTAATTGGCGG60
AY362702 GCAAGCATGCCAAGGTCCGGGCGGCATGAATAAGCAAGGTAGTGGTACGCTAATCGGTGG60

AY730679 CGCAGGAGGTGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTCAAGGTAAAGGACAACCTTGTGCGGAGT120
AY752489 CGCCGGCGGTGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTCACGGTAAAGGACAACCTTGTGCGGAGT120
UFV2 TGCCGGCGGTGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGCAAGGGCAAAGGACAGCTTGTGCGGAGT120
AF195118 TGCCGGCGGTGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGCAAGGGCAAAGGACAGCTTGTGCGGAGT119
UFV1 TGCCGGCGGTGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGCAAGGGCAAAGGACAGCTTGTGCGGAGT120
AF260571 TGCTGGCGGCGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTAAGGGCAAAGGACAGCTTGTGCGGAGT120
U17008 TGCTGGCGGCGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTAAGGGCAAAGGACAGCTTGTGCGGAGT120
AY281069 TGCTGGCGGCGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTAAGGGCAAAGGACAGCTTGTGCGGAGT120
AY362705 TGCTGGCGGCGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTAAGGGCAAAGGACAGCTTGTGCGGAGT120
AF027124 TGCTGGCGGCGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTAAGGGCAAAGGACAGCTTGTGCGGAGT120
U11013 TGCTGGCGGCGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTAAGGGCAAAGGACAGCTTGTGCGGAGT120
U11017 TGCTGGCGGCGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTAAGGGCAAAGGACAGCTTGTGCGGAGT120
U11020 TGCTGGAGGTGCATTACTTGGTTCTCAATTCGGTAAGGGCAAAGGACAGCTTGTGCGGAGT120
AJ427881 TGCCGGCGGTGCATTACTTGGTTCTCAATTTGGTAAGGTAAAGGGCAACCTTGTGCGGAGT120
M74042 TGCCGGCGGTGCATTACTTGGTTCTCAGTTCGGTAAGGGCAAAGGACAGCTTGTGCGGAGT120
AF445381 TACGGCAGGTGCGTTACTGGGTTCCAGTTCGGTAAGGGTAAAGGACAGCTTATTGCGGAGT120
AY362702 AACAGCTGGTGCATTACTAGGTTCTCAATTTGGTGGTGGTACAGGGCGTCTTGTGCGGT120

AY730679 AGGTGTAGGCGCATTACTTGGGGCAGTTCTTGGTGGACAAATCGGCGCAAGTATGGATGA180
AY752489 AGGTGTAGGCGCATTACTTGGGGCAGTTCTTGGTGGACAAATCGGTGCAAGTATGGATGA180
UFV2 AGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTTCTTGGTGGACAAATAGGTGCAGGTATGGATGA180
AF195118 AGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTTCTTGGTGGACAAATAGGTGCAGGTATGGATGA179
UFV1 AGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTTCTTGGTGGACAAATAGGTGCAGGTATGGATGA180
AF260571 AGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTTCTTGGTGGACAAATCGGTGCAGGTATGGATGA180
U17008 AGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTTCTTGGTGGACAAATCGGTGCAGGTATGGATGA180
AY281069 AGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTTCTTGGTGGACAAATCGGTGCAGGTATGGATGA180
AY362705 AGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTTCTTGGTGGACAAATCGGTGCAGGTATGGATGA180
AF027124 AGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTTCTTGGTGGACAAATCGGTGCAGGTATGGATGA180
U11013 AGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTTCTTGGTGGACAAATCGGTGCAGGTATGGATGA180
U11017 AGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTTCTTGGTGGACAAATCGGTGCAGGTATGGATGA180
U11020 AGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTTCTTGGTGGACAAATCGGTGCAGGTATGGATGA180
AJ427881 AGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTTCTTGGCGGGCAAATCGGTGCAGGTATGGATGA180
M74042 AGGTGTAGGTGCATTACTTGGAGCAGTGCTTGGTGGACAAATAGGTGCAGGTATGGATGA180
AF445381 AGGTGCTGGAGCATTACTAGGTGCTATCCTTGGTAATCAAATTGGTGCAGGCATGGACGA180
AY362702 AGGAGCAGGTGCATTACTTGGTGAATCCTTGGTAACCAAATTGGTGCAGGTATGGATGA180

```

AY730679	GCAGGATAGAAGACTTCTAGAACTAACATCACAAAGAGCTTTAGAATCTGCACCTAGCGG240
AY752489	GCAGGATAGAAAACCTTCTAGAACTAACATCACAAAGAGCTTTAGAATCTGCTCCTAGCGG240
UFV2	GCAGGATAGAAGACTTGCTGAACTCACTTCACAAAGAGCTTTAGAAGCAACACCTAGCGG240
AF195118	GCAGGATAGAAGACTTGCTGAACTCACTTCACAAAGAGCTTTAGAAGCAACACCTAGCGG239
UFV1	GCAGGATAGAAGACTTGCTGAACTCACTTCACAAAGAGCTTTAGAAGCAACACCTAGCGG240
AF260571	ACAGGATAGAAGACTTGCAGAGCTTACCTCACAGAGAGCTTTAGAAACAGCTCCTAGTGG240
U7008	ACAGGATAGAAGACTTGCAGAGCTTACCTCACAGAGAGCTTTAGAAACAGCTCCTAGTGG240
AY281069	ACAGGATAGAAGACTTGCAGAGCTTACCTCACAGAGAGCTTTAGAAACAGCTCCTAGTGG240
AY362705	ACAGGATAGAAGACTTGCAGAGCTTACCTCACAGAGAGCTTTAGAAACAGCTCCTAGTGG240
AF027124	GCAGGATAGAAGACTTGCAGAGCTTACCTCACAGAGAGCTTTAGAAACAGCTCCTAGTGG240
U11013	GCAGGATAGAAGACTTGCAGAGCTTACCTCACAGAGAGCTTTAGAAACAGCTCCTAGCGG240
U11017	GCAGGATAGAAGACTTGCAGAGCTTACCTCACAGAGAGCTTTAGAAACAGCTCCTAGCGG240
U11020	GCAGGATAGAAGACTTGCAGAGCTTACCTCACAGAGAGCTTTAGAAACAGCTCCTAGCGG240
AJ427881	GCAGGATAGAAGACTTGCAGAGCTTACCTCACAGAGAGCTTTAGAAGCAGCTCCTAGCGG240
M74042	GCAGGATAGAAGACTTGCAGAGCTCACCTCACAAAGAGCTTTAGAAACAGCTCCTAGCGG240
AF445381	GCAGGATAGAAGACTTGCAGAACTCACCTCGCAAAGAGCGTTAGAAACAACACCTAGCGG240
AY362702	ACAAGATAGAAAACCTTGCAGAGCTTACCTCCCAAAGAGCTTTAGAAGCTGCACCAAGTGG240
AY730679	TAGTAACATAGAATGGCGCAATCCAGATAACGGCAATCATGGTTACGTACACCTAATAA300
AY752489	TAGTAACATAGAATGGCGCAATCCAGATAATGGCAATCATGGTTACGTAAACACCTAATAA300
UFV2	CACTAGCGTAGAATGGCGTAATCCGGATAACGGTAATCATGGTTACGTAAACACCTAATAA300
AF195118	CACTAGCGTAGAATGGCGTAATCCGGATAACGGTAATCATGGTTACGTAAACACCTAATAA299
UFV1	CACTAGCGTAGAATGGCGTAATCCGGATAACGGTAATCATGGTTACGTAAACACCTAATAA300
AF260571	TAGTAACGTAGAATGGCGTAATCCGGATAACGGCAATTACGGTTACGTAAACACCTAATAA300
U17008	TAGTAACGTAGAATGGCGTAATCCGGATAACGGCAATTACGGTTACGTAAACACCTAATAA300
AY281069	TAGTAACGTAGAATGGCGTAATCCGGATAACGGCAATTACGGTTACGTAAACACCTAATAA300
AY362705	TAGTAACGTAGAATGGCGTAATCCGGATAACGGCAATTACGGTTACGTAAACACCTAATAA300
AF027124	TAGTAACGTAGAATGGCGTAATCCGGATAACGGCAATTACGGTTACGTAAACACCTAATAA300
U11013	TAGTAACGTAGAATGGCGTAATCCGGATAACGGCAATTATGGTTACGTAAACACCTAATAA300
U11017	TAGTAACGTAGAATGGCGTAATCCGGATAACGGCAATTACGGTTACGTAAACACCTAATAA300
U11020	TAGTAACGTAGAATGGCGTAATCCGGATAACGGCAATTACGGTTACGTAAACACCTAATAA300
AJ427881	TAGTAACGTAGAGTGGCGTAATCCGGATAACGGCAATTACGGTTACGTAAACACCTAATAA300
M74042	TAGTAACGTAGAATGGCGTAATCCGGATAACGGCAATTATGGTTACGTAAACACCTAATAA300
AF445381	TACTAGCATAGAATGGCGTAATCCAGATAACGGTAATTACGGTTATGTAAACACCTAGCAA300
AY362702	TAGCAGTGTACAATGGCGTAATCCTGATAATGGTAATTATGGTACTGTAAACCAAGCAA300
AY730679	AAC TTATAGGAACAGTGCAGGTCAATATTGCCGTGAATACACTCAAACAGTTATAATAGG360
AY752489	AAC TTATAGGAACAGTACAGGTCAATATTGCCGTGAATACACTCAAACAGTTGTAATAGG360
UFV2	AAC TTATAGAAATAGCACTGGTCAATATTGCCGTGAGTACACTCAAACAGTTGTAATAGG360
AF195118	AAC TTATAGAAATAGCACTGGTCAATATTGCCGTGAGTACACTCAAACAGTTGTAATAGG359
UFV1	AAC TTATAGAAATAGCACTGGTCAATATTGCCGTGAGTACACTCAAACAGTTGTAATAGG360
AF260571	AAC TTATAGAAATAGCACTGGTCAATATTGCCGTGAGTACACTCAAACAGTTGTAATAGG360
U17008	AAC TTATAGAAATAGCACTGGTCAATATTGCCGTGAGTACACTCAAACAGTTGTAATAGG360
AY281069	AAC TTATAGAAATAGCACTGGTCAATATTGCCGTGAGTACACTCAAACAGTTGTAATAGG360
AY362705	AAC TTATAGAAATAGCACTGGTCAATATTGCCGTGAGTACACTCAAACAGTTGTAATAGG360
AF027124	AAC TTATAGAAATAGCACTGGTCAATATTGCCGTGAGTACACTCAAACAGTTGTAATAGG360
U11013	AAC TTATAGAAATAGCACTGGTCAATATTGCCGTGAGTACACTCAAACAGTTGTAATAGG360
U11017	AAC TTATAGAAATAGCACNGGTCAATATTGCCGTGAGTACACTCAAACAGTTGTAATAGG360
U11020	AAC TTATAGAAATAGCACCGGTCAATATTGCCGTGAGTACACTCAAACAGTTGTAATAGG360
AJ427881	AAC TTATAGAAATAGCACTGGTCAATATTGCCGTGAGTACACTCAAACAGTTGTAATAGG360
M74042	AAC TTATAGAAATAGCAATGGTCAATATTGCCGTGAGTACACTCAAACAGTTGTAATAGG360
AF445381	AAC TTATAAAAAATAGCACTGGTCAATATTGCCGTGAGTACACTCAAACAGTTGTAATAGG360
AY362702	AGCTTATAAAAAACAATAC-----318

AY730679	CGGAAAACAACAAAAACATAT382
AY752489	GGGAAAACAACAAACATAT382
UFV2	CGGAAAACAACAAAAAGCATAC382
AF195118	CGGAAAACAACAAAAAGCATAC381
UFV1	CGGAAAACAACAAAAAGC - TAC381
AF260571	CGGAAAACAACAAAAAGCATAC382
U17008	CGGAAAACAACAAAAAGCATAC382
AY281069	CGGAAAACAACAAAAAGCATAC382
AY362705	CGGAAACCAACAAAAAGCATAC382
AF027124	CGGAAAACAACAAAAAGCATAC382
U11013	CGGAAAACAACAAAAAGCATAC382
U11017	CGGAAAACAACAAAAAGCATAC382
U11020	CGGAAAACAACAAAAAGCATAC382
AJ427881	CGGAAAACAACAAAAAGCATAC382
M74042	CGGAAAACAACAAAAAGCATAC382
AF445381	TGGAAACAGCAAAAAAGCATAC382
AY362702	-----