

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

BRUNO SILVA MILAGRES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E
SOROREATIVIDADE DE BACTÉRIAS DO GÊNERO
RICKETTSIA EM ANIMAIS DOMÉSTICOS E
SINANTRÓPICOS**

OURO PRETO – MG

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

BRUNO SILVA MILAGRES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E
SOROREATIVIDADE DE BACTÉRIAS DO GÊNERO
RICKETTSIA EM ANIMAIS DOMÉSTICOS E
SINANTRÓPICOS**

Dissertação de doutorado apresentada ao Núcleo de pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito para obtenção do grau de doutor em Ciências Biológicas, na área de concentração em Biologia Molecular.

Orientador: Márcio Antônio Moreira Galvão

Co-orientador(a): Renata Nascimento de Freitas

Cláudio Lisias Mafra de Siqueira

OURO PRETO – MG

2010

DEDICATÓRIA

À Deus, pelo dom da vida e da sabedoria,

À meus pais (Maria Aparecida e José Geraldo)

A meus irmãos (Bianca e Vinicius)

À família Milagres pela força

A meus eternos amigos pelo incentivo

Dedico

Dedico enfim este trabalho a todos aqueles que
direta ou indiretamente tenham contribuído para o
meu crescimento pessoal e profissional.

“ De tudo ficou, ficaram três coisas: a certeza que estamos sempre começando,
a certeza que é preciso continuar, a certeza que podemos ser interrompidos
antes de terminar. Fazer da interrupção, um novo caminho. Fazer da queda,
um passo de dança, do medo, uma escada, do sonho,
uma ponte e da procura, um encontro

Fernando Sabino

“Enquanto estivermos tentando, estaremos
Felizes, lutando pela definição do indefinido,
Pela conquista do impossível, pelo limite do
Ilimitado, pela ilusão de viver. Quando o
Impossível torna-se apenas um desafio, a satisfação
Está no esforço e não apenas na realização final”

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e pela sua presença constante, ajudando-me a superar as dificuldades e a vencer mais uma etapa na vida. Não cheguei ao fim, mas ao início de uma longa caminhada.

Aos meus pais, Maria Aparecida e José Geraldo, que muitas vezes, abriram mão de seus sonhos para que os meus se realizassem. Obrigado pelo sonho que realizo hoje, e, sobretudo pela lição de amor que me ensinou durante toda a vida. Amo vocês...

Aos meus irmãos, Vinicius e Bianca, e minha futura cunhada Melina, obrigados por entender e compreender a atenção que muitas vezes não pude dar, as datas que não pudemos comemorar juntos, as alegrias e tristezas que não compartilhamos.

A República DNA (Deus Nos Acuda) foi aqui que encontrei amizades inesquecíveis, amigos que me apoiaram nos momentos felizes e nas horas de tristezas e inquietação. Obrigado pelos incentivos e pelas inigualáveis festas e farras. Vocês fazem parte da minha história.

Ao meu orientador Márcio Galvão por acreditar no meu potencial e pela orientação. À professora Renata Nascimento por mais que co-orientadora científica, encontro em você exemplo de profissionalismo, firmeza de caráter e generosidade. Obrigado por tudo!

Ao amigo e Prof. Cláudio Mafra, pela colaboração, pelo profissionalismo, pelo exemplo de orientador, de pai e de amigo. Por ter me dado a oportunidade de começar a entender essa ciência tão fascinante e tão instigante como a Rickettsiologia. Obrigado pela paciência e atenção dispensada sempre que precisei. Você nos motiva a sempre buscar mais!

Ao Dr. David Walker, não só por apoiar o projeto financeiramente, mas por toda confiança que depositou neste trabalho. A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais- FAPEMIG, pelo apoio financeiro aprovando os projetos que foram desenvolvidos neste estudo.

Aos queridos amigos, os Guarda da FUNASA: Ércio, José Paulo e Carlinhos, por toda dedicação e profissionalismo nas coletas. Minha eterna admiração e respeito. Esta vitória só se faz graças a vocês.

Aos prefeitos dos municípios de Santa Cruz do Escalvado e Pingo D' Água. A toda equipe do serviço de vigilância epidemiológica desta região por toda boa vontade, acolhida e disponibilidade. Também a Grazielle, Elizeu e Dinho por toda atenção e colaboração nas visitas.

Aos habitantes de Santa Cruz do Escalvado e Pingo D' Água por entender a importância deste trabalho e nos auxiliar nas coletas. Obrigado pelo acolhimento, em especial D. Santinha e Sr. Bino.

À Universidade Federal de Ouro Preto, por ter me proporcionado a realização deste projeto. Em especial ao Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas (NUPEB), aos seus professores e técnicos como também seus funcionários, em especial a amiga Cida pelo exemplo de profissionalismo e dedicação. Amigos que muito me auxiliaram, deixando muitas vezes seus afazeres para se dedicar à realização deste projeto. Minha admiração e meus agradecimentos.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de São Paulo em especial aos pesquisadores do laboratório de Doenças Parasitárias e ao professor Labruna, que, mesmo muito atarefado, me recebeu também com toda disponibilidade e atenção. A todos deste laboratório pela acolhida e pela amizade que construímos juntos, aos técnicos (Hilda e Renatinho), ao Richard por todo apoio e disponibilidade na análise sorológica; a Iara e Fernanda, por toda atenção, carisma e apoio na execução da Biologia Molecular.

Aos amigos, professores, funcionários da Escola de Nutrição, em especial D. Liette, Erenice, Luiz, Caetano, Jair, Sérgio, Rosângela e em especial a amiga lulu, que me receberam com toda atenção e carinho. Obrigado pela paciência, pela atenção, pelo companheirismo e pelo incentivo para que eu conquistasse mais uma etapa em minha vida.

Ao transporte da UFOP, em especial ao Rogério que sempre se disponibilizou para o comprimento das viagens. E aos motoristas que tantas vezes nos acompanharam com amizade e profissionalismo.

Aos meus eternos e estimados amigos das "Rickettsias" (Dárlen, Amanda, Carlos, Gabriel, Rafael, Guilherme, Michael) com quem dividi a satisfação de concluir esta etapa, mostrando em cada segmento seus trabalhos sem o qual meu objetivo não seria alcançado. Obrigado pela amizade, trabalho e principalmente as viagens. Obrigado especialmente à amiga Amanda, pela amizade, carinho, dedicação por ter

me amparado em vários momentos, pelos congressos, pelos finais de semana no laboratório e é claro pelo sufoco de São Paulo. Vão deixar saudades, hein!

Aos meus amigos do Laboratório de Epidemiologia Molecular, especialmente Cristiane, Denise e Alínia e do laboratório de Saúde Pública (Irisa e Vivian), obrigado pelo companheirismo, pela amizade, pela paciência, pela ralação, pelas noites acordadas, pelos incentivos nas horas de desespero e estresse, pelo sorriso, pela alegria que me motivou a continuar lutando frente aos obstáculos.

A escola Salesiano Dom Helvécio, ao Pré Vestibular Coopvest, a Faculdade do Futuro, com quem dividi a alegria e o estresse desta etapa. Obrigado aos funcionários, aos diretores, professores, em especial a amiga Liliane e Rose, pela amizade, pela confiança e pelos ótimos finais de semana. Obrigado, aos meus queridos alunos, por entender a minha ausência, pela paciência, sempre me motivando a buscar e conquistar novos horizontes. Obrigado por tudo.

Aos meus eternos amigos (Márcia, Wilton, Ronaldo, Léo e especialmente ao irmão e amigo Tarcísio), aos colegas de Viçosa, Ouro Preto e Belo Horizonte, sem seus incentivos e suas amizades nada teria se realizado. Obrigado pela força, pelos momentos felizes que passamos juntos e pelo suporte em momentos de saudades; saudades que com certeza sentirei por todos vocês no futuro. Aos amigos que fiz nesta caminhada do doutorado em especial ao Vinicius, Estela e Antônio, obrigado pela amizade e pelo carinho, por ter me amparado em vários momentos de tristezas e pela colaboração nos momentos que precisei.

A minha grande e amada Família Milagres, em especial a minha vó Edith, meu avô Valdemiro, tia Maria, tia Nilce, tia Cleonice, Tia Glória, Tia Helena e Tia Águeda pelo incentivo nos momentos de desânimo, pelas orações; aos meus padrinhos que sempre me apoiaram, aos meus primos que torceram e hoje participam desta minha conquista, as minhas afilhadas (Gisele e Isabela), por entender que muitas vezes não compartilhamos as alegrias e tristezas. A madrinha Lecir, pela força, pela oração e por estar sempre me ajudando a superar as barreiras de minha vida. Aos meus tios e primos de São Paulo, em especial tia Vera, tio Gerci e tia Helena e toda a sua família, que me acolheu por várias vezes em suas casas, deixando os seus afazeres para se dedicar as minhas necessidades. Obrigado pelo acolhimento, pelo carinho, dedicação e paciência que tiveram com a minha pessoa, sem o aconchego do seus lares e a força que me deste, não conseguiria ultrapassar mais este obstáculo em minha vida .

À minha amada vó Lurdinha, que mesmo lá de cima junto do pai, tenho certeza que olhou e me amparou nas horas mais difíceis de minha caminhada. Obrigado por tudo minha vó, esta vitória também é sua.

Enfim a todos, indiretamente, que de alguma forma, contribuíram para que esta empreitada chegasse a um bom termo, a minha família pelo incentivo e compreensão, aos professores que me atenderam, deixando de lado seus afazeres, pela paciência, aos colegas e amigos pelo companheirismo e aos funcionários, técnicos pelas gentilezas.

Aos que a mim sorriram, mostrando que a vida é bela mesmo fora das páginas de um livro.

“Enfim agradecer é admitir que houve um momento em que se precisou de alguém e reconhecer que o homem jamais poderá lograr para si o dom de ser auto suficiente. Ninguém e nada crescem sozinhos, sempre é preciso um olhar de apoio, uma palavra de incentivo, um gesto de compreensão, uma atitude de amor”.

RESUMO

A febre maculosa é uma doença transmitida por carrapatos e tem como agente etiológico bactérias do gênero *Rickettsia*, envolvendo no ciclo da febre maculosa Brasileira, cães, eqüinos, roedores e marsupiais como reservatórios vertebrados e carrapatos e pulgas como seus vetores invertebrados com os humanos atuando como hospedeiros acidentais, e constituindo elo terminal no ciclo dessas bactérias. A patogenicidade atribuída a estes microorganismos é ainda desconhecida para varias espécies, bem como os fatores de risco, demográficos e sazonais relacionados às respectivas doenças ocasionadas. Para a realização deste estudo, foram selecionados dois municípios do estado de Minas Gerais com prévio histórico de ocorrência destas enfermidade em humanos, sendo dois casos recentes no município de Pingo D'água, localizado na região do Vale do Rio Doce e o município de Santa Cruz do Escalvado, localizado no Vale do Piranga, Zona da Mata Mineira, estado de Minas Gerais foco antigo para riquetsioses, que sofreu alteração recente em sua paisagem natural, devido a construção de uma usina hidrelétrica na localidade de Soberbo no ano de 2004. Assim, com o objetivo de melhor compreender a atual situação epidemiológica das riquetsioses nesses municípios, dentro de uma concepção de ocupação e transformação do espaço geográfico por ação antrópica, buscou-se avaliar o nível de transmissão destes agentes nas populações de animais domésticos e sinantrópicos, realizaram-se ensaios sorológicos e ferramentas da biologia molecular. Eqüinos, cães, roedores e gambás foram capturados e identificados, tendo sido ainda coletadas amostras de soro bem como ectoparasitas. Dos roedores capturados foram colhidas amostras de tecidos (fígado e baço), e dos gambás amostras de sangue total, sendo realizado ainda nestes animais colheita de material por *swab* anal. Das amostras de sangue, tecidos, ectoparasitas e *swabs* anal extraiu-se DNA, que foram amplificadas através de PCR usando oligonucleotídeos iniciadores para amplificação gênero específica do gene da citrato sintase (*gltA*). Os produtos amplificados obtidos foram visualizados em gel de agarose a 1,5%. Apenas amostras de ectoparasitas das espécies *Amblyomma cajennense* coletados de cães, eqüinos, gambás-*Didelphis aurita* e *Ctenocephalides canis* e *Ctenocephalides felis* em pulgas de gambás apresentaram resultados positivos à PCR. As amostras de soros de animais silvestres e domésticos foram investigadas quanto à presença de anticorpos reativos à antígenos de *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia felis*, *Rickettsia belli*, *Rickettsia rhipicephali* e *Rickettsia amblyommii* pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Amostras que apresentaram títulos iguais ou

superiores a 1:64 foram considerados positivas para *Rickettsia*. No município de Pingo D' Água das 46 amostras de soros de roedores analisadas, dentre estas 31 da espécie *Rattus rattus*, 7 *Oryzomys subflavus*, 7 *Nectomys squamipes* e 1 *Bolomys sp.* 26 (83,88%) das amostras de *R. rattus*, seis (85,72%) das amostras de *Oryzomys* e *Nectomys* e a única amostra de soro de *Bolomys* analisada apresentaram resultados positivos para bactérias do grupo da febre maculosa. No município de Santa Cruz do Escalvado das 62 amostras de soro de roedores analisadas, dentre estas 32 da espécie *R. rattus*, 2 *Oryzomys subflavus*, e 23 *Nectomys squamipes* e 5 *Akodon sp.* 30 amostras de *R. rattus* testadas, 30 foram reativas à RIFI para *Rickettsia* do Grupo das Febres Maculosas, totalizando 93,75% das amostras. Os dados sorológicos obtidos nos municípios de Pingo D' Água e Santa Cruz do Escalvado, apontam a espécie *R. rattus* como a mais representativa entre os roedores, o que a credencia para participação no ciclo enzoótico das riquetsioses nas referidas regiões. Levando em consideração o agravante de essa ser a espécie mais sinantrópica em relação às outras estudadas neste projeto, é importante atentar-se para o possível risco de dispersão de organismos do gênero *Rickettsia* por esses animais no município. Foram analisadas ainda 42 amostras de soros de eqüinos e 24 amostras de soros de cães provenientes de Pingo D' Água, com reatividade sorológica contra riquetsias do GFM em 16 (38,09%) dentre as amostras de eqüinos e em duas (8,33%) dentre as amostras de cães. Em Santa Cruz do Escalvado foram analisadas 66 amostras de soros de eqüinos e 67 amostras de soros de cães, verificando-se uma sororeatividade contra riquetsias do GFM em dez (15,15%) dentre as amostras de soros de eqüinos e em 14 (20,89%) dentre as amostras de soros de cães. Das 38 amostras de soro de *D. aurita* coletados no município de Santa Cruz do Escalvado, em 16 verificou-se a presença de *Rickettsia*, sendo que em 42,1% dos soros foram reativos contra *R. rickettsii*, 39,5% contra *R. parkeri*, 18,4% contra de *R. amblyommi* e 2,6% contra *R. felis*. Os achados sorológicos e de biologia molecular obtidos neste trabalho recomendam a manutenção de uma vigilância epidemiológica permanente nos municípios estudados, bem como em seu entorno, buscando-se desta maneira evitar a ocorrência de novos casos humanos causada pela invasão destes focos naturais pelo homem ou pela dispersão de potenciais reservatórios e vetores de agentes riquetsiais para novas áreas do estado.

Palavras chaves: Riquetsioses, febre maculosa Brasileira, *Rickettsia*, ectoparasitas e Reservatórios

ABSTRACT

Spotted fever is a disease transmitted by ticks presenting as his etiological agent bacteria of the genus *Rickettsia*. Involved in her natural cycle, dogs, horses, rodents, and marsupials actuated as vertebrate reservoirs, been ticks, and fleas the invertebrates vectors. Humans actuating as accidental hosts are becoming the final link in the cycle of these bacteria. The pathogenicity attributed to these microorganisms is still unknown for several of the *Rickettsia* species, including the involved factors of risk and the demographic and seasonal factors related. For this study, we selected two counties in the state of Minas Gerais, Brazil, that have prior history of occurrence of this disease in humans: Pingo D'Água, located in Vale do Rio Doce, with two recent cases reported, and Santa Cruz do Escalvado, located in Vale do Piranga, Zona da Mata Mineira, a former focus for rickettsial diseases, which has suffered recent change in their natural landscape due to the construction of a hydroelectric plant in the town of Superb in 2004. Thus, in order to better understand the current epidemiological situation of the rickettsial diseases in these municipalities, under a conception of occupation and transformation of geographic space by anthropic actions, we sought to evaluate the level of transmission of these agents in populations of domestic and synanthropic animals, realizing serological and molecular biology assays. Horses, dogs, rodents and opossums were captured and identified, from whom were collected serum samples and ectoparasites. From rodents captured were collected samples of tissues (liver and spleen). From opossums were collected samples of whole blood and anal swab. From blood, tissues, ectoparasites, and anal swabs were extracted DNA samples, which were subsequently amplified by PCR using primers for amplification of *Rickettsia* genus-specific citrate synthase gene (*gltA*). The amplified products obtained were visualized in agarose gel 1.5%. Only samples of parasites of the species *Amblyomma cajennense* collected from dogs, horses, and opossums, and fleas (*Ctenocephalides canis* and *Ctenocephalides felis*) collected from opossums tested positive by PCR. Serum samples from wild and domestic animals were investigated by Immunofluorescence Assay (IFA) for the presence of antibodies reactive to antigens of *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia felis*, *Rickettsia belli*, *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia amblyommii*. Samples that had titers equal or greater than 1:64 in the IFA were considered positive for *Rickettsia*. In the municipality of Pingo D'Água, from 46 serum samples rodents tested, among these 31 species of *Rattus rattus*, seven *Oryzomys subflavus*, seven *Nectomys squamipes*, and one *Bolomys sp.*,

26 (83.88%) samples of *R. rattus*, six (85.72%) samples of *Oryzomys* and *Nectomys*, and the single serum sample of *Bolomys* examined were positive for bacteria of the spotted fever group (SFG). In Santa Cruz do Escalvado, serum samples from 62 rodents tested, among these 32 species of *R. rattus*, two *Oryzomys subflavus* and five *Nectomys squamipes*, and 23 *Akodon sp.*, 30 samples of *R. rattus* were reactive by IFA for *Rickettsia* agents from the SFG, totaling 93.75% of the samples. The serological data obtained in the municipalities of Pingo D'Água and Santa Cruz do Escalvado, indicated that the species *R. rattus* is the most representative among the rodents, which accredits to participate in the enzootic cycle of rickettsial diseases in these regions. Taking into account the aggravating factor that is the most synanthropic species over all others studied in this project, it is important to pay attention to the possible risk of dispersal of the genus *Rickettsia* by these animals in the municipalities. We also analyzed serum samples of 42 horses and 24 serum samples of dogs from Pingo D'Água, which showed serological reactivity against rickettsiae from SFG. Sixteen (38.09%) among the samples from horses and two (8, 33%) among the samples of dogs tested showed positive results. In Santa Cruz do Escalvado were we analyzed 66 serum samples from horses and 67 serum samples from dogs, were found a seroreactivity against rickettsiae organisms of SFG in ten (15.15%) among the serum samples of horses and in 14 (20 89%) among the serum samples of dogs tested. Of 38 serum samples from *D. aurita* collected in Santa Cruz do Escalvado, in 16 were verified the response against *Rickettsia*, been 42.1% of sera reactive against *R. rickettsii*, 39.5% against *R. parkeri*, 18.4% against *R. amblyomma* and 2.6% against *R. felis*. The findings of serological and molecular biology in this work recommend the maintenance of effective epidemiological surveillance in the municipalities studied, as well as its surroundings, searching in this way avoid the occurrence of new human cases of outbreaks caused by invasion by man or by natural dispersal of potential reservoirs and vectors for *Rickettsia* to new areas of the state.

Keywords: Rickettsioses, Brazilian spotted fever, *Rickettsia*, ectoparasites, reservoirs

Listas de Figuras

Figura	Pág
Figura 1: Localização do município de Santa Cruz do Escalvado	46
Figura 2: Típicas habitações rurais no município de Santa Cruz	47
Figura 3: Usina hidrelétrica de Candonga	48
Figura 4: Localização do município de Pingo D'Água	49
Figura 5: Características do município de Pingo D'Água	50
Figura 6: Armadilha utilizado na captura de gambás	51
Figura 7: Coleta de <i>swab</i> anal e sangue por punção cardíaca em gambás	52
Figura 8: Coleta de sangue e tecidos dos roedores	53
Figura 9: Coleta de sangue de cães e equinos	54
Figura 10: Coleta de ectoparasitas em gambás e roedores.	55
Figura 11: Resultados da RIFI utilizando antígenos de <i>R.rickettsii</i> e <i>R.parkeri</i>	75
Figura 12: Resultado parcial de amplificação pela PCR do <i>gltA</i> em DNA de ectoparasitas	84

Listas de Gráficos

Gráfico	Pág
Gráfico 1: Distribuição do número de gambás capturados	63
Gráfico 2: Comparação entre os títulos à RIFI de gambás	76

Listas de Tabelas

Tabelas	Pág
Tabela 1: Dados da captura de gambás no município de Santa Cruz do Escalvado	62
Tabela 2: Dados da captura de roedores no município de Santa Cruz do Escalvado	64
Tabela 3: Dados da captura de roedores no município de Pingo D' Água	66
Tabela 4: Identificação dos ectoparasitas coletados no município de Santa Cruz do Escalvado	67
Tabela 5: Identificação dos ectoparasitas coletados em Pingo D' Água	68
Tabela 6: Resultado sorológico na RIFI de roedores do município de Santa Cruz do Escalvado	69
Tabela 7: Percentual de amostras reativas à RIFI de roedores coletados em Santa Cruz do Escalvado	71
Tabela 8: Percentual de amostras reativas à RIFI de roedores coletados no município de Pingo D' Água	72
Tabela 9: Resultado sorológico na RIFI de roedores do município de Pingo D' Água	72
Tabela 10: Resultado sorológico na RIFI de gambás do município de Santa Cruz do Escalvado	74
Tabela 11: Resultado sorológico de eqüinos do município de Pingo D' Água	76
Tabela 12: Resultado sorológico de cães do município de Pingo D' Água	78
Tabela 13: Resultado sorológico de eqüinos de município de Santa Cruz do Escalvado	79
Tabela 14: Resultado sorológico de cães do município de Santa Cruz do Escalvado	81
Tabela 15: Percentual de amostras reativas à RIFI de Santa Cruz do Escalvado e Pingo D' Água	83

Tabela 16: Resultado das amostras de DNA de ectoparasitas coletados em Santa Cruz do Escalvado, positivas na PCR, utilizado o primers da citrato sintase	84
Tabela 17: Associação entre amostras de ectoparasitas positivas à PCR e os títulos da sorologia à RIFI da sorologia dos seus hospedeiros	85
Tabela 18: Resultados da homologia das sequências obtidas com os produtos amplificados para o gene <i>gltA</i> e as sequências de <i>Rickettsia</i> depositadas no GenBank	86

SUMÁRIO

I- INTRODUÇÃO	19
II- REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1- Taxonomia e distribuição das riquetsias no mundo	24
2.2- Vetores e a interação riquetsia-vetor	26
2.3- Os mamíferos hospedeiros e reservatórios	29
2.3.1- Roedores	30
2.3.2- Capivara	31
2.3.3- Ratos	31
2.3.4- Gambás	33
2.4- Importância da febre maculosa	35
2.5- Identificação e caracterização de riquetsias	38
III- OBJETIVOS	43
3.1- Objetivo Geral	44
3.2- Objetivos específicos	44
IV- METODOLOGIA	45
4.1- Características geográficas de Santa Cruz do Escalvado	46
4.2- Características geográficas de Pingo D' Água	49
4.3- Capturas de animais	51
4.4- Coleta de ectoparasitas	54
4.5- Extração de DNA	55
4.6- Obtenção do controle positivo	57
4.6.1- Cultura de Células Vero e Infecção com Rickettsias	57
4.7- Reação em cadeia da polimerase (PCR)	57
4.8- Sequenciamento e análise das sequências	58
4.9- Avaliação Sorológica	58

4.9.1- Produção de Lâminas de Antígeno	59
4.9.2- Reação de Fluorescência Indireta	60
V- RESULTADOS	61
5.1- Captura de animais e coleta de dados	62
5.2- Avaliação sorológica de roedores no município de Santa Cruz do Escalvado	69
5.3- Avaliação sorológica de roedores no município de Pingo D' Água	71
5.4- Avaliação sorológica dos gambás a antígenos de <i>rickettsia</i>	73
5.5- Avaliação sorológicas de cães e eqüinos	76
5.6- Reação em cadeia da polimerase (PCR)	83
5.7- Sequenciamento	86
VI- DISCUSSÃO	89
VII- CONCLUSÃO	96
VII- PRESPECTIVAS	99
IX- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

I-INTRODUÇÃO

De todas as doenças que afligem o homem, as causadas por riquetsia, situam-se entre aquelas que mais ocasionaram sofrimento e morte. Dentre os afetados destacam inclusive pesquisadores envolvidos em seu estudo, principalmente os pioneiros na busca de dados do diagnóstico, tratamento e controle. (GALVÃO,1996).

Apesar de sua baixa prevalência, a febre maculosa Brasileira (FMB), uma das doenças mais importantes do grupo, alia sua alta letalidade ao fato de ocorrer com frequência sob a forma epidêmica, atingindo núcleos familiares em comunidades desassistidas do ponto de vista sócio econômico e de serviços de atenção à saúde, emprestando à mesma um caráter de prioridade de intervenção entre as ações de saúde em regiões afetadas pela doença. Por esta característica o Ministério da Saúde, reconheceu a doença como de notificação compulsória nacional a partir do ano de 2001.

A FMB a mais prevalente doença riquetsial do Brasil (LEMOS et al., 2001), tendo o seu primeiro relato realizado por Piza e cols. (1932), com vários casos notificados principalmente na região sudeste (GALVÃO, 1993). A enfermidade é causada pela *Rickettsia rickettsii*, uma bactéria pertencente à Ordem Rickettsiales, Família Rickettsiaceae, cujos membros caracterizam-se como microrganismos intracelulares obrigatórios, muitos dos quais causando doenças de distribuição mundial em humanos e outros hospedeiros vertebrados e invertebrados (RAOULT & ROUX, 1997). Desde a década de 1930, pesquisas indicam os principais vetores responsáveis pela transmissão da doença os carrapatos *Amblyomma cajennense* (Lemos-Monteiro , 1932; Dias Martins , 1939) e *Amblyomma aureolatum* (FONSECA, 1935; DIAS & MARTINS, 1939; LIMA et al., 1995; LEMOS et al., 1996; PINTER et al., 2004). Esses artrópodes pertencem à Família Ixodidae, Subfamília Amblyomminae e gênero *Amblyomma*. Esse gênero é considerado o mais numeroso e de maior importância médica no Brasil, apresentando as principais espécies transmissoras da bactéria *Rickettsia* que parasitam os humanos (GALVÃO et al., 2004).

As doenças causadas por riquetsias estão associadas a diversos artrópodes, incluindo piolhos, pulgas, carrapatos e outros ácaros (RAOULT e ROUX, 1997). Amplamente distribuídas pelo mundo geralmente ocorrem em focos endêmicos e em intervalos esporádicos, re-emergindo de forma epidêmica na população humana. A interação dessas bactérias, tanto com hospedeiros vertebrados como com seus vetores, tem servido como um excelente modelo de estudo do complexo hospedeiro-parasita, principalmente quanto à interação do agente com artrópodes que se alimentam de sangue, representando um importante elo na evolução biológica e na

interação entre as espécies. As relações íntimas das riquetsias com os vetores caracterizam-se pela alta eficiência de sua multiplicação e estabelecimento no artrópode, com ocorrência de transmissão trans-estadial e trans-ovariana, com extensa distribuição geográfica e ecológica em diferentes biomas e ecossistemas. Nestas interações observa-se que as riquetsias diferem consideravelmente em termos do vetor, distribuição geográfica e virulência (AZAD & BEARD, 1998).

Para entender a importância de certos vertebrados no ciclo de organismos do gênero *Rickettsia*, é fundamental o conhecimento dos seguintes fatores: (1) ocorrência da infecção natural em animais; (2) biologia dos hospedeiros vertebrados; (3) espécies e estádios de carrapatos que parasitam os hospedeiros em condições naturais; (4) dinâmica e inter-relações entre os hospedeiros, vetores e as bactérias em um foco natural; (5) e a evolução da infecção experimental em animais não imunes com referência particular da duração da riquetsemia e os níveis necessários de parasitemia para infectar os vetores e propiciar o aparecimento e persistência de anticorpos (BOZEMAN *et al*, 1967).

A disseminação de agentes infecciosos e parasitários para novos hospedeiros e ambientes estabelece assim novas relações entre hospedeiros e parasitas, e novos nichos ecológicos na cadeia de transmissão destas doenças, evidenciam-se em nosso país inúmeros ecossistemas com conseqüente considerável biodiversidade da flora e fauna. A alteração e destruição desses ecossistemas em larga escala pela ação do homem advêm nestas relações parasito-hospedeiro com conseqüências desastrosas. Dentre as ações antrópicas destaca-se o avanço da agricultura e da pecuária próximos às áreas naturais, o que ocasiona contato entre populações humanas e de seus animais domésticos com as populações de animais silvestres nos seus habitat, também merecendo destaque, as ações para a realização de atividades de lazer e esporte. Como conseqüência dessas interações tem-se a ocorrência de agravos de natureza zoonótica sob a forma epidêmica, pela dispersão de animais suscetíveis, não esperada do ponto de vista da história natural dos agentes biológicos, e o aumento da disseminação geográfica da doença (BARLETT & JUDGE, 1997). Neste contexto, o estudo da epidemiologia dessas doenças torna-se vital para o melhor conhecimento dos focos naturais destas enfermidades, estabelecendo-se assim, os fatores de riscos existentes em determinados ecossistemas, a circulação de agentes entre os animais silvestres, e a importância do conhecimento das doenças nestes animais subsidiando as ações de Saúde Pública. Buscando suporte científico, nosso grupo vem estudando a epidemiologia das riquetsioses no município de Caratinga (Cardoso *et al* 2006) e no município de Santa Cruz do

Escalvado (PENA et al. 2009), para melhor conhecimento dos fatores envolvidos neste agravo de saúde veiculados por artrópodes, a fim de conhecer a dinâmica de transmissão das riquetioses nas referidas áreas, e estimar o risco biológico ao qual estão submetidas suas populações em suas atividades diárias.

Apesar dos avanços significativos no conhecimento sobre as riquetsias no Brasil, incluindo a caracterização molecular de algumas espécies, várias e importantes perguntas ainda precisam ser respondidas. No Brasil, a consolidação da vigilância das doenças riquetsiais é urgentemente requerida com a finalidade de estimar a sua incidência e prevalência, e de maneira a dar suporte ao diagnóstico e tratamento específico dos pacientes, permitindo assim o desenvolvimento e implantação de estratégias de controle e prevenção destes agravos.

O desenvolvimento e aprimoramento de novas técnicas de biologia molecular têm propiciado novos horizontes com relação ao conhecimento dos microorganismos causadores de riquetioses do GFM, assim como de outras riquetioses, além de permitirem o estudo desses microorganismos em possíveis hospedeiros dessas doenças. A implementação de técnicas de biologia molecular, vem assim permitindo o avanço na caracterização molecular e filogenética dos organismos do gênero *Rickettsia*, com a identificação de novas espécies e a comprovação de novas interações em todo o mundo.

No presente trabalho, propusemo-nos a realizar um estudo de caso a partir do relato, em 1985, da existência de dois casos suspeitos de FMB no município de Santa Cruz do Escalvado, posteriormente confirmados através de necropsia dos pacientes (GALVÃO et al., 1989); e de um caso notificado no ano de 2003 no município de Pingo D'Água.

Valendo-nos do estudo do ciclo epidemiológico das riquetioses, envolvendo agentes riquetsiais em ectoparasitos de animais silvestres e sinantrópicos, bem como esses próprios animais, empregando-se técnicas moleculares e sorológicas, com o objetivo de melhor conhecer a dinâmica de transmissão de riquetioses na referidas áreas, e estimar o real risco ao qual estão submetidas suas populações, este trabalho se impõe de maneira crucial para a discussão sobre o elo entre o ciclo silvestre e o ciclo periurbano dessas doenças, na busca da compreensão dos diversos fenômenos envolvidos sob os pontos de vista microbiológico e epidemiológico no mundo destes fascinantes microrganismos e seus hospedeiros vertebrados e invertebrados.

II- REVISÃO DE LITERATURA

2.1- TAXONOMIA E DISTRIBUIÇÃO DAS RIQUEÍSIAS NO MUNDO

As riquetsioses constituem um grupo de doenças causadas por parasitas intracelulares obrigatórios com características de bactérias Gram-negativas (HACKSTADT, 1996), dos gêneros *Rickettsia* e *Orientia*, da Família Rickettsiaceae, Ordem Rickettsiales e Classe α -Proteobactéria. Descrita inicialmente como pequenos bastonetes e bacilos, que retinham a fucsina básica quando corado pelo método Gimenez (GIMENEZ, 1964) e fracamente corados por Gram, podem apresentar agrupadas em pares, em cadeias ou isoladas. Com exceção da *Rickettsia prowazekii* causadora do tifo, não apresentam flagelos. Residem em glândulas salivares e ovários do artrópode hospedeiro (BILLINGS et al., 1998), com várias espécies dessa ordem causando doenças no homem e em outros hospedeiros vertebrados e invertebrados, apresentando uma larga distribuição mundial (DUMLER et al., 2001).

Desde períodos antes de Cristo se tem notícias de infecções causadas por riquetsias, das quais datam do século 5 a.C. com a praga ocorrida em Atenas que provavelmente foi causado pela *Rickettsia typhi*, responsável pelo tifo murino. No século 16 d.C. houve a confirmação de casos do tifo na Europa, que após esse incidente houveram casos no mundo todo (SILVEIRA, 2006). O primeiro relato de febre maculosa ocorreu na cidade de Idaho, EUA, em 1896 sendo que, em 1899, foram descritas por Maxcy as primeiras manifestações clínicas na literatura médica. Finalmente, em 1907, Ricketts isolou o agente etiológico da febre maculosa das Montanhas Rochosas. Em seus estudos Ricketts já indicava a semelhança dos agentes causadores da Rocky Mountain spotted fever e do tifo exantemático, passando o gênero, a partir de 1916, a ser denominado *Rickettsia* em sua homenagem (WEISS, 1991).

No decorrer do tempo várias bactérias do gênero *Rickettsia* foram sendo descobertas e muitos relatos foram aparecendo. Weiner (2009) descobriu novas relações filogenéticas das riquetsias, através da biologia molecular, modificando alguns grupos no cladograma, anteriormente considerado e originando e rearranjando as espécies antigas e novas. Desta forma, o grupo das bactérias do gênero *Rickettsia* tomou a seguinte forma: Grupo das Febres Maculosas (GFM) possuindo as espécies *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia montanensis*, *Rickettsia massiliae*, *Rickettsia japonica*, *Rickettsia peacockii*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia conorii* e *Rickettsia sibirica*; o Grupo do Tifo (GT) que permaneceu com as espécies *Rickettsia typhi* e *Rickettsia prowazekii*; o Grupo Canadensis com as espécies *Rickettsia canadensis* e *Rickettsia tarasevichiae*; e o Grupo de Transição envolvendo a *Rickettsia australis*, *Rickettsia akari* e *Rickettsia felis*.

Essa divisão é o sexto grande clado referido por Weinert (2009), sendo que as bactérias do gênero *Rickettsia* possuem ainda outros cinco grandes clados divididos como a seguir: Hydra, que engloba riquetsias associada com protistas e outros hospedeiros desconhecidos; Torix contendo riquetsias presentes em amebas, sanguessugas e alguns artrópodes; Rhizobius no qual as riquetsias parasitam três tipos de besouros; Malloidae que apresenta apenas um tipo de besouro; e Bellii que envolve 11 linhagens de artrópodes e a espécie *R. bellii*.

Dentro do GFM as principais espécies são a *R. rickettsii*, agente da febre maculosa das Montanhas Rochosas e da Febre Maculosa Brasileira, a *R. conorii*, agente da Mediterranean Spotted Fever ou Febre Botonosa (HACKSTADT, 1996), a *R. parkeri* e *R. felis* (AZAD et al., 1992; GALVÃO et al., 2004; GALVÃO et al., 2006a).

Segundo Paddock e cols. (2004), a *R. parkeri*, antes considerada não patogênica, teve seu primeiro caso de infecção humana reconhecida nos Estados Unidos em 2004, mesmo ano em que ela foi encontrada em carrapatos da espécie *Amblyomma triste* no Uruguai, sendo considerada como o agente patogênico responsável pela doença naquele país (VENZAL et al., 2004). Nos Estados Unidos, recentemente, têm sido confirmados outros casos em humanos de riquetsioses causados por esta espécie (RAOULT & PADDOCK, 2005; FINLEY et al., 2006; SUMNER et al., 2007; WHITMAN et al., 2007).

Outras riquetsias relacionadas ao GFM, têm sido isoladas tanto de artrópodes, como também de humanos em diferentes países: *R. japonica* (*Japanese spotted fever*), *R. africae* (*African tick bite fever*), *R. felis* (*California flea typhus*) (MAHARA, 1984; KELLY et al., 2004; HIGGINS et al., 1996), *R. australis* (*Queensland tick typhus*) e *Rickettsia honei* (*Flinder Islands spotted fever*). Com exceção de *R. akari* e *R. felis* transmitidas, respectivamente, por pequenos ácaros e pulgas, todas as outras representantes desse grupo são veiculadas por carrapatos (RAOULT & ROUX, 1997; RAOULT et al, 2002).

A *R. felis*, inicialmente denominada “agente ELB (ELs Labs, Soquel, CA), já foi descrita em todos os continentes tendo sido observada pela primeira vez em tecidos da pulga do gato (*Ctenocephalides felis* Bouché) através de microscopia eletrônica nos Estados Unidos (ADAMS et al., 1990). O nome *R. felis* (de *Felis domesticus*, o gato doméstico) foi proposto, em 1996, quando a sua diferença com outras riquetsias do mesmo gênero foi esclarecida (HIGGINS et al., 1996). Posteriormente, o agente foi associado a casos clínicos de febre maculosa em pacientes no Texas (EUA) inicialmente suspeitos de terem contraído tifo murino (SCHRIEFER et al., 1994). Classicamente, a *R. rickettsii* é reconhecida, desde o início do século passado, como

responsável pela alta letalidade dos casos clínicos em humanos não tratados (DIAS & MARTINS, 1939; ZAVALA-VELÁSQUEZ et al., 2000). Além dos Estados Unidos, casos humanos de febre maculosa, causado por *R. felis*, foram notificados no México (ZAVALA-VELÁZQUE et al., 2000), Brasil, França (RAOULT et al., 2001), Alemanha (RICHTER et al., 2002) e Tailândia (PAROLA et al., 2003). A descrição por Raoult e cols. (2001) de casos humanos positivos a *R. felis* no Estado de Minas Gerais e o achado de Oliveira e cols. (2002) apontam a possibilidade da pulga ser um vetor de riquetsioses humanas.

2.2- VETORES E A INTERAÇÃO RIQUÉTSIA-VETOR

A maioria das espécies de riquétsias patogênicas ao homem, assim como as riquétsias não patogênicas, tem como vetores e reservatórios naturais, artrópodes hematófagos (pulgas, carrapatos e piolhos) e ainda ácaros.

Estudos têm demonstrado que, no Brasil, a febre maculosa é transmitida ao homem por carrapatos da espécie *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma aureolatum*, carrapatos de equinos, os quais apresentam pouca especificidade parasitária, especialmente nas fases de larva e ninfa (DIAS & MARTINS, 1939; GALVÃO, 1996; LEMOS et al., 1997). Esses artrópodes infectam-se ao sugarem animais silvestres. No entanto, a doença não depende exclusivamente desse mecanismo para sua manutenção, pois ocorre transmissão transovariana entre os carrapatos, sendo que além de transmissores, são também verdadeiros reservatórios desses patógenos na natureza (BURGDORFER & VARMA, 1967; BALASHOV, 1984).

Apesar de os carrapatos serem reservatórios e transmissores de riquétsias, estas podem influenciar as gerações futuras destes ácaros, causando uma diminuição de ovos viáveis como consequência da redução da fertilidade (BURGDORFER & BRINTON, 1975). Outro fato interessante é a competição existente entre diferentes espécies de riquétsias no interior de seus hospedeiros invertebrados, onde somente uma espécie permanece e se desenvolve no vetor. Esse fenômeno é chamado de interferência riquetsial (CARMICHAEL & FUERST, 2006).

O gênero *Amblyomma* tem, aproximadamente, 100 espécies descritas, sendo 33 destas encontradas no Brasil. Este ixodídeo apresenta baixa especificidade, parasitando diversos mamíferos, inclusive o homem, sendo mais freqüente em eqüinos e, em menor escala, em bovinos e caninos (ARAGÃO & FONSECA, 1961).

Dentro do gênero *Amblyomma* destacam-se o *A. cajennense* e o *A. aureolatum*, os quais estão incriminados na manutenção enzoótica e na transmissão da febre maculosa para humanos (FONSECA, 1935; DIAS & MARTINS, 1939; LIMA et al., 1995; LEMOS et al., 1996).

A constatação de numerosas populações desse carrapato nas áreas endêmicas para FMB é um achado comum, os quais completam apenas uma geração por ano na região sudeste do Brasil, com os três estádios parasitários marcadamente distribuídos ao longo dos doze meses (OLIVEIRA, 1998; SOUZA et al., 1999).

As fêmeas da maior parte das espécies necessitam de uma refeição de sangue para iniciar a cópula e a ovoposição, após a qual morrem (ARTHUR, 1965). A transmissão transovariana da riquetsia por fêmeas e transestadial entre todos os estágios de espécie *A. cajennense* já havia sido descrita por Monteiro & Fonseca (1932), sendo considerada responsável pela manutenção da *R. rickettsii* na natureza, permitindo ao carrapato, dessa forma, permanecer infectado durante toda a sua vida e também por muitas gerações após uma infecção primária.

O período de incubação tem duração média de 30 dias para posterior eclosão dos ovos. Geralmente 95% dos ovos dão origem às larvas hexápodes que precisam realizar o repasto sanguíneo e, bem como ingerir, linfa ou tecidos digeridos como fonte de alimentação. Essas larvas sobem e descem nas vegetações de acordo com as características ambientais (FONSECA & MARTINS, 2007). Esse deslocamento vertical facilita o encontro com o hospedeiro. Depois de fixada ao animal, a larva inicia o período de repasto que dura, em média, de três a seis dias. Logo depois as larvas descem do hospedeiro buscando abrigo no solo onde permanecem por volta de 18 a 26 dias para sofrerem a muda ou ecdise, transformando-se em ninfas.

As ninfas octópodes desempenham também o deslocamento vertical. Encontrado o animal, as ninfas realizam o ingurgitamento durante cinco a sete dias, que assim como as larvas, descem do hospedeiro para procurar abrigo e durante 23 a 25 dias realizam a muda para transformarem-se em adultos. Estes em sete dias já se encontram aptos para realizarem a alimentação de sangue de novos hospedeiros.

Os adultos, macho e fêmea, realizam o acasalamento após o repasto tissular e sanguíneo. Depois de fecundada, a fêmea realiza o ingurgitamento de sangue. Esse período dura cerca de 10 dias até que as fêmeas desprendem-se da superfície epitelial e caem no solo para realizar a postura e iniciar outro ciclo

Portanto, além de vetores, os carrapatos são verdadeiros reservatórios da riquetsia na natureza, uma vez que todas as fases evolutivas, no ambiente, são capazes de permanecer infectadas meses ou anos à espera do hospedeiro, garantindo um foco endêmico prolongado. Em algumas áreas, mesmo na abundância de hospedeiros primários (vertebrados) para *A. cajennense*, este pode não se estabelecer em função de condições ambientais, que não propiciem um microclima adequado para as fases de vida livre do carrapato.

Tanto a presença como a abundância de populações dessa espécie de carrapato está fortemente associada à presença de áreas com média a densa cobertura vegetal, tais como pastos “sujos”, capoeiras e matas (LABRUNA et al., 2001).

O *A. cajennense* está presente desde o sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina, incluindo algumas ilhas do Caribe. No Brasil, é encontrado com abundância em todos os estados das regiões Sudeste e Centro-Oeste, porém com distribuição limitada nas demais regiões (LABRUNA et al., 2001).

O *A. aureolatum* é encontrado em diversos países da América do Sul; no Brasil, destaca-se em áreas das regiões Sul e Sudeste, tendo sido inicialmente incriminado como vetor da febre maculosa para humanos em São Paulo (DIAS e MARTINS, 1939). Em 2000, foi a única espécie encontrada em grande número em humanos e animais domésticos numa área rural do estado de São Paulo (FONTES et al., 2000).

Têm como hospedeiros primários para o estágio adulto carnívoros silvestres, com os cães se comportando também como hospedeiros primários para essa espécie, podendo estes se apresentarem infestados por todo o ano, embora não haja informações até o momento sobre a dinâmica populacional deste carrapato, sem um pico de infestação definido (PINTER et al., 2004).

Merece também citação o *Amblyomma dubitatum*, conhecido anteriormente como *Amblyomma cooperi*, o que é relatado nos estados das regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste, e têm as capivaras como hospedeiros primários para todos os estádios parasitários. Embora haja controvérsias sobre o parasitismo humano por este carrapato, sua importância médica se baseia principalmente numa possível participação no ciclo enzoótico de riquetsias na natureza, já que as capivaras são consideradas hospedeiros amplificadores de *R. rickettsii* (SOUZA et al., 2009; TRAVASSOS & VALLEJO, 1942).

Além disto, grandes populações de *A. dubitatum* têm sido encontradas, juntamente com o carrapato *A. cajennense*, em alguns focos de febre maculosa na região Sudeste (SOUZA, 2001; LABRUNA et al., 2004b).

2.3- OS MAMÍFEROS HOSPEDEIROS E RESERVATÓRIOS

Vários são os hospedeiros silvestres das riquetsioses incluindo animais como antas, roedores, aves, capivaras, serpentes, morcegos, peixes e gambás. Animais domésticos como cachorros, gatos, equinos e aves também possuem grande potencial para serem parasitados (DIAS, 1938; DIAS e MARTINS, 1939; LEMOS, 2002; VIANNA, 2002).

Desde a década de 1930, já havia sido demonstrado que o cão é susceptível à doença pela *R. rickettsii* (MOREIRA e MAGALHÃES, 1937), embora não seja essencial ao ciclo natural, desempenha papel primordial na manutenção e dispersão dos vetores infectados, além de estar envolvido na transmissão peri-domiciliar de doenças riquetsiais ao carregarem para o domicílio carrapatos infectados (BURGDORFER, 1975; MCDADE e NEWHOUSE, 1986).

A importância dos eqüinos na participação da FMB se deve à grande capacidade destes em albergar altas infestações de carrapatos, em todos os estádios, sem comprometer sua própria vida. Em condições naturais, um único eqüino pode se apresentar parasitado por mais de cinquenta mil larvas, ou mais de doze mil ninfas, ou mais de dois mil adultos de *A. cajennense*, sem que sua vida esteja em risco (LABRUNA, 2000).

2.3.1 Roedores

Os mamíferos são considerados os hospedeiros preferenciais para diversas espécies de ectoparasitos e destes os da Ordem Rodentia são os mais infestados (WOOLLEY, 1988). De acordo com Botelho e Linardi (1996), este grupo pode ser considerado uma das ordens de mamíferos mais importantes por incluir grande número de espécies, muitos das quais com papel epidemiológico de extrema relevância. Os roedores poderiam atuar no ciclo silvestre das riquetsias, como é o

caso das capivaras, para as quais tem sido sugerido um papel como elo entre os ciclos enzoóticos e zoonóticos de *R. rickettsii* (NASCIMENTO & SCHUMAKER, 2004).

Os roedores compõem a Ordem Rodentia que é derivada da palavra latina *rodere* que significa roer. A principal característica que unifica os roedores é a presença de dentes incisivos proeminentes que crescem ininterruptamente. Eles são classificados quanto à espécie, sexo (macho e fêmea), grupo etário (jovem, subadulto e adulto) e modos de vida (arborícolas, aquícolas, galerícolas, rupícolas, arvícolas e terrícolas) (FUNASA, 2002). A Ordem Rodentia é composta pelas Famílias Sciuridae, Cricetidae, Muridae, Caviidae, Ctenomyidae, Cuniculidae, Dasyproctidae, Dinomyidae, Erethizontidae, Echimyida e Myocastoridae, todas essas estão encontradas no Brasil.

Existem cerca de 2.000 espécies de roedores no mundo, representando aproximadamente 40% dos mamíferos existentes. Os roedores vivem em qualquer ambiente terrestre com condições favoráveis à sobrevivência. Possuem alta capacidade de adaptação ecológica e fisiológica, suportando os climas mais frios e os mais tórridos, em regiões com presença ou ausência de vegetação e grandes altitudes (FUNASA, 2002).

Dentre outros roedores, existem espécies consideradas sinantrópicas por associarem-se ao homem em virtude de terem seus ambientes alterados pela ação do próprio homem. As espécies sinantrópicas não-comensais (silvestres) caracterizam-se por formarem colônias no ambiente longe do contato com o homem. A presença do roedor em áreas urbanas e rurais gera agravos econômicos e sanitários de relevância ao homem, participando da cadeia epidemiológica de pelo menos trinta doenças transmitidas ao homem, agindo como reservatórios naturais da doença. Dentre elas a leptospirose, a peste, a hantavirose e a febre maculosa, doenças de importância epidemiológica no Brasil (MATIAS et al., 2002).

2.3.2 Capivara

Entre os roedores, as capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) são os maiores do mundo, podendo viver em regiões alagadas de áreas florestais e ao longo das bordas dos rios em contato com fazendas, as quais são freqüentemente invadidas por esses animais para se alimentarem de plantações de grãos. De acordo com Figueiredo e cols. (1999), a capivara pode ser reservatório de zoonoses em áreas quase completamente desflorestadas, como no caso de São Paulo. Vivendo próximas a

fazendas ou mesmo cidades, poderiam favorecer a transferência de seus ectoparasitos, juntamente com os patógenos por eles veiculados, para animais domésticos, potencializando zoonoses e oferecendo riscos para o homem (Milagres, 2004).

São encontradas em todo território brasileiro com exceção de algumas partes semi-áridas no nordeste. São herbívoros com hábitos semi-aquáticos, pois habitam áreas com cursos d'água permanentes como lagos, rios e pântanos. A água serve de refúgio contra predadores e sítio para reprodução. Em ambiente terrestre, requerem pastos para forragearem e matas para descansarem e se reproduzirem.

As capivaras são animais silvestres, porém possuem alto grau de sinantropismo, comprovado pela sua domesticação pelos humanos. Por ser reservatório de agentes infecciosos, esses roedores apresentam perigo diante outros animais domésticos que estejam em contato. Pesquisas já apontaram microorganismos causadores de doenças em capivaras de vida livre e de ambientes rurais, comprovando o perigo de infecção a animais próximos por ser um grande amplificador (FIGUEIREDO et al., 1999; MILAGRES, 2004).

2.3.3 Ratos

Os ratos, com mais de 2000 espécies distribuídas pelo mundo apresentam, cerca de 125 que são classificadas como pragas, sendo três de grande importância para o homem: *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* e *Rattus rattus*. Com uma perda anual estimada da ordem de 33 milhões de toneladas de alimentos provocado por ataque de ratos, quantidade suficiente para alimentar 130 milhões de pessoas por ano. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), os ratos destroem 10% da produção anual brasileira de grãos (FOCUS SAÚDE PÚBLICA, 2000). Nos campos, destroem as sementes recém plantadas e atacam os cereais. Nas agroindústrias, fábricas, usinas, refinarias e indústrias causam prejuízos incalculáveis todos os anos. Na pecuária, infestam quase todas as propriedades que criam animais em regime de confinamento, devido ao armazenamento de ração. Os ratos e camundongos provocam ainda severos danos às estruturas e materiais, devido ao seu hábito de roer. Os ratos são capazes de provocar danos e perdas em todas as fases de processamento, produção e estocagem dos gêneros alimentícios, chegam a comer cerca de 10% de seu próprio peso corporal a cada dia, o que significa algo em torno de 10 e 20 Kg ao ano (CARVALHO NETO, 2005).

Dentre outros roedores, a espécie *Nectomys squamipes* é conhecida popularmente por rato d'água por ser comumente encontrada em matas ou terrenos cultivados onde se tenha água, geralmente em córregos e brejos. Possuem hábitos noturnos e formam seus ninhos no chão em raízes de árvores e troncos. Já a espécie *Oryzomys subflavus* (rato vermelho) geralmente predomina na fauna de pequenos roedores da mata, sendo responsável por grandes perdas em áreas cultivadas. Possuem comportamento solitário e hábitos exclusivamente noturnos. Quando molestados fogem aos saltos e costumam fazer seus ninhos com amontoados de folhas nas árvores, mas também se aproveitam de ocos de troncos secos. Considerando a espécie *R. rattus*, o rato de telhado, também conhecido como rato preto, rato de forro, rato de paiol, rato de silo ou rato de navio é o roedor comensal predominante na maior parte do interior do Brasil, sendo comum nas propriedades rurais e pequenas e médias cidades do interior. Por ser uma espécie arvícola, os ratos de telhado ainda cultivam o hábito de viver usualmente nas superfícies altas das construções, em forros, telhados e sótãos onde constroem seus ninhos, descendo ao solo em busca de alimento e água. Seu raio de ação é grande devido à habilidade em escalar superfícies verticais e à facilidade com que anda sobre fios, cabos e galhos de árvores (FUNASA, 2002).

Avaliando os roedores silvestres, algumas espécies têm distribuição cosmopolita, como o *R. rattus*, considerado o roedor predominante na maior parte do interior do Brasil e, até então, incriminado na participação do ciclo do tifo murino, cujo agente etiológico é a *R. typhi* transmitida por fezes de pulgas *Xenopsylla cheopis* (RIBEIRO et al., 2003).

2.3.4 Gambás

Os gambás, devido às suas características comportamentais, fisiológicas e morfológicas, principalmente ao alto grau de sinantropia e a importante relação ecológica parasito-hospedeiro, segundo Antunes (2005) apresentam grande importância na epidemiologia de doenças parasitárias, sendo reconhecidos como potenciais disseminadores de agentes etiológicos de zoonoses, definidas pela OMS como doenças naturalmente transmissíveis entre animais e o homem.

De acordo com Boostrom e cols. (2002), tornam-se necessárias investigações sobre o papel de animais não domésticos, como os roedores silvestres e do gênero os gambás que vivem próximos aos animais domésticos, no ciclo das riquetsioses, visto que os animais silvestres podem desempenhar um papel importante na cadeia epidemiológica das riquetsioses, podendo ainda representar um elo entre os ciclos silvestre e peridomiciliar dessas doenças. Essa característica é devido ao alto grau de sinantropia, demonstrando boa adaptação ao ambiente criado ou modificado pelo homem (HORTA et al., 2009)

Os gambás são mamíferos primitivos do gênero *Didelphis* pertencentes à ordem Marsupialia, considerados fósseis vivos por não terem sofrido muitas mudanças evolutivas ao longo de sua existência (ANTUNES, 2005). A Ordem Marsupialia está representada nas Américas, pelos gambás, cuícas e ratos marsupiais. A etimologia do nome popular gambá originou-se da língua tupi-guarani, *gã bá* ou *guaambá* que significa aberto ou oco, referente ao marsúpio (SECUTTI, 2004).

Segundo Austad (1988), esses mamíferos são amplamente distribuídos no continente americano, constituindo-se no gênero que possui umas das maiores distribuições, ocorrendo também numa grande variedade de habitats (CERQUEIRA, 1985). Eles podem ser encontrados, em várias regiões da América, como no Canadá, nos Estados Unidos, México, Argentina, Paraguai, Bolívia, Venezuela, Uruguai, Guianas (GARDNER, 1993), e especialmente no território brasileiro, onde poderemos encontrar as três espécies: *Didelphis aurita*, Gambá-de-orelha-preta, encontrado em todo o Estado de São Paulo, principalmente nas regiões de Mata Atlântica deste, e de outros estados próximos, com ocorrências no Norte do Rio Grande do Sul e Amazônia; *Didelphis albiventris*, Gambá-de-orelha-branca, encontrado na região Central, sendo também muito encontrado no Estado de São Paulo e; *Didelphis marsupialis*, Gambá-comum encontrado na região Amazônica (LONGO, 2007).

Estes marsupiais possuem uma grande importância ecológica devido a sua relação parasito-hospedeiro. Na revisão mais atual feita por Linardi (2006) de ectoparasitos de marsupiais brasileiros, *Didelphis* foi considerado o gênero mais importante por hospedar um elevado número de espécies. Os ectoparasitos de marsupiais brasileiros são pertencentes às classes Insecta e Arachnida, com destaque para as ordens Siphonaptera e Ixodida, conhecidos como pulgas e carrapatos, respectivamente. Alguns estudiosos acreditam que devido a essa significativa relação parasito-hospedeiro, exista certa especificidade entre esses animais (LINARDI et al., 1991; BOTELHO & LINARDI, 1996; BARROS & BATTESTI et al., 1998; BERGALHO & BOSSI, 2004).

A frequência cada vez maior dos gambás nas zonas urbanas e periurbanas são devido à ocupação de novas áreas ecológicas, ocorrendo uma maior exposição dos homens a esses animais e as infecções transmitidas por eles. Como relatado pela OMS (2003), as doenças comunicáveis, comuns ao homem e aos animais, têm ganhado uma importância no mundo inteiro, levando ao melhor entendimento de sua epidemiologia, mecanismos de transmissão ao homem, diagnóstico, prevenção e controle. A migração desses animais silvestres, assim como o seu comércio são, também, uma ameaça constante, podendo ocasionar surtos de doenças ainda desconhecidas.

Os gambás são abundantes em praticamente todas as áreas endêmicas para a FMB, sendo comumente parasitados por larvas e ninfas de *A. cajennense* (HORTA et al., 2009) e susceptíveis à infecção pela *R. rickettsii* (MOREIRA & MAGALHÃES, 1935; HORTA et al, 2005; HORTA, 2009). Os únicos isolamentos de *R. rickettsii* diretamente de animais no Brasil foram obtidos em gambás naturalmente infectados nos Estados de Minas Gerais e São Paulo, ainda na década de 1930 (MOREIRA & MAGALHÃES, 1935). Nos Estados Unidos, gambás (*Didelphis virginiana*) experimentalmente infectados com *R. rickettsii* mantiveram riquetsemia por 3 a 4 semanas, sendo este o período riquetsêmico mais longo relatado em animais experimentalmente inoculados, casos estes testados e comprovados também no Brasil com *D. aurita* (BOZEMAN et al, 1967; HORTA et al, 2009). No entanto de acordo com a capacidade destes gambás riquetsêmicos em infectar carrapatos que se alimentam deles, atualmente pode concluir que os gambás desempenham o papel de hospedeiros amplificadores de *R. rickettsii* na natureza (HORTA et al, 2009).

Além da existência de hospedeiros mamíferos, a atividade humana, especialmente sobre a vegetação, tem um importante papel no surgimento e expansão das riquetsioses. O reflorestamento feito com arbustos e a prática agrícola de criar pequenos bosques intercalados com monoculturas de gramíneas favorecem a proliferação de artrópodes devida à formação de microclimas favoráveis e à abundância de cobertura do solo, a qual gera um excelente habitat para os mamíferos hospedeiros dos estádios intermediários (ATWOOD et al., 1965).

De acordo com Traub e Jellinson (1981), para que a manutenção das riquetsias na natureza seja estabelecida em uma determinada área, é necessário, em primeiro lugar determinar a espécie e número de prováveis vetores, seguido pela fauna de vertebrados domésticos e silvestres. Dessa forma, pode-se dizer que quanto maior a densidade populacional de hospedeiros, maior será a população de carrapatos. Por essa razão, nos ambientes silvestres, com o mínimo de intervenção humana, as

populações de carrapatos tendem a ser mais baixas, já que a densidade de hospedeiros (entendida aqui como oferta de alimento para os carrapatos) será significativamente menor (VIEIRA et al., 2004). Portanto, tem-se sugerido que animais como capivaras, roedores e gambás podem atuar no ciclo silvestre das riquetsias formando um elo entre os ciclos enzoóticos e zoonóticos das bactérias pertencentes ao GFM.

Para que uma população esteja estabelecida numa determinada área, há alguns requisitos para que os vertebrados sejam considerados bons amplificadores de riquetsia na natureza: serem abundantes em áreas endêmicas; serem susceptíveis à infecção pela riquetsia; e serem altamente prolíferos, garantindo assim a introdução constante de animais susceptíveis na população de vertebrados e a apresentação de bacteremia suficiente para ser considerado amplificador da infecção (LABRUNA, 2006).

2.4- IMPORTÂNCIA DA FEBRE MACULOSA

Notificada atualmente em quase todos os Estados Norte-Americanos (CDC, 2006) a febre maculosa foi reconhecida inicialmente em 1896 no Vale do Rio Snake em Idaho (HARDEN, 1990). Entre 1906 a 1909, Howard Taylor Ricketts conseguiu a transmissão da doença para porquinhos-da-Índia e incriminou o carrapato como vetor, observando riquetsias em tecidos de carrapatos. A partir de 1930 a doença foi identificada focalmente em países como o Canadá, México, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Brasil e Argentina (BUSTAMANTE & VARELA, 1947; PEACOCK et al., 1971; FUENTES, 1986; RIPOLL et al., 1999; SUCEN, 2006).

No Brasil, FMB é a doença riquetsial mais prevalente, sendo conhecida desde 1929, quando José Toledo Piza, em São Paulo, iniciou a distinção da febre maculosa das demais doenças exantemáticas (PIZA et al., 1932). Segundo dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2006), no período de 1995 a 2005, foram registrados 386 casos humanos de febre maculosa no Brasil, limitados a alguns municípios dos Estados de São Paulo (139 casos com letalidade de 42%), Minas Gerais (136 casos com letalidade de 22%), Espírito Santo (30 casos com letalidade de 23%), Rio de Janeiro (55 casos com letalidade de 24%) e Santa Catarina (26 casos, sem registro de óbitos) (BARCI & NOGUEIRA, 2005).

A FMB foi incluída na lista de doenças de notificação compulsória em todo o território nacional através da Portaria nº 1943/GM, de 18 de outubro de 2001 (BRASIL, 2001). Sendo a mais severa das riquetsioses, vem se consolidando como uma antropozoonose de difícil controle e associada a significativa morbidade e elevada letalidade (ANGERANI, 2004), sem o conhecimento das razões para a ocorrência de epidemia e extrema severidade da doença (WALKER, 2004).

A vigilância da FMB compreende a vigilância epidemiológica de casos humanos e de fatores biológicos de risco (vetores, reservatórios e hospedeiros), tendo como objetivos: (1) detectar e tratar precocemente os casos suspeitos visando a redução da letalidade; (2) investigar e controlar surtos, mediante adoção de medidas de controle; (3) conhecer a distribuição da doença segundo lugar, tempo e pessoa; (4) identificar e investigar os locais prováveis de infecção (LPI); e (5) recomendar e adotar medidas de prevenção e controle.

Apesar dos avanços significativos no conhecimento sobre as riquetsias no Brasil, incluindo a caracterização molecular de algumas espécies, várias e importantes perguntas ainda precisam ser respondidas. Alguns trabalhos (PHILIP et al., 1978; PINTER, 2003; OLIVEIRA et al., 2002; VIANA, 2002; HORTA, 2002) indicam que pelo menos duas espécies de riquetsias do GFM patogênicas (*R. rickettsii* e *R. felis*) devem circular nos focos endêmicos para FMB, porém seus ciclos não estão bem esclarecidos (NASCIMENTO & SCHUMAKER, 2004).

A doença é conhecida desde 1929 no Estado de São Paulo (PIZA, 1932), além do relato da ocorrência de casos em Minas Gerais (GALVÃO, 1988; GALVÃO et al., 2005), Rio de Janeiro (GONÇALVES et al., 1981), São Paulo (MELLES et al., 1992; LEMOS et al., 1994), Espírito Santo (SEXTON et al., 1993) e Bahia (MANCINI, 1983). Apenas os Estados de Minas Gerais e São Paulo mantêm uma vigilância da doença.

A partir da década de 40, ocorreu um declínio do relato de casos de riquetsioses na literatura médica, que levou à hipótese de que este fato tenha sido decorrente, entre outras causas, do uso mais disseminado dos antibióticos, já que o uso de cloranfenicol e tetraciclina de maneira indiscriminada pode ter mascarado o principal sinal clínico das riquetsioses até então conhecidas, em especial, a Febre Maculosa, ou seja, o exantema máculo-papular que em geral aparece por volta do 3º ou 4º dia de evolução da doença.

Em Minas Gerais, a febre maculosa passou novamente a ser descrita a partir da década de 80 sob a forma epidêmica e em "clusters", além de também ocorrer sob a forma de casos isolados. Do ponto de vista epidemiológico levantaram-se várias

hipóteses como determinantes do retorno da doença, entre elas a invasão de focos naturais e a disseminação da doença a partir da ação do homem nesses focos levando à formação de focos modificados (GALVÃO, 1988). O final da década de 1980 e o início da década de 1990 caracterizaram-se pelo aparecimento de casos em áreas periurbanas do Vale do Rio Doce, estado de Minas Gerais, como foi o caso de Caratinga em 1992 (GALVÃO, 1996), o que parece indicar uma expansão da doença devido a um novo reordenamento ecológico, sendo ainda decorrência do modo de vida dessas populações marginalizadas no contexto sócio-econômico.

A descrição de novos casos da doença e a rediscussão do problema das riquetsioses a partir da década de 1980, com casos relatados e publicados em Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (GALVÃO et al., 2003; GALVÃO et al., 2002), mostrou que provavelmente a febre maculosa nunca deixou de ocorrer. Esse achado epidemiológico inaugurou a época dos inquéritos sorológicos, realizados principalmente em áreas de ocorrência de um número maior de casos e considerados de risco.

Conclui-se que a inespecificidade da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) na distinção entre *R. rickettsii* e outras riquetsias do GFM, faz com que os inquéritos sorológicos sejam um instrumento limitado na identificação de áreas de risco para a doença, quando realizado em humanos e mesmo em animais de maneira isolada. O grande número de riquetsias não patogênicas dentro desse grupo contribui para essa limitação (GALVÃO et al., 2004).

2.5- IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE RIQUETSIAS

Tem sido fundamental a implementação de técnicas inovadoras que permitem a distinção entre as diferentes doenças riquetsiais (GALVÃO et al., 2004) destacando-se, aqui, além de técnicas de isolamento em cultivo celular, a aplicação de diagnóstico molecular, possibilitando, dessa forma, a descoberta de novas espécies de riquetsias em todo o mundo (EREMEEVA et al., 1994; BILLINGS et al., 1998), a caracterização molecular do gênero *Rickettsia*, bem como esclarecimentos importantes em relação a outras já descritas (FOURNIER et al., 1998).

O diagnóstico da FMB em humanos é considerado um desafio, já que a sintomatologia é inespecífica (GALVÃO et al., 2005).

Quanto aos aspectos clínicos da FMB em humanos, a mesma manifesta-se subitamente com febre contínua, calafrios, prostração, mal estar, mialgia, artralgia

principalmente nos tornozelos, punhos e cefaléia após um período de incubação de dois a 14 dias. Geralmente os exantemas surgem a partir do quarto dia instalando-se sob a forma de máculas róseas, de bordos mal definidos, com dois a seis milímetros de diâmetro que se distribuem centrípedamente pelo corpo: punhos, tornozelos, membros, troncos, face, palma das mãos e planta dos pés. Após 12 horas, a erupção se direciona para as partes centrais do corpo assumindo o aspecto maculo-papular e acentuando-se a tonalidade rósea sem ceder à vitropressão (MELLES et al., 1992). Decorridos mais quatro dias, o aspecto da doença se modifica surgindo petéquias que confluem-se formando o exantema equimótico, purpúrico e ligeiramente saliente ao tato. Por outro lado não se apaga à vitropressão e ao atrito, originando necroses locais.

Em estágios mais avançados o exantema evolui rapidamente para necrose nas extremidades dos dedos e orelhas (FONSECA & MARTINS, 2007). A convalescença se dá pela involução gradativa dos sinais da toxemia e por extensa descamação cutânea.

A taxa de letalidade da febre maculosa, se não tratada, atinge níveis de 60 a 80%. Geralmente a letalidade é influenciada pela idade do paciente, virulência da cepa da riquetsia e do sistema imunológico (PRICE, 1954).

Ao se replicar no endotélio vascular, uma vasculite se instala conduzindo a ativação de plaquetas, ativação do sistema de coagulação, trombose e aumento da permeabilidade vascular. Distúrbios hemostáticos, incluindo trombocitopenia e tempo prolongado de coagulação, estão relacionados com efeitos citopáticos celulares e atividades de endotoxinas da *R. rickettsii* (ANGERAMI et al., 2006; MELLES et al., 1992). Após as lesões iniciais nos endotélios, a *Rickettsia* pode infectar células adjacentes ou se aprofundar e chegar ao endotélio de tecidos musculares lisos (WALKER, 1989). Em estados clínicos mais severos, edemas pulmonares são observados, assim como falência renal. A entrada da bactéria no endotélio gera dúvidas quanto ao encaminhamento desta por sinais de receptores. Sinais digestivos e neurológicos também foram observados por Walker e cols. (1987).

Inicialmente, confronta-se sinais clínicos com achados laboratoriais e o histórico do paciente, além do histórico de parasitismo por carrapatos. A confirmação laboratorial pode ser através de isolamento do agente em amostras de sangue ou biópsia de pele e através de pesquisa de anticorpos específicos no soro do paciente.

Em 1921, Weil e Felix descobriram a ocorrência de uma reação de aglutinação em soros de pacientes com tifo epidêmico com cepas de *Proteus sp.* Desde então até

o ano de 1987, este foi o teste utilizado para detecção riquetsial em humanos (CALIC et al., 2004).

Atualmente o diagnóstico laboratorial de eleição segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) se dá através da sorologia pela técnica da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) com amostras pareadas, e deve ser considerado confirmatório um aumento no título em uma segunda amostra a ser realizada após intervalo de quinze dias (GALVÃO et al., 2005). A RIFI consiste na reação de soro da espécie a ser testada (humano, eqüino, canino) com células VERO infectadas por *Rickettsia sp.*, fixadas em lâminas de microscopia para fluorescência. A reação entre o antígeno fixado e o anticorpo presente nas amostras é visualizada após a adição de anti-imunoglobulina específica de cada espécie, conjugada com isotiocianato de fluoresceína. A detecção de IgM é uma forte evidência de riquetsiose ativa. Algumas espécies de riquetsias compartilham antígenos de superfície, o que pode ocorrer em reações cruzadas entre os biogrupos tifo e febres exantemáticas, diminuindo assim a especificidade do teste. Os anticorpos IgG, detectados cerca de uma semana após o início da infecção, são específicos dentro do biogrupo e podem permanecer por até quatro anos (CALIC et al., 2004). Somente é considerado positivo o título maior ou igual a 1:64. A RIFI apresenta uma especificidade de 100% e sensibilidade de 94 a 100%, porém não permite a identificação da espécie do agente dentro do grupo e pode apresentar títulos baixos ou até falsos negativos por influência de antibioticoterapia (CALIC et al., 2004; DEL GUERCIO et al., 1997). Utilizando-se sorologia, o diagnóstico se confirma através de investigação epidemiológica da área geográfica, das características ambientais, da época do ano e da presença de vetores e de hospedeiros (CALIC et al., 2004). O teste de hemolinfa, imunofluorescência direta, ELISA e reação em cadeia da polimerase são utilizados para detecção do agente em carrapatos e visam detectar a taxa de infecção da bactéria no vetor. As riquetsias também podem ser visualizadas pelo teste de hemolinfa promovendo uma rápida detecção do agente em carrapatos infectados (HORTA, 2002; ESTRADA, 2003). Esta prova é especialmente usada para selecionar um grande número de carrapatos infectados por bactérias, especialmente quando a prevalência é baixa ou desconhecida, como no caso de riquetsias do GFM (ESTRADA, 2003).

A partir da década de 1990, métodos moleculares (identificação genotípica) passaram a ser aplicados e atualmente são os de eleição para identificação específica das riquetsias, através do seqüenciamento de DNA de alguns fragmentos gênicos (PAROLA et al., 2005). Nos últimos 20 anos, o uso em conjunto da técnica de “*shell via*” para isolamento de riquetsias de amostras clínicas, seguida da identificação do

agente através de técnicas de caracterização molecular, tem proporcionado a descoberta de várias novas espécies de riquetsias, chegando a mais de 20 espécies válidas atualmente. Além disso, a distribuição geográfica das espécies previamente conhecidas tem aumentado substancialmente com o uso cada vez mais difundido dessas técnicas em diferentes partes do mundo (HECHEMY et al., 2003; PAROLA et al., 2005).

A análise da seqüência de nucleotídeos de determinados genes constitui um método bastante apropriado para identificação e análise filogenética de diferentes espécies de riquetsias (REGNERY et al., 1991). A aplicação da PCR oferece um ensaio rápido, sensível e altamente específico para detecção de riquetsias (AZAD et al., 1990). Além disso, a PCR permite, em uma etapa posterior, o seqüenciamento de nucleotídeos do gene amplificado. A identificação molecular de organismos do gênero *Rickettsia* através da PCR associada ao seqüenciamento é, atualmente, o método padrão para identificação e análise filogenética das diferentes espécies de riquetsias (REGNERY et al., 1991; LA SCOLA & RAOULT, 1997). Utilizando-se diferentes iniciadores de seqüências genômicas conhecidas, é possível obter diagnósticos diferenciados para uma determinada amostra. Algumas seqüências genômicas das riquetsias já têm suas funções fenotípicas e sua distribuição entre diversas espécies determinada (LA SCOLA & RAOULT, 1997).

A análise da seqüência de nucleotídeos do gene para rRNA 16S é útil para identificação a nível de gênero, mas desde que várias espécies partilham seqüências similares deste gene, o estudo do mesmo não fornece acurada identificação a nível de espécie (LA SCOLA & RAOULT, 1997).

Roux e cols. (2000), inferiram relacionamentos filogenéticos de espécies de riquetsias pela comparação de seqüências de evolução mais rápida do gene que codifica a enzima respiratória citrato sintase, mostrando que esta ferramenta é mais sensível que comparações feitas a partir de rRNA 16S. O gene da citrato sintase está presente em diversos organismos procariotos e por ser codificador de uma enzima de grande importância fisiológica, sofre uma elevada pressão seletiva para manter-se inalterada (INOKUMA et al., 2001) traduzindo para uma proteína altamente conservada. Assim, relacionamentos filogenéticos confiáveis, a partir da mesma, só poderiam ser obtidos entre riquetsias que divergiram precocemente do ancestral comum do GFM (FOURNIER et al., 1998), já que, como explicado por Raoult e cols. (1996), o gene não é divergente o suficiente para permitir distinção entre todas as espécies de riquetsias. Em acordo, Roux & Raoult (2000) relatam que seqüências

obtidas deste gene só diferiram significativamente entre organismos distantemente relacionados. O gene tem sido utilizado em combinação com outros para melhor caracterização de agentes riquetsiais (ROUX & RAOULT, 1995; FOURNIER et al., 1998; ISHIKURA et al., 2003) podendo identificar também outros gêneros, além de *Rickettsia* (ISHIKURA et al., 2003).

Azad e cols. (1990), propuseram iniciadores que identificam uma seqüência do gene 17kDa, que codifica para um antígeno de superfície de membrana gênero específico, podendo ser utilizados em conjunto com iniciadores internos (“*nested primers*”) da mesma seqüência, o que aumenta a sensibilidade da técnica (SCHRIEFER et al., 1994).

Para a detecção de riquetsias do GFM, foram também propostos iniciadores que localizam as seqüências genômicas responsáveis por codificar as proteínas de membrana OmpA e OmpB, 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; EREMEEVA et al., 1994).

Baseando-se em análise de PCR-RFLP do gene que codifica a proteína OmpA, foi realizada por Regnery e cols. (1991) a diferenciação de nove espécies de riquetsias do GFM estudadas. Posteriormente, Eremeeva e cols. (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 OmpB.

No Brasil, a investigação molecular de riquetsias tem sido realizada através da amplificação por PCR e seqüenciamento de fragmentos de DNA dos genes para as proteínas 17kDa, citrato sintase e OmpA, bem como por análise de PCR/RFLP, permitindo avanços significativos no conhecimento das riquetioses neste país, incluindo a caracterização molecular de algumas espécies, principalmente nos estados de Minas Gerais, como a detecção da *R. felis* em pulgas *Ctenocephalides* (OLIVEIRA et al., 2002; CARDOSO, 2004) e de São Paulo (HORTA, 2002; NASCIMENTO, 2003; PINTER, 2003; SANTOS, 2003; LABRUNA et al., 2004b; HORTA et al., 2006; PINTER & LABRUNA, 2006; SILVEIRA et al., 2007) e em carrapatos do gênero *Amblyomma* (HORTA, 2002; VIANNA, 2002; GALVÃO et al., 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 & SCHUMAKER, 2004).

De acordo com Labruna e cols. (2004) o baixo número de espécies de riquetsias relatadas é um resultado de poucos estudos e, certamente aumentará quanto mais áreas forem investigadas. Além disso, 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 febre maculosa 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, 2004). Ainda, dúvidas quanto ao papel de animais silvestres e de determinadas espécies de carrapatos na circulação de rickettsias GFM precisam ser esclarecidas (NASCIMENTO & SCHUMAKER, 2004).

Diante disto, como ressalta (NASCIMENTO & SCHUMAKER, 2004), maiores investimentos em estudos, de campo e laboratoriais, visando um melhor entendimento sobre as riquetsioses, precisam ser realizados, visando permitir o planejamento e a implantação de medidas de prevenção e controle destas enfermidades em diferentes ecossistemas e biomas terrestres.

III- OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ocorrência da Febre Maculosa Brasileira e outras riquetsioses em regiões endêmicas com diferentes características epidemiológicas: Santa Cruz do Escalvado e Pingo D'Água, Estado de Minas Gerais, bem como o papel de animais silvestres, sinantrópicos e ectoparasitas no ciclo de desenvolvimento destes agravos de saúde.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Identificar espécies de animais silvestres e sinantrópicos de ocorrência nas áreas de estudo
- 2- Identificar artrópodes ectoparasitas de ocorrência nos animais silvestres, domésticos e sinantrópicos das áreas em estudo

- 3- Investigar pela Reação de Imunofluorescência Indireta com o uso de antígenos específicos, a presença de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii*, anti-*Rickettsia felis*, anti-*Rickettsia parkeri*, anti-*Rickettsia bellii*, anti-*Rickettsia amblyommii* e anti-*Rickettsia rhipicephali* em soros obtidos de roedores, gambás, cães e eqüinos;
- 4- Investigar a ocorrência de bactérias do gênero *Rickettsia* em artrópodes vetores (pulgas e carrapatos), em tecidos de roedores, em *swabs* anal e sangue de gambás, por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com o uso de oligonucleotídeos específicos;
- 5- Caracterizar riquetsias encontradas nos ectparasitas e seus hospedeiros, através de técnica de sequenciamento e análise filogenotípica das amostras de DNA;
- 6- Caracterizar os municípios de estudo quanto a ocorrência de riquetsioses do Grupo das Febres Maculosas.

IV- METODOLOGIA

Este trabalho foi realizado nos municípios de Santa Cruz do Escalvado e Pingo D'Água, estado de Minas Gerais.

4.1- CARACTERÍSTICAS GEOGRÁFICAS DE SANTA CRUZ DO ESCALVADO

O município de Santa Cruz do Escalvado localiza-se na Zona da Mata, pertencente à Bacia Hidrográfica do Vale do Piranga, nascente do Rio Doce, estado de Minas Gerais, distante 205km de Belo Horizonte, como observado na figura 1. Apresenta uma área total de 258.34km², com 87 localidades e população estimada em 5.321 habitantes, sendo que 80% dos mesmos vivem na zona rural dedicados principalmente às atividades agropecuárias (IBGE, 2009). Destas atividades destacam-se, o cultivo de cana-de-açúcar, a criação de gado bovino e a produção de leite, além dos cultivos de milho, feijão, arroz, café e a fruticultura, em grande parte caracterizada como agricultura de subsistência. Com o apoio do Programa Nacional de Agricultura Familiar (PRONAF), desenvolvem-se, ainda, a produção de laticínios, rapaduras e de cachaça.



Figura 1: Município de Santa Cruz do Escalvado (a: Localização geográfica onde está situado o município; b: Praça central da cidade)

A sede encontra-se a $20^{\circ}13'36''$ de latitude sul e $42^{\circ}49'24''$ de longitude oeste, na altitude de 412m (IBGE, 2008). As habitações rurais são típicas do interior mineiro, com construções de casas a “pau-a-pique” e paióis (Figura 2), favorecendo o desenvolvimento de diversos vetores precursores de doenças e possíveis reservatórios das mesmas.



Figura 2: Típicas habitações rurais no município de Santa Cruz do Escalvado

O município de Santa Cruz do Escalvado está inserido em uma região que se caracteriza por uma topografia predominantemente montanhosa e ondulada, sendo que o acidente topográfico mais importante do município, responsável pelo seu próprio nome é a Pedra do Escalvado.

Por estar inserido na região da Zona da Mata, o município possui uma vegetação acometida por uma devastação generalizada, possuindo pequenas manchas de matas residuais, sendo todo ele secundário o que pode ser comprovado observando as copas de embaúbas brancas que são características de regiões de desmatamento.

O município é banhado pelas águas do Rio Doce desde a localidade chamada Taboão até a divisa com o Município de Rio Casca e da localidade de São Sebastião de Soberbo até a divisa com o município de Ponte Nova, sendo o restante banhado por pequenos córregos.

Entre os municípios de Rio Doce e Santa Cruz do Escalvado, localiza-se a Usina Hidrelétrica do Candonga (Risoleta Neves) (Figura 3). O empreendimento foi construído em parceria entre a Companhia Vale do Rio Doce e Alcan Alumínio do Brasil. Para a realização da construção dessa Usina, a localidade de São Sebastião do Soberbo, pertencente à Santa Cruz do Escalvado, foi inundada pelas águas da barragem que ali se formou. A área inundada pelo reservatório da usina é equivalente

a 2.830km² no território dos dois municípios. Todas as 120 famílias, que compunham a comunidade de São Sebastião do Soberbo foram transferidas das áreas que tradicionalmente residiam, para ceder lugar ao lago da hidrelétrica, se mudando para um núcleo urbano, completamente novo e dotado de infraestrutura básica essencial, incluindo escola, igrejas, posto de saúde, vias asfaltadas, tratamento de água, esgoto e luz elétrica dentre outras facilidades. Esta comunidade construída pelo consórcio foi batizada de Nova Soberbo. A paisagem após a implantação da barragem foi totalmente modificada.



Figura 3: Usina hidrelétrica de Candonga (a: lago da usina; b: barragem da usina hidrelétrica de Candonga; Fonte: Construtora OAS)

Apesar de o município apresentar casos de doenças como dengue e chagas, atualmente a leishmaniose tegumentar é a zoonose de maior preocupação, sendo notificados sete casos em 2005 e 14 em 2006. Além dessas enfermidades, Santa Cruz do Escalvado foi considerada área endêmica para FMB no final da década de 80, mantendo-se como foco silencioso há 29 anos. Levando em conta os resultados sobre a endemidade da FMB obtidos nesse município (Lemos, 1991; Pena et al, 2009), optou-se por selecionar áreas diferentes das abordadas por Pena e cols. (2009). Por esse motivo foram escolhidas áreas aleatórias dentro e distante da cidade a fim de estarmos coletando animais domésticos e silvestres com o objetivo principal de estudar o comportamento da FMB e outras riquetsioses em área de baixa endemidade.

4.2- CARACTERÍSTICAS GEOGRÁFICAS DE PINGO D' ÁGUA

O município de Pingo D'Água é relativamente novo, tendo sido emancipado do município de Córrego Novo em 21 de dezembro de 1995, através da lei Estadual N.º 12030. Seus municípios limítrofes são Córrego Novo, Dionísio, Marliéria e Bom Jesus do Galho. Possuindo uma área de 66,85 Km², está localizado na micro-região da Vertente do Caraparó no Leste Mineiro, entre os municípios de Caratinga e Timóteo, distante de Belo Horizonte 250 Km (Figura 4). A sede do município situa-se a 350 metros de altitude. O município integra a área de entorno do Parque Estadual do Rio Doce, criado em 1944. A população total do município é de 4.016 habitantes, sendo que mais de 90% se encontram na zona urbana.



Figura 4: Município de Pingo D'Água (A: localização geográfica)

A base econômica do município sustenta-se em pequenas áreas de agricultura e agropecuária, sendo a maior parte do território do município ocupada por florestas de eucalipto das empresas Acesita e Cenibra Florestal.

Dentre as principais culturas do município podemos citar o plantio de arroz, milho, feijão em pequenas áreas de arrendamento cedidas pelas empresas e por pequenos produtores. A cultura em maior escala é a do quiabo.

O clima predominante na região é o tropical, com duas estações bem definidas, ou seja, inverno ameno e seco, e verão com temperaturas altíssimas e chuvoso.

A cobertura vegetal no município em áreas nativas é característico do bioma Mata Atlântica com árvores de grande porte e espécies variadas, em pequenas

reservas não totalmente preservadas. A cobertura vegetal predominante é a de reflorestamento de eucalipto (Figuras 5).

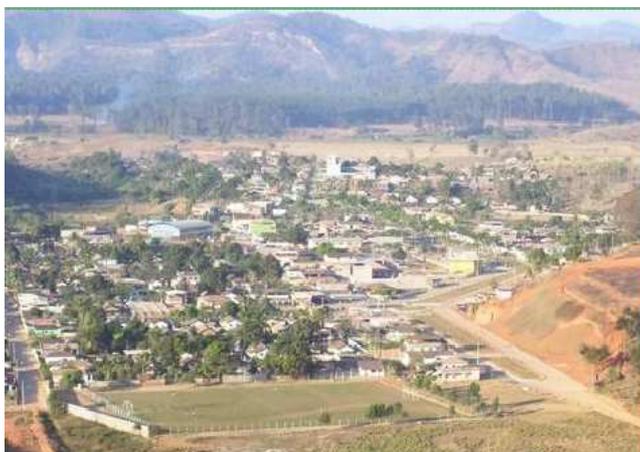


Figura 5: Foto parcial da cidade e características do município de Pingo D' Água, estado de Minas Gerais.

O município de Pingo D' Água foi escolhido para tal estudo devido a um caso de febre maculosa ocorrido neste município no ano de 2003. Este caso foi notificado pela Diretoria de Ações Descentralizada de Saúde (DADS) de Coronel Fabriciano. Sendo assim toda a coleta de sangue e ectoparasitas dos animais desta região, seguiu o traçado desse caso relatado conforme relatado pela vítima acometida com tal patologia, desde sua casa até o seu trabalho. Merece citação o fato do indivíduo acometido utiliza-se de cavalos como meio de transporte para chegar até seu local de trabalho, com o mesmo sendo mantido preso próximo a sua habitação durante a noite.

4.3- CAPTURAS DE ANIMAIS

Para a captura de gambás de vida livre foram tomadas algumas precauções. Devido às características ambientais, como as variações climáticas, e as relações dos gambás com estas, além das próprias peculiaridades do animal como comportamento e reprodução. Foi estipulado que as capturas de roedores e gambás ocorreriam em Pingo D' Água entre julho de 2005 a maio de 2006, e em Santa Cruz do Escalvado foram entre os meses de junho de 2006 a dezembro de 2007, sendo obedecida uma frequência trimestral. As armadilhas foram montadas no período vespertino e verificadas no período matutino por dois dias consecutivos tanto para captura de gambás quanto para captura de roedores.

Juntamente com a ajuda de profissionais cedidas pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), regional Caratinga; as armadilhas de arame do tipo *live-trap*, com dimensões de 20x20x40cm para captura de gambás e roedores foram montadas em locais próximos às habitações, incluindo garagens, galpões de estoques de alimentos, plantações de milho, bambuzais, depósitos de lixo e próximos ao peridomicílio (Figura 6). As armadilhas de gambás eram lavadas após a captura dos animais, de modo a eliminar os odores naturais deixado por alguns destes mamíferos, conforme recomendação de outros autores (LINARDI & GUIMARÃES, 2000).



Figura 6: Armadilha de arame do tipo *live-trap* utilizado na captura de gambás. Área próxima ao domicílio onde eram instaladas as armadilhas.

Para atuação dos gambás utilizou-se banana com pasta de amendoim, e fermentado de cana de açúcar. Após as capturas, os animais foram anestesiados, identificados por sexo e fotografados para uma posterior identificação no laboratório de Zoologia dos Vertebrados da Universidade Federal de Ouro Preto. Para o critério da identificação foi avaliada a região da captura do animal, devido ao regionalismo da espécie, e as características morfológicas. Após a captura dos gambás, procedeu-se a sedação dos mesmos com quetamina (Vetaset, Quetamina 50, Vetanarcol). Em

seguida, realizou-se a colheita de sangue por via intracardíaca ou intracaudal conforme a viabilidade destes. Uma vez colhido o sangue, foi feita a passagem de uma haste com algodão na região anal, afim de obtermos swab anal destes animais (Figura 7). Cada animal foi minuciosamente examinado para a coleta dos ectoparasitas. Os gambás foram marcados através de perfuração auricular (2mm), para que pudessem ser identificados no caso de serem novamente capturados. Após os procedimentos, os animais foram liberados no mesmo local onde foram encontrados, após verifica-se o retorno completo do estado de anestesia do animal.



Figura 7: Coleta de swab anal e sangue por punção cardíaca

A manipulação dos roedores após sua captura foi realizada em total com o uso de equipamentos de proteção individual, visando atender as exigências de biossegurança. Esses roedores foram anestesiado com doses excessiva de anestésio, sendo após este procedimento, submetido a coleta de amostras de sangue através de punção intra-cardíaca e vísceras-fígado e baço (Figura 8), para posterior verificação da presença de riquetsias através de PCR em tecidos, bem como verificados quanto a presença de ectoparasitas por meio da técnica de escovação.



Figura 8: Coleta de sangue e tecidos dos roedores

Os cães e eqüinos foram abordados, identificados por sexo e local de origem da mesma forma nos dois municípios estudados, sendo inspecionados quanto à presença de carrapatos e pulgas. Em seguida coletou-se cerca de 10 mL de sangue através de venocentese da veia cefálica em cães e da artéria jugular em eqüinos para avaliação sorológica como observado na Figura 9.



Figura 9: Coleta de sangue de cães e eqüinos

Posteriormente, o sangue coletado dos animais, foram centrifugados a 3.000rpm por 10 minutos no próprio local da extração, para obtenção do soro, os quais foram devidamente identificados e acondicionados para transporte até o Laboratório de Epidemiologia Molecular da UFOP, onde foram armazenados a -20°C até a realização dos ensaios sorológicos.

4.4- COLETA DE ECTOPARASITAS

O cronograma da coleta foi estabelecido nos dois municípios de estudo, de acordo com a variação sazonal dos ectoparasitas (carrapatos), trimestral, a fim de obtermos amostras de todas as fases parasitárias dos ectoparasitas, sendo os mesmos coletados em fase parasitária e alguns em fase de vida livre. Os carrapatos e pulgas foram coletados ativamente pela busca no corpo dos animais presentes no local, os quais foram examinados quanto à presença dos mesmos. A coleta foi feita manualmente, sendo os ectoparasitas acondicionados em recipiente apropriado para posterior identificação. Nos roedores e marsupiais, a coleta foi feita através do método do penteado (Figura 10).



Figura 10: Coleta de ectoparasitas através do processo de escovação em gambás e roedores.

Posteriormente, os artrópodes foram transportados para o Laboratório de Parasitologia e Epidemiologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa (UFV), sob a orientação do Prof. Dr. Cláudio Mafra, onde foram taxonomicamente identificados de acordo com a chave dicotômica e pictória descrita por Aragão & Fonseca (1961); Linardi & Guimarães (2001). Em seguida, foram separados segundo gênero, espécie, sexo e estágio de desenvolvimento, agrupados em lotes de 1 a 5 indivíduos de acordo com o hospedeiro. Esses pools de ectoparasitos foram armazenados a -20°C até a extração de DNA.

4.5 - EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA dos ectoparasitos foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Billings e colaboradores (1998). Cada *pool* de ectoparasitas foi lavado com etanol 70% em quantidade suficiente para cobrir os ectoparasitos durante 15 minutos. Em seguida, foram lavados em tampão fosfato (PBS pH 7,2) por 5 minutos (duas vezes). Foram adicionados 200 μL do tampão fosfato para maceração dos vetores, os quais foram triturados com auxílio de uma ponteira de polietileno. No mesmo tubo foram acrescentados SDS 10% v/v e Proteinase K (20mg/mL) para uma concentração final de 1% e, em seguida, incubados em banho-maria a 55°C *overnight*. À amostra digerida, acrescentou-se 200 μL de fenol:clorofórmio (1:1), submetendo-a a centrifugação (12000 x g, 2 minutos). A fase aquosa foi retirada e o sobrenadante

transferido para um tubo novo. Esse procedimento foi repetido 6 vezes. Ao sedimento, foram adicionados 200 μ L de clorofórmio, seguido de uma nova centrifugação. O sobrenadante foi novamente transferido para um tubo estéril, sendo acrescido 40 μ L de NaCl 2,5M, 200 μ L de clorofórmio e dois volumes de etanol 100% gelado. Os tubos foram armazenados a -20°C overnight. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12000 x g sob temperatura de 4°C por 15 minutos. Ao sedimento restante, foram adicionados 300 μ L de etanol 70% e novamente centrifugados a 13000 rpm sob temperatura de 4°C por 15 minutos, para ressuspender o DNA previamente precipitado. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o precipitado resuspenso em 100 μ L de água estéril, destilada e deionizada e posteriormente, armazenados a -4°C. Desse material foram retirados 20 μ L para quantificação em espectrofotômetro (260 nm), sendo todas as amostras ajustadas para concentração de 50 ng/ μ L.

A extração de DNA de tecidos (fígado e baço) de roedores foi adaptada de acordo com o protocolo descrito por Sambrook e colaboradores (1989).

Fragmentos de tecidos armazenados em etanol foram triturados com a ajuda de um bisturi estéril. Em seguida, foram transferidos aproximadamente 50 mg para um tubo novo. Foram adicionados 500 μ l de tampão de lavagem (100mM Tris-HCl, pH 8,0; 100mM EDTA, pH 8,0) e posterior centrifugação (12000g; 10 minutos). O sobrenadante foi descartado e, ao precipitado foram adicionados 500 μ l do tampão de digestão (10mM Tris-HCl, pH 8,0; 40 mM EDTA, pH 8,0) acrescido de 12,5 μ l de Proteinase K (20mg/ml) e em seguida, incubados em banho-maria a 55°C *overnight*. Posteriormente, o DNA foi purificado com uma extração de fenol-Tris (pH 8,0) seguida de duas extrações de fenol:clorofórmio (1:1). Para a precipitação do DNA utilizou-se acetato de amônia (200 mM) e álcool isopropílico na proporção de 1:1 permanecendo incubado a -20°C *overnight*. Em seguida, o DNA foi lavado com 100 μ l de etanol (70%) e ressuspenso em 100 μ l de água deionizada estéril, sendo em seguida armazenado a -20°C, para posterior quantificação. Desse material também foram retirados 20 μ L para quantificação em espectrofotômetro (260 nm), sendo todas as amostras ajustadas para concentração de 50 ng/ μ L.

4.6 - OBTENÇÃO DO CONTROLE POSITIVO

4.6.1 Cultura de Células Vero e Infecção com *Rickettsias*

Uma monocamada de células Vero foi obtida por incubação a 37°C, por 24 horas em estufa de CO₂, em frasco contendo meio essencial mínimo (IMEM) enriquecido com 10% de soro bovino fetal e L-glutamina (2 mM). Obtida a monocamada nas condições descritas acima, a cultura foi infectada com *R. parkeri*. As células infectadas foram mantidas em estufa, a 32°C por aproximadamente 5 dias (até começarem a se desprender da parede da garrafa de cultura). Assim, no quinto dia pós-infecção uma pequena porção de células foi retirada para visualização e controle da infecção, sendo as riquétsias visualizadas em microscópio ótico através da coloração de Gimenez. O DNA foi obtido das células infectadas, utilizando-se o mesmo protocolo para extração de DNA de tecidos.

4.7 - REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Cada amostra de DNA extraído foi testada por PCR para a pesquisa de DNA de *Rickettsia* spp. através da amplificação de um fragmento de 401 pares de bases do gene citrato sintase (*gltA*), detectado em todas as espécies de *Rickettsia*, utilizando-se um par de oligonucleotídeos iniciadores, denominados de CS-62 (GCA AGT ATC GGT GAG GAT GTA AT) e CS-462 (CTT CCT TAA AAT TCA ATA AAT CAG GAT G) (LABRUNA, et al. 2004). O gene *ompA*, presente apenas em rickettsias do grupo da febre maculosa, foi utilizado para a confirmação da infecção por *Rickettsia* spp, empregando-se oligonucleotídeos iniciadores Rr190.70 (ATGGCGAATATTTCTCCAAAA) e Rr.190.602 (AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT) que amplifica um fragmento de 532 pares de bases, presente apenas em rickettsia do GFM (REGNERY et al. 1991).

Para cada reação, foram utilizados um controle positivo (DNA de *Rickettsia rickettsii*) e quatro controles negativos (água) para os genes *gltA* e *ompA*. O volume utilizado para a reação de PCR foi de 50 µl por tubo de amostra, sendo 43 µl de mix e 7 µl de DNA. O mix para a reação de PCR foi preparado com 17,7 µl de água ultramente purificada autoclavada, 10 µl de DNTP; 5 µl buffer; 4 µl de MgCl₂; 3 µl

primer senso; 3 µl primer anti-senso; 0,3 µl Taq DNA polimerase. Os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1,5% utilizando 10 µl de produto de PCR e, posteriormente, corada em brometo de etídio e examinada à transluminação com luz ultravioleta.

4.8 - SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

Fragmentos de DNA amplificados por PCR foram purificados com o produto comercial EXOSAP-IT (USB Corporation) e submetidos a reações de seqüenciamento utilizando o iniciador CS-62 e o CS-462, o kit Big Dye Termintor (Perkin Elmer), de acordo com especificações do fabricante, em seqüenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer).

As sequências obtidas, após a remoção das ambigüidades e incertezas, foram comparadas quanto à homologia com sequências de nucleotídeos depositados no GeneBank, o programa BLASTn. Apresentamos neste trabalho os resultados dos alinhamentos cujo Evalue foi igual a 0,00.

4.9 - AVALIAÇÃO SOROLÓGICA

A avaliação sorológica foi realizada em parceria com a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), no Laboratório de Doenças Parasitarias (LDP), sob a orientação do Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna. As amostras de soros dos animais foram testadas inicialmente para *R. rickettsii*, porém só as amostras positivas para esse antígeno foram testadas para outros tipos de antígenos.

4.9.1 Produção de Lâminas de Antígeno

Para a confecção das lâminas contendo antígeno específico de *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyomma*, *R. felis*, *R. belli* e *R. rhipicephali*, foi adotado procedimento conforme descrito a seguir.

Resumidamente as lâminas foram incubadas em acetona por 15 minutos dentro do fluxo laminar devido à toxicidade. Após a secagem das mesmas, realizou-se a limpeza com etanol absoluto e distribuição delas sobre a superfície do fluxo. Em seguida colocou-se em cada poço da lâmina, com assistência de uma haste flexível a solução de poli-L-lisina (Sigma-Aldrich Co., EUA). Mantiveram-se as lâminas distribuídas sobre a superfície para uma nova secagem e aplicação do antígeno.

O antígeno foi produzido, a partir de infecção com a taxa de 90 a 100% feita em cultivo celular por *Rickettsia*. O grau de infecção foi verificado com o microscópio óptico, pela coloração de Gimenez (1964). Procedeu-se então a raspagem das células juntamente com o meio, com auxílio de um raspador plástico descartável. O conteúdo das garrafas foi colocado em tubo tipo *Falcon* de 50ml, sendo realizado centrifugação em centrífuga refrigerada com uma F_c de 1832,76N, por 5 minutos e 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em 16mL de PBS, contendo 10% de soro de bezerro bovino e 0,01% de azida sódica. Após uma nova centrifugação com as mesmas condições, o sobrenadante foi descartado em uma nova ressuspensão realizada com 16mL de PBS.

Com ajuda de um micro-pipetador multicanal, colocou-se 10µl dessa suspensão em cada poço da lâmina, visando atingir aproximadamente 10.000 células por poço. As lâminas permaneceram dentro do fluxo até a secagem total. Depois, foram submersas em acetona por 10 minutos para fixação do material, secadas e armazenadas a -70°C.

4.9.2 Reação de Fluorescência Indireta

Alíquotas de soro diluído 1:64 de cães, eqüinos, roedores e gambás diluídas em tampão fosfato (PBS pH 7,4) foram depositadas sobre lâminas contendo antígeno específico de *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. felis*, *R. amblyommii*, *R. bellii* e *R. rhipicephali* e incubadas a 37°C por 30 minutos em câmara úmida. A cada lâmina foi adicionado o conjugado total Fluorine H (Biolab, Brasil) anti-cão, anti-eqüino, anti-gambá e anti-ratos, marcados com isotiocianato de fluoresceína pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Os soros foram testado na diluição de 1:64, sendo este o ponto de corte utilizado (DUMLER & WALKER, 1994).

Em seguida, as lâminas foram lavadas duas vezes em tampão de lavagem (PBS + Triton 100x a 0,1%) por 15 minutos e secas a temperatura ambiente. À diluição do conjugado foi específica para cada animal, sendo para os cães de 1:400, eqüinos 1:800, gambás 1:400 e roedores 1:200; em seguida foram adicionados 15µl em cada poço da lâmina. Sendo que o conjugado utilizado para cães, eqüinos e roedores (anti-rattus), Sigma, EVA) e conjugado anti-*Didelphis* spp (Centro de Controle de Zoonoses/SP). Uma nova incubação foi realizada nas mesmas condições anteriores (37°C por 30 minutos) sendo em seguida feita a lavagem com tampão de lavagem acrescido de Azul de Evans (0,1%). As lâminas foram secas em câmara escura. Antes de fazer a leitura e a interpretação das reações em microscópio de fluorescência epifluorescente, foram adicionadas de 2 a 3 gotas de glicerina tamponada sobre cada lâmina, cobrindo-a com lamínula. Foram considerados positivos os títulos iguais ou superiores a 1:64. A leitura foi realizada em microscópio epifluorescente no referido laboratório. Os protocolos utilizados seguiram as recomendações de Walker e cols. (1992).

V- RESULTADOS

5.1- CAPTURA DE ANIMAIS E COLETA DE DADOS

Foram realizadas 10 visitas em intervalos trimestrais ao município de Santa Cruz do Escalvado, entre 28 de setembro de 2005 e 11 de dezembro de 2007, para

captura de gambás. Com a captura variando entre um a oito animais por coleta, o número total de gambás capturados foi de 38, sendo 23 machos e 15 fêmeas. Todos os gambás foram identificados como sendo da espécie *Didelphis aurita* (Tabela 1).

Tabela 1- Dados da captura de gambás com relação à data da coleta, espécie encontrada e sexo no município de Santa Cruz do Escalvado, estado de Minas Gerais.

IDENTIFICAÇÃO	DATA DA CAPTURA	ESPÉCIE	SEXO
G1	28/9/2005	<i>Didelphis aurita</i>	Macho
G2	30/11/2005	<i>Didelphis aurita</i>	Fêmea
G3	30/11/2005	<i>Didelphis aurita</i>	Macho
G4	30/11/2005	<i>Didelphis aurita</i>	Macho
G5	30/11/2005	<i>Didelphis aurita</i>	Macho
G6	8/3/2006	<i>Didelphis aurita</i>	Fêmea
G7	8/3/2006	<i>Didelphis aurita</i>	Fêmea
G8	8/3/2006	<i>Didelphis aurita</i>	Macho
G9	1/6/2006	<i>Didelphis aurita</i>	Macho
G10	20/9/2006	<i>Didelphis aurita</i>	Macho
G11	20/9/2006	<i>Didelphis aurita</i>	Fêmea
G12	20/9/2006	<i>Didelphis aurita</i>	Fêmea
G13	20/9/2006	<i>Didelphis aurita</i>	Macho
G14	20/9/2006	<i>Didelphis aurita</i>	Macho
G15	7/12/2006	<i>Didelphis aurita</i>	Macho
G16	7/12/2006	<i>Didelphis aurita</i>	Macho
G17	7/12/2006	<i>Didelphis aurita</i>	Fêmea
G18	7/12/2006	<i>Didelphis aurita</i>	Macho
G19	7/12/2006	<i>Didelphis aurita</i>	Fêmea
G20	7/12/2006	<i>Didelphis aurita</i>	Macho
G21	8/3/2007	<i>Didelphis aurita</i>	Macho
G22	8/3/2007	<i>Didelphis aurita</i>	Fêmea
G23	8/3/2007	<i>Didelphis aurita</i>	Fêmea
G24	8/3/2007	<i>Didelphis aurita</i>	Macho
G25	5/7/2007	<i>Didelphis aurita</i>	Macho
G26	5/7/2007	<i>Didelphis aurita</i>	Fêmea
G27	5/7/2007	<i>Didelphis aurita</i>	Macho
G28	5/7/2007	<i>Didelphis aurita</i>	Fêmea
G29	11/9/2007	<i>Didelphis aurita</i>	Macho
G30	11/9/2007	<i>Didelphis aurita</i>	Macho
G31	10/12/2007	<i>Didelphis aurita</i>	Macho
G32	10/12/2007	<i>Didelphis aurita</i>	Fêmea
G33	10/12/2007	<i>Didelphis aurita</i>	Fêmea
G34	10/12/2007	<i>Didelphis aurita</i>	Fêmea

G35	10/12/2007	<i>Didelphis aurita</i>	Macho
G36	10/12/2007	<i>Didelphis aurita</i>	Macho
G37	10/12/2007	<i>Didelphis aurita</i>	Macho
G38	10/12/2007	<i>Didelphis aurita</i>	Fêmea

O número de gambás capturados em cada coleta teve uma variação significativa, como observado no Gráfico 1, devido provavelmente à estrutura populacional destes animais ao longo do ano, decorrente das condições ambientais e características dos indivíduos. Os meses em que houve uma maior captura de gambás foi dezembro de 2006 e dezembro de 2007, com um total de 13 animais capturados, sendo os meses com menor captura de gambás foram setembro de 2005 e junho de 2006, com um total de apenas dois animais capturados.

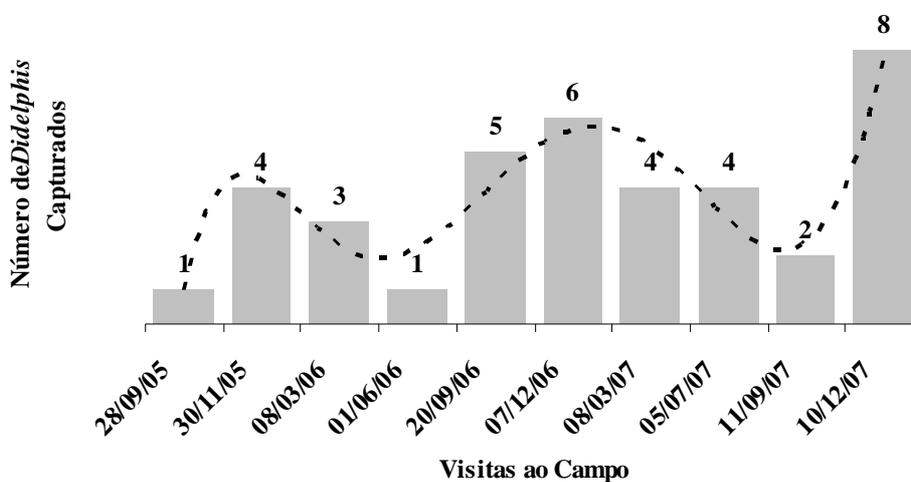


Gráfico 1: Distribuição do número de gambás capturados em cada atividade de coleta entre os meses de setembro de 2005 a dezembro de 2007 no município de Santa Cruz do Escalvado, estado de Minas Gerais.

A partir de agosto de 2006 a dezembro de 2007, incluiu-se a captura de roedores, cães e eqüinos. Esses procedimentos foram realizados com o apoio de servidores da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), Diretoria Regional de Caratinga. Nestas visitas foram capturados ao todo 62 roedores, os quais foram identificados como *Nectomys squamipes* (23), *Oryzomys subflavus* (2), *Rattus rattus* (32) e *Akodon* sp (5) (Tabela 2), além da coleta de soro e ectoparasitas de 66 equinos e 67 cães.

Tabela 2- Dados da captura de roedores com relação a data da coleta, espécie encontrada, local de coleta e sexo no município de Santa Cruz do Escalvado, estado de Minas Gerais.

IDENTIFICAÇÃO	DATA	SEXO	ESPÈCIE	LOCAL
---------------	------	------	---------	-------

R1	1/6/2006	Macho	<i>Rattus rattus</i>	Capim
R2	1/6/2006	Fêmea	<i>Rattus rattus</i>	Capim
R3	1/6/2006	Macho	<i>Rattus rattus</i>	Capim
R4	1/6/2006	Fêmea	<i>Rattus rattus</i>	Capim
R5	1/6/2006	Fêmea	<i>Akodon</i> sp.	Capim
R6	1/6/2006	Macho	<i>Nectoys squamipes</i>	Brejo
R7	1/6/2006	Macho	<i>Nectoys squamipes</i>	Brejo
R8	1/6/2006	Macho	<i>Nectoys squamipes</i>	Brejo
R9	1/6/2006	Fêmea	<i>Nectoys squamipes</i>	Brejo
R10	1/6/2006	Fêmea	<i>Nectoys squamipes</i>	Brejo
R11	20/9/2006	Fêmea	<i>Rattus rattus</i>	Paíol
R12	20/9/2006	Fêmea	<i>Rattus rattus</i>	Paíol
R13	20/9/2006	Macho	<i>Rattus rattus</i>	Paíol
R14	20/9/2006	Macho	<i>Oryzomys subflavus</i>	Capim
R15	20/9/2006	Macho	<i>Nectoys squamipes</i>	Brejo
R16	20/9/2006	Macho	<i>Akodon</i> sp.	Capim
R17	20/9/2006	Fêmea	<i>Akodon</i> sp.	Capim
R18	20/9/2006	Macho	<i>Akodon</i> sp.	Capim
R19	20/9/2006	Fêmea	<i>Akodon</i> sp.	Capim
R20	20/9/2006	Macho	<i>Nectoys squamipes</i>	Brejo
R21	20/9/2006	Macho	<i>Oryzomys subflavus</i>	Capim
R22	20/9/2006	Fêmea	<i>Akodon</i> sp.	Capim
R23	7/12/2006	Fêmea	<i>Rattus rattus</i>	Capim
R24	7/12/2006	Macho	<i>Rattus rattus</i>	Capim
R25	7/12/2006	Fêmea	<i>Rattus rattus</i>	Capim
R26	7/12/2006	Macho	<i>Nectoys squamipes</i>	Capim
R27	7/12/2006	Fêmea	<i>Nectoys squamipes</i>	Brejo
R28	7/12/2006	Fêmea	<i>Nectoys squamipes</i>	Brejo
R29	8/3/2007	Macho	<i>Rattus rattus</i>	Paíol
R30	8/3/2007	Fêmea	<i>Rattus rattus</i>	Paíol
R31	8/3/2007	Macho	<i>Rattus rattus</i>	Paíol
R32	8/3/2007	Fêmea	<i>Rattus rattus</i>	Paíol
R33	8/3/2007	Macho	<i>Nectoys squamipes</i>	Brejo
R34	8/3/2007	Macho	<i>Nectoys squamipes</i>	Brejo
R35	8/3/2007	Macho	<i>Nectoys squamipes</i>	Brejo
R36	8/3/2007	Fêmea	<i>Nectoys squamipes</i>	Brejo
R37	8/3/2007	Fêmea	<i>Nectoys squamipes</i>	Brejo
R38	8/3/2007	Fêmea	<i>Nectoys squamipes</i>	Brejo
R39	8/3/2007	Fêmea	<i>Nectoys squamipes</i>	Brejo
R40	5/7/2007	Macho	<i>Rattus rattus</i>	Paíol

R41	5/7/2007	Fêmea	<i>Rattus rattus</i>	Paiol
R42	5/7/2007	Fêmea	<i>Rattus rattus</i>	Paiol
R43	5/7/2007	Fêmea	<i>Rattus rattus</i>	Paiol
R44	5/7/2007	Macho	<i>Rattus rattus</i>	Capim
R45	5/7/2007	Fêmea	<i>Rattus rattus</i>	Capim
R46	5/7/2007	Fêmea	<i>Rattus rattus</i>	Capim
R47	5/7/2007	Fêmea	<i>Rattus rattus</i>	Capim
R48	5/7/2007	Macho	<i>Nectoys squamipes</i>	Brejo
R49	5/7/2007	Macho	<i>Nectoys squamipes</i>	Brejo
R50	5/7/2007	Fêmea	<i>Nectoys squamipes</i>	Brejo
R51	12/9/2007	Macho	<i>Rattus rattus</i>	Paiol
R52	12/9/2007	Fêmea	<i>Rattus rattus</i>	Capim
R53	12/9/2007	Macho	<i>Rattus rattus</i>	Paiol
R54	12/9/2007	Fêmea	<i>Nectoys squamipes</i>	Brejo
R55	10/12/2007	Macho	<i>Nectoys squamipes</i>	Brejo
R56	10/12/2007	Macho	<i>Nectoys squamipes</i>	Brejo
R57	10/12/2007	Macho	<i>Nectoys squamipes</i>	Brejo
R58	10/12/2007	Fêmea	<i>Rattus rattus</i>	Capim
R59	10/12/2007	Macho	<i>Rattus rattus</i>	Capim
R60	10/12/2007	Macho	<i>Rattus rattus</i>	Capim
R61	10/12/2007	Macho	<i>Rattus rattus</i>	Capim
R62	10/12/2007	Fêmea	<i>Rattus rattus</i>	Paiol
R63	10/12/2007	Macho	<i>Rattus rattus</i>	Paiol
R64	10/12/2007	Macho	<i>Rattus rattus</i>	Paiol
R65	10/12/2007	Macho	<i>Rattus rattus</i>	Paiol

Com relação ao município de Pingo D'Água foram realizadas visitas trimestrais entre os meses de julho de 2005 a maio de 2006, sendo capturados 112 mamíferos entre eqüinos, roedores e cães, incluindo animais silvestres e sinantrópicos. Dentre os animais capturados, 46 eram roedores, sendo 31 da espécie *Rattus rattus*, 7 *Oryzomys subflavus*, 7 *Nectomys squamipes* e 1 *Bolomys* sp. (Tabela 3). De 42 eqüinos e 24 cães coletaram-se ectoparasitas e sangue total.

Tabela 3: Dados da captura de roedores com relação a data da coleta, espécie encontrada, local de coleta e sexo no município de Pingo D'Água, estado de Minas Gerais.

DENOMINAÇÃO	DATA	SEXO	ESPÉCIE	LOCAL
R1	22/7/2005	Fêmea	<i>Rattus rattus</i>	Paiol
R2	22/7/2005	Macho	<i>Rattus rattus</i>	Paiol
R3	22/7/2005	Fêmea	<i>Rattus rattus</i>	Paiol
R4	22/7/2005	Fêmea	<i>Rattus rattus</i>	Paiol

R5	22/7/2005	Fêmea	<i>Rattus rattus</i>	Paiol
R8	22/7/2005	Macho	<i>Rattus rattus</i>	Paiol
R9	22/7/2005	Fêmea	<i>Rattus rattus</i>	Paiol
R10	22/7/2005	Macho	<i>Rattus rattus</i>	Capim
R12	22/7/2005	Fêmea	<i>Oryzomys subflavus</i>	Capim
R13	22/7/2005	Macho	<i>Oryzomys subflavus</i>	Capim
R14	22/7/2005	Fêmea	<i>Oryzomys subflavus</i>	Capim
R15	22/7/2005	Macho	<i>Oryzomys subflavus</i>	Capim
R20	22/7/2005	Macho	<i>Bolomys</i> sp.	Capim
R24	25/10/2005	Fêmea	<i>Rattus rattus</i>	Paiol
R25	25/10/2005	Fêmea	<i>Rattus rattus</i>	Paiol
R27	25/10/2005	Macho	<i>Rattus rattus</i>	Paiol
R28	25/10/2005	Macho	<i>Rattus rattus</i>	Paiol
R29	25/10/2005	Macho	<i>Rattus rattus</i>	Paiol
R30	25/10/2005	Fêmea	<i>Rattus rattus</i>	Paiol
R31	25/10/2005	Fêmea	<i>Rattus rattus</i>	Paiol
R32	25/10/2005	Fêmea	<i>Oryzomys subflavus</i>	Capim
R33	25/10/2005	Macho	<i>Oryzomys subflavus</i>	Capim
R34	25/10/2005	Fêmea	<i>Oryzomys subflavus</i>	Capim
R35	25/10/2005	Macho	<i>Nectoys squamipes</i>	Brejo
R36	25/10/2005	Macho	<i>Nectoys squamipes</i>	Brejo
R37	25/10/2005	Fêmea	<i>Nectoys squamipes</i>	Brejo
R38	25/10/2005	Macho	<i>Nectoys squamipes</i>	Brejo
R39	25/10/2005	Fêmea	<i>Nectoys squamipes</i>	Brejo
R40	25/10/2005	Macho	<i>Nectoys squamipes</i>	Brejo
R41	25/10/2005	Fêmea	<i>Nectoys squamipes</i>	Brejo
R42	31/1/2006	Macho	<i>Rattus rattus</i>	Paiol
R43	31/1/2006	Fêmea	<i>Rattus rattus</i>	Paiol
R44	31/1/2006	Macho	<i>Rattus rattus</i>	Paiol
R45	31/1/2006	Macho	<i>Rattus rattus</i>	Paiol
R46	3/5/2006	Macho	<i>Rattus rattus</i>	Paiol
R47	3/5/2006	Fêmea	<i>Rattus rattus</i>	Paiol
R48	3/5/2006	Fêmea	<i>Rattus rattus</i>	Paiol
R49	3/5/2006	Macho	<i>Rattus rattus</i>	Paiol
R50	3/5/2006	Macho	<i>Rattus rattus</i>	Paiol
R51	3/5/2006	Macho	<i>Rattus rattus</i>	Paiol
R52	3/5/2006	Macho	<i>Rattus rattus</i>	Paiol
R53	3/5/2006	Fêmea	<i>Rattus rattus</i>	Paiol
R54	3/5/2006	Fêmea	<i>Rattus rattus</i>	Paiol
R57	3/5/2006	Fêmea	<i>Rattus rattus</i>	Paiol

R58	3/5/2006	Macho	Rattus rattus	Paio
R60	3/5/2006	Macho	Rattus rattus	Paio

A identificação taxonômica dos carrapatos e pulgas coletadas dos animais do município de Santa Cruz do Escalvado foi realizada segundo chaves taxonômicas descritas por Aragão & Fonseca (1961) e Linardi & Guimarães (2001), respectivamente. Assim identificaram-se carrapatos *Amblyomma cajennense* (97), *Rhipicephalus sanguineus* (55), *Rhipicephalus Boophilus microplus* (180), *Anocenter nitens* (11), *Amblyomma braziliensis* (1), *Amblyomma ovari* (2), e pulgas *Ctenocefalides canis* (209), *Ctenocefalides felis* (45), *Xenopsylla cheops* (8) e *Rhopalopsyllus* sp. (38) parasitando cães, equinos, roedores e gambás (Tabela 4).

Tabela 4- Identificação dos ectoparasitas coletados de animais domésticos, silvestres e sinantrópicos no município de Santa Cruz do Escalvado, estado de Minas Gerais no período de julho de 2005 a dezembro de 2007.

ESPÉCIE	ORIGEM	ESTÁDIO EVOLUTIVO			TOTAL
		NINFA	ADULTO		
			FÊMEA	MACHO	
<i>Amblyomma braziliensis</i>	Cães	0	1	0	1
<i>Amblyomma cajennense</i>	Cães	15	6	2	23
	Equinos	22	15	8	45
	Gambás	27	0	0	28
	Roedores	1	0	0	1
<i>Anocenter nitens</i>	Equinos	1	10	0	11
<i>Amblyomma ovari</i>	Cães	2	0	0	2
<i>Rhipicephalus Boophilus microplus</i>	Cães	0	38	0	38
	Equinos	68	73	1	142
<i>Ctenocefalides canis</i>	Cães	---	---	---	14
	Gambás	---	---	---	195
<i>Ctenocefalides felis</i>	Cães	---	---	---	20
	Gambás	---	---	---	25
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Cães	13	30	8	51
	Gambás	4	0	0	4
<i>Rhopalopsyllus</i> sp	Gambás	---	---	---	22
	Roedores	---	---	---	16
<i>Xenopsylla cheops</i>	Gambás	0	2	3	5

	Roedores	0	2	1	3
TOTAL					646

Os carrapatos e pulgas coletadas parasitando cães, eqüinos e roedores no município de Pingo D' Água, foram identificados como a seguir: *A. cajennense* (43), *R. sanguineus* (5), *R. B. microplus* (5), *A. braziliensis* (5), *A. dubitatum* (1), pulgas da espécie *C. canis* (24), *C. felis* (34), *X. cheops* (11), e *Pulex irritans* (1) (Tabela 5).

Tabela 5- Identificação de ectoparasitas coletados de animais domésticos e sinantrópicos no município de Pingo D' Água, estado de Minas Gerais entre os meses de julho de 2005 a maio de 2006.

ESPÉCIE	ORIGEM	ESTÁGIO EVOLUTIVO			TOTAL
		NINFA	ADULTO		
			FÊMEA	MACHO	
<i>Amblyomma braziliensis</i>	Cães	5	0	0	5
<i>Amblyomma cajennense</i>	Cães	4	2	0	6
	Equinos	0	27	4	31
	Roedores	1	6	1	8
<i>Amblyomma dubitatum</i>	Equinos	0	1	0	1
<i>Rhipicephalus Boophilus microplus</i>	Cães	2	0	0	2
	Equinos	1	2	0	3
<i>Ctenocefalides canis</i>	Cães	---	---	---	24
<i>Ctenocefalides felis</i>	Cães	---	---	---	26
	Roedores	---	---	---	9
<i>Pulex irritans</i>	Roedores	---	---	---	1
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Cães	4	1	0	5
<i>Xenopsylla cheops</i>	Roedores	---	---	---	11
TOTAL					132

5.2- AVALIAÇÃO SOROLÓGICA DES ROEDORES NO MUNICÍPIO DE SANTA CRUZ DO ESCALVADO

Conforme pode ser verificado na Tabela 6, dos 62 soros coletados de roedores no município de Santa Cruz do Escalvado, estado de Minas Gerais, 39 destes se encontravam positivos pela técnica de RIFI com títulos iguais ou superiores à 1:64 para *R.rickettsii*, *R.parkeri* e *R.amblyommi*, sendo dentre estes maiores os títulos obtidos para *R. rickettsii* na espécie *R.rattus* com relação as outras espécies de riquetsia (*R.parkeri* e *R.amblyommii*).

Tabela 6: Resultado sorológico na RIFI de roedores capturados em Santa Cruz do Escalvado, estado de Minas Gerais, usando antígenos *R. rickettsii*, *R.parkeri*, *R.felis*, *R. amblyommii* e *R. rhipicephali*.

Identificação	Título <i>R.rickettsii</i>	Título <i>R.parkeri</i>	Título <i>R.felis</i>	Título <i>R.amblyommii</i>	Título <i>R. rhipicephali</i>
R1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
R2	1:512	1:128	Negativo	1:64	1:128
R3	1:512	1:256	Negativo	1:256	1:128
R4	1:512	1:28	Negativo	1:64	Negativo
R6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
R7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
R8	1:512	1:128	Negativo	1:64	1:64
R9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
R11	1:512	1:256	Negativo	1:128	1:128
R13	1:256	1:128	Negativo	1:64	Negativo
R14	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
R15	1:128	1:64	Negativo	Negativo	Negativo
R16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
R17	1:256	1:128	Negativo	1:64	1:64
R18	1:128	1:64	Negativo	Negativo	Negativo
R19	1:128	1:64	Negativo	Negativo	Negativo
R20	1:256	1:256	Negativo	1:64	1:256
R21	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
R22	1:512	1:256	Negativo	Negativo	Negativo
R23	1:512	1:256	Negativo	Negativo	Negativo
R24	1:1.024	1:512	Negativo	1:256	1:256
R25	1:1.024	1:512	Negativo	1:256	Negativo
R26	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
R27	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
R28	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
R29	1:1.024	1:512	Negativo	1:256	1:256
R30	1:512	1:256	Negativo	1:128	1:128
R31	1:256	1:128	Negativo	Negativo	1:64
R32	1:512	1:256	Negativo	1:64	Negativo
R33	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
R34	1:256	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
R35	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
R36	1:256	1:128	Negativo	1:128	1:64

R37	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
R38	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
R39	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
R40	1:512	1:256	Negativo	1:128	1:128
R41	1:1.024	1:1.024	Negativo	1:512	1:256
R42	1:1.024	1:256	Negativo	1:128	1:128
R43	1:512	1:256	Negativo	1:128	1:128
R44	1:512	1:256	Negativo	1:128	1:128
R45	1:1.024	1:512	Negativo	1:256	1:256
R46	1:1.024	1:512	Negativo	1:512	1:512
R47	1:1.024	1:512	Negativo	1:512	1:512
R48	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
R49	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
R50	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
R51	1:256	1:256	Negativo	1:256	1:128
R52	1:256	1:128	Negativo	1:64	Negativo
R53	1:4.096	1:2048	Negativo	1:2048	1:1024
R54	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
R55	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
R56	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
R57	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
R58	1:512	1:128	Negativo	1:128	Negativo
R59	1:1024	1:1024	Negativo	1:512	1:512
R60	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
R61	1:1.024	1:512	Negativo	1:256	1:128
R62	1:1.024	1:512	Negativo	1:128	1:64
R63	1:1.024	1:512	Negativo	1:128	1:64
R64	1:512	1:128	Negativo	1:128	1:128
R65	1:64	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
R61	1:1.024	1:512	Negativo	1:256	1:128

A espécie de roedor na qual observou-se uma maior percentagem de positivos à RIFI foi *R. rattus*, tendo dentre as 32 amostras testadas, 30 reativas com um título igual ou superior 1:64 para a RIFI usando como antígeno espécie do GFM, totalizando 93,75% das amostras testadas destes roedores (Tabela 7).

Tabela 7- Percentual de amostras reativas para riquetsias do GFM à RIFI, com títulos iguais ou superiores a 1:64 evidenciando-se pela espécie dos roedores capturados no município de Santa Cruz do Escalvado estado de Minas Gerais.

Espécies de roedores coletados	Número de roedores coletados	Número de roedores positivos na sorologia para FMB	Porcentagem de roedores positivos à RIFI (%)
<i>R. rattus</i>	32	30	93,75
<i>N. squamipes</i>	23	5	21,74
<i>O. subflavus</i>	2	0	0
<i>Akodon sp</i>	5	4	80
Total	62	39	62,91

5.3- AVALIAÇÃO SOROLÓGICA DOS ROEDORES NO MUNICÍPIO DE PINGO D'ÁGUA

Conforme pode ser verificado na Tabela 8 dos 46 soros de roedores coletados, 39 se encontravam positivos pela técnica de RIFI para *R.rickettsii*, *R.parkeri* e *R.amblyommi*, sendo que o maior título obtido para *R. rickettsii* na espécie *R. rattus* foi 1:16.384, 1: 4.096 para *R. parkeri* e 1:1.024 para *R. ambyomii* (Tabela 9).

Tabela 8: Percentual de amostras reativas para riquetsias do GFM à RIFI, com títulos iguais ou superiores a 1:64 evidenciando-se pela espécie dos roedores capturados no município de Pingo D' Água estado de Minas Gerais.

Espécies de roedores coletados	Número de roedores coletados	Número de roedores positivos na sorologia para FMB	Porcentagem de roedores positivos à RIFI (%)
<i>R. rattus</i>	31	26	83,88
<i>N. squamipes</i>	7	6	85,72
<i>O. subflavus</i>	7	6	85,72
<i>Akodon sp</i>	1	1	100
Total	46	39	84,73

Tabela 9- Resultado sorológico à RIFI de roedores capturados em Santa Cruz do Escalvado, estado de Minas Gerais, usando antígenos *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. felis*, *R. amblyommii*, *R. rhipicephali* e *R. felis*.

Identificação	Título <i>R.rickettsii</i>	Título <i>R.parkeri</i>	Título <i>R.felis</i>	Título <i>R.amblyommii</i>	Título <i>R. rhipicephali</i>	Título <i>R.belli</i>
R1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
R2	1:512	1:256	Negativo	1:64	1:64	Negativo
R3	1:2048	1:512	Negativo	1:512	1:512	Negativo
R4	1:512	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
R5	1:512	1:256	Negativo	1:64	Negativo	Negativo
R8	1:256	1:128	Negativo	1:64	Negativo	Negativo
R9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
R10	1:1024	1:256	Negativo	1:64	Negativo	Negativo
R12	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
R13	1:4096	1:2048	Negativo	1:1024	1:2048	Negativo
R14	1:256	1:64	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
R15	1:512	1:256	Negativo	1:128	1:512	Negativo
R20	1:4096	1:4096	Negativo	1:4096	1:2048	1:128
R24	1:512	1:256	Negativo	1:128	1:128	Negativo
R25	1:1024	1:512	Negativo	1:512	1:512	Negativo
R27	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
R28	1:1024	1:512	Negativo	Negativo	1:512	Negativo
R29	1:512	1:256	Negativo	1:128	1:64	Negativo
R30	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
R31	1:256	1:128	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
R32	1:128	1:64	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
R33	1:128	1:64	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
R34	1:1024	1:512	Negativo	1:256	1:128	Negativo
R35	1:1024	1:512	Negativo	1:512	1:512	Negativo
R36	1:512	1:512	Negativo	1:128	1:128	Negativo
R37	1:1024	1:512	Negativo	1:128	Negativo	Negativo
R38	1:512	1:512	Negativo	1:64	1:256	Negativo
R39	1:1024	1:512	Negativo	1:512	1:256	Negativo
R40	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
R41	1:1024	1:256	Negativo	1:256	1:256	Negativo
R42	1:16384	1:4096	Negativo	1:1024	1:1024	Negativo
R43	1:256	1:256	Negativo	1:128	1:128	Negativo
R44	1:512	1:256	Negativo	1:128	1:128	Negativo

G7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
G8	1:512	1:128	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
G9	1:128	1:64	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
G10	1:128	1:128	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
G11	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
G12	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
G13	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
G14	1:256	1:256	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
G15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
G16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
G17	1:256	1:256	1:128	Negativo	Negativo	Negativo
G18	1:512	1:512	1:512	Negativo	Negativo	Negativo
G19	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
G20	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
G21	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
G22	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
G23	1:2048	1:1024	1:1024	1:256	Negativo	Negativo
G24	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
G25	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
G26	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
G27	1:512	1:64	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
G28	1:256	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
G29	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
G30	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
G31	1:128	1:64	1:64	Negativo	Negativo	Negativo
G32	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
G33	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
G34	1:128	1:64	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
G35	1:512	1:256	1:128	Negativo	Negativo	Negativo
G36	1:128	1:64	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
G37	1:128	1:64	1:64	Negativo	Negativo	Negativo
G38	1:128	1:64	1:128	Negativo	Negativo	Negativo

O animal com o maior título foi o G23, o qual apresentou títulos de 1:2.048 contra antígeno de *R. rickettsii*, 1:1.024 contra *R. parkeri*, 1:1.024 contra *R. amblyommii* e 256 contra *R. felis* (Figura 11).

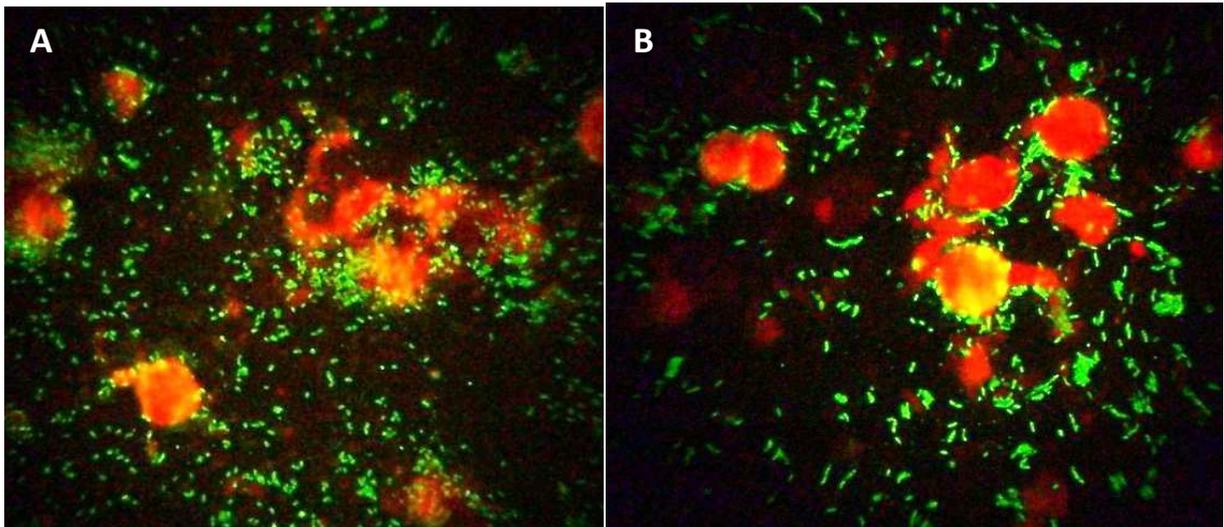


Figura 11- Resultados da RIFI utilizando antígenos de *R.rickettsii* (A) e *R.parkeri* (B) do animal G23, capturado no município de Santa Cruz do Escalvado, estado de Minas Gerais, com títulos de 1:2.048 e 1:1.024, respectivamente.

A sororeatividade contra antígenos de *Rickettsia nos gambás* seguiu um padrão, observando-se em todos os animais uma titulação maior para *R. rickettsii* seguido de *R. parkeri*, *R. amblyommi* e *R. felis*, com exceção para a amostra G38, na qual observou-se um maior título contra *R. amblyommi* do que contra *R. parkeri* (Gráfico 2). Algumas amostras apresentaram titulação semelhante sendo que não foi encontrado sororeatividade contra antígeno específico de *R. belli* e *R. rhipicephali* nas amostras avaliadas.

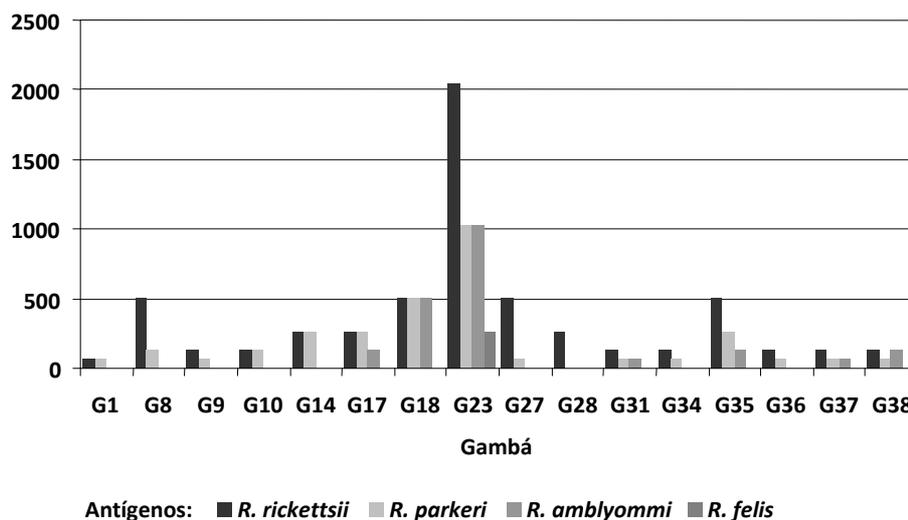


Gráfico 2- Comparação entre os títulos à RIFI utilizando-se com diferentes antígenos de *Rickettsia* em soros de gambás capturados no município de Santa Cruz do Escalvado, estado de Minas Gerais no período de setembro de 2005 a dezembro de 2007

5.5- AVALIAÇÃO SOROLÓGICAS DE CÃES E EQUINOS

Das 42 amostras de soros de eqüinos e 24 amostras de soros de cães coletadas no município de Pingo D'Água, e analisadas à RIFI, observou-se sororeatividade em 16 (38,09%) das amostras de eqüinos (Tabela 11) e de duas (8,33%) amostras de cães para riquetsias do GFM (Tabela 12).

Tabela 11- Resultado sorológico de eqüinos capturados no município de Pingo D'Água, estado de Minas Gerais, na RIFI usando antígenos *R. rickettsii*, *R. amblyommii*, *R. rhipicephali* e *R. belli*.

Animal	Data da coleta	Título <i>R.rickettsii</i>	Título <i>R. amblyommii</i>	Título <i>R.rhipicephali</i>	Título <i>R.belli</i>
Equino 1	22/07/2005	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 2	25/10/2005	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 3	25/10/2005	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 4	25/10/2005	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 5	25/10/2005	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 6	31/01/2006	1:512	1:512	1:512	Negativo
Equino 7	31/01/2006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 8	31/01/2006	1:512	Negativo	1:128	Negativo
Equino 9	31/01/2006	1:1024	1:1024	1:512	1:128
Equino 10	31/01/2006	1:256	1:512	1:512	Negativo
Equino 11	31/01/2006	1:512	1:256	1:512	1:128
Equino 12	31/01/2006	1:512	1:128	1:128	1:128
Equino 13	31/01/2006	1:512	1:512	1:512	Negativo
Equino 14	31/01/2006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 15	31/01/2006	1:128	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 16	31/01/2006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 17	31/01/2006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 18	31/01/2006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 19	31/01/2006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 20	31/01/2006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 21	31/01/2006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 22	31/01/2006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 23	31/01/2006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Equino 24	31/01/2006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 25	31/01/2006	1:1024	1:1024	1:1024	1:128
Equino 26	31/01/2006	1:128	1:128	Negativo	Negativo
Equino 27	30/05/2006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 28	30/05/2006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 29	30/05/2006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 30	30/05/2006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 31	30/05/2006	1:128	1:512	1:512	Negativo
Equino 32	30/05/2006	1:256	1:512	1:128	1:256
Equino 33	30/05/2006	1:256	1:512	1:512	Negativo
Equino 34	30/05/2006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 35	30/05/2006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 36	30/05/2006	1:64	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 37	30/05/2006	1:256	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 38	30/05/2006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 39	30/05/2006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 40	30/05/2006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 41	30/05/2006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 42	30/05/2006	1:64	Negativo	Negativo	Negativo

Tabela 12- Resultado sorológico de cães capturados em Pingo D' Água, estado de Minas Gerais, na RIFI usando antígenos de *R. rickettsii*, *R. amblyommii*, *R. rhipicephali* e *R. belli*.

Animal	Data da coleta	Título <i>R.rickettsii</i>	Título <i>R. amblyommii</i>	Título <i>R.rhipicephali</i>	Título <i>R.belli</i>
Cão 1	22/07/2005	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 2	22/07/2005	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 3	22/07/2005	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 4	22/07/2005	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 5	25/10/2005	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 6	25/10/2005	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 7	25/10/2005	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 8	31/01/2006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 9	31/01/2006	1:64	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 10	31/01/2006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 11	31/01/2006	1:64	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 12	31/01/2006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Cão 13	31/01/2006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 14	31/01/2006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 15	31/01/2006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 16	31/01/2006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 17	31/01/2006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 18	31/01/2006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 19	31/01/2006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 20	30/05/2006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 21	30/05/2006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 22	30/05/2006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 23	30/05/2006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 24	30/05/2006	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

No município de Santa Cruz do Escalvado das 66 amostras de soros de eqüinos e 67 amostras de soros de cães analisadas, verificou-se uma sororeatividade à RIFI usando antígeno de *R. rickettsii*, *R. amblyommii*, *R. rhipicephali* e *R. belli* em dez (15,15%) e em 14 (20,89%) amostras respectivamente (Tabela 13 e 14).

Tabela 13- Resultado sorológico de equinos capturados em Santa Cruz do Escalvado, estado de Minas Gerais na RIFI usando antígenos *R. rickettsii*, *R. amblyommii*, *R. rhipicephali* e *R. belli*.

Animal	Data da Coleta	Título <i>R.rickettsia</i>	Título <i>R.amblyommii</i>	Título <i>R.rhipicephali</i>	Título <i>R.belli</i>
Equino 1	08/03/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 2	08/03/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 3	08/03/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 4	08/03/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 5	08/03/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 6	08/03/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 7	08/03/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 8	08/03/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 9	08/03/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 10	08/03/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 11	08/03/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 12	08/03/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Equino 13	08/03/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 14	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 15	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 16	05/07/2007	1:128	1:256	1:128	1:64
Equino 17	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 18	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 19	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 20	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 21	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 22	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 23	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 24	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 25	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 26	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 27	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 28	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 29	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 30	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 31	05/07/2007	1:256	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 32	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 33	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 34	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 35	05/07/2007	1:128	1:128	1:64	Negativo
Equino 36	05/07/2007	1:128	1:64	1:64	Negativo
Equino 37	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 38	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 39	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 40	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 41	11/09/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 42	11/09/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 43	11/09/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 44	11/09/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 45	11/09/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 46	11/09/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 47	11/09/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 48	11/09/2007	1:64	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 49	11/09/2007	1:128	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 50	11/09/2007	1:256	Negativo	Negativo	1:128

Equino 51	11/09/2007	1:256	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 52	11/09/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 53	11/09/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 54	11/09/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 55	11/09/2007	1:256	Negativo	Negativo	1:128
Equino 56	10/12/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 57	10/12/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 58	10/12/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 59	10/12/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 60	10/12/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 61	10/12/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 62	10/12/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 63	10/12/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 64	10/12/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 65	10/12/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Equino 66	10/12/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Tabela 14- Resultado sorológico de cães capturados em Santa Cruz do Escalvado, estado de Minas Gerais, na RIFI usando antígenos *R. rickettsii*, *R. amblyommii*, *R. rhipicephali* e *R. belli*.

Animal	Data da Coleta	Título <i>R.rickettsia</i>	Título <i>R.amblyommii</i>	Título <i>R.rhipicephali</i>	Título <i>R.belli</i>
Cão 1	08/03/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 2	08/03/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 3	08/03/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 4	08/03/2007	1:512	1:256	1:128	Negativo
Cão 5	08/03/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 6	08/03/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 7	08/03/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 8	08/03/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 9	08/03/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 10	08/03/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 11	08/03/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 12	08/03/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 13	08/03/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 14	08/03/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 15	08/03/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Cão 16	08/03/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 17	08/03/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 18	08/03/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 19	08/03/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 20	08/03/2007	1:256	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 21	08/03/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 22	08/03/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 23	05/07/2007	1:64	Negativo	1:64	Negativo
Cão 24	05/07/2007	1:1024	1:256	1:1024	Negativo
Cão 25	05/07/2007	1:1024	1:1024	1:1024	Negativo
Cão 26	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 27	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 28	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 29	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 30	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 31	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 32	05/07/2007	1:128	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 33	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 34	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 35	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 36	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 37	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 38	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 39	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 40	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 41	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 42	05/07/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 43	11/09/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 44	11/09/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 45	11/09/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 46	11/09/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 47	11/09/2007	1:128	1:64	Negativo	Negativo
Cão 48	11/09/2007	1:1024	1:128	1:256	Negativo
Cão 49	11/09/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 50	11/09/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 51	11/09/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 52	11/09/2007	1:256	Negativo	1:64	Negativo
Cão 53	11/09/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Cão 54	11/09/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 55	11/09/2007	1:1024	1:256	1:256	Negativo
Cão 56	11/09/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 57	11/09/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 58	11/09/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 59	11/09/2007	1:256	1:64	Negativo	Negativo
Cão 60	10/12/2007	1:256	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 61	10/12/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 62	10/12/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 63	10/12/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 64	10/12/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 65	10/12/2007	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 66	10/12/2007	1:64	Negativo	Negativo	Negativo
Cão 67	10/12/2007	1:512	Negativo	1:64	Negativo

Na Tabelas 15 apresenta-se um resumo dos resultados obtidos com soros que apresentaram títulos iguais ou superiores a 1:64 quando testados à RIFI empregando-se antígenos de *Rickettsia*-específicos, demonstrando-se estes resultados quanto ao percentual de amostras positivas em cada um dos municípios estudados.

Tabela 15: Percentual de amostras reativas com título igual ou superior à 1:64 para riquetsia à RIFI com uso de antígenos *Rickettsia* específicos, em diferentes espécies de animais no município de Santa Cruz do Escalvado, no período de julho de 2005 a dezembro de 2007 e no município de Pingo D' Água, no período julho de 2005 a maio de 2006, ambos no estado de Minas Gerais.

Animais	Município	N¹	RIFI²	Total (%)
Cães	Santa Cruz do Escalvado	67	14	20,89
	Pingo D' Água	24	2	8,33
Equinos	Santa Cruz do Escalvado	66	10	15,15
	Pingo D' Água	42	16	38,09
Gambás	Santa Cruz do Escalvado	38	16	42,1

Roedores	Santa Cruz do Escalvado	62	39	62,91
	Pingo D' Água	46	39	84,73

¹ Número total de amostras de soro coletadas e testadas

² Número de amostras reativas

5.6- REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

As amostras de DNA obtidas e extraídas de ectoparasitas, *swabs*, sangue e tecidos dos animais capturados foram submetidas à PCR primeiramente utilizando os pares de *primers* específicos para o gene citrato sintase (*gltA*) de *Rickettsia*, os quais amplificam um fragmento de 401 pares de bases. Oito (1,23%) das 646 amostras de ectoparasitas coletados em Santa Cruz do Escalvado, foram positivas, como apresentado na Tabela 16 e Figura 12.

Tabela 17- Resultados das amostras de DNA de ectoparasitas coletados na localidade de Santa Cruz do Escalvado, no estado de Minas Gerais, positivas na PCR usando-se primers para amplificação do gene da citrato sintase,.

AMOSTRA	ORIGEM	Ectoparasita
02	Gambá	<i>Ctenocefalides felis</i>
13	Equino	<i>Amblyomma cajennense</i>
18	Equino	<i>Amblyomma cajennense</i>
43	Gambá	<i>Amblyomma cajennense</i>
57	Gambá	<i>Amblyomma cajennense</i>
77	Cão	<i>Amblyomma cajennense</i>
250	Gambá	<i>Ctenocefalides felis</i>
381	Gambá	<i>Ctenocefalides canis</i>

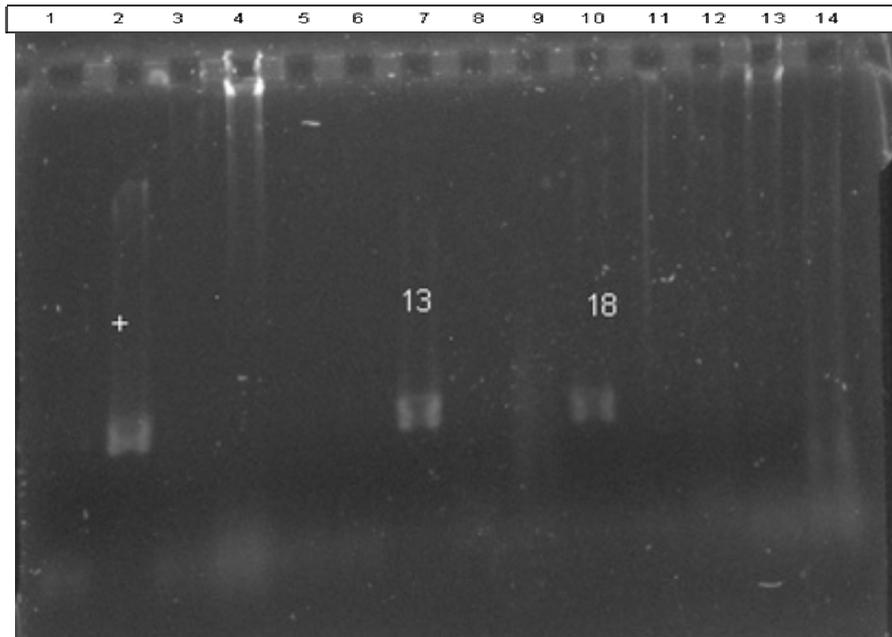


Figura 12- Resultado parcial de amplificação pela PCR do gene citrato sintase (*gltA*) usando primers CS-62 e CS-462, em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. Canaleta 2: controle positivo. Canaletas 7 e 10: Amostras 13 e 18, respectivamente, produtos de amplificação de amostras de DNA de *Amblyomma cajennense* coletados parasitando eqüino 12 e 06, no município de Santa Cruz do Escalvado, estado de Minas Gerais, com o uso de primers CS-62 e CS-462 para amplificação do gene *gltA*.

Todas as amostras de DNA provenientes do sangue total e *swab* anal dos gambás e tecidos de roedores capturados no município de Santa Cruz do Escalvado, apresentaram resultados negativos a PCR utilizando primers específicos para amplificação do gene da citrato sintase, assim como as amostras de DNA obtidas de ectoparasitas e tecidos de roedores capturados no município de Pingo D' Água.

Todas as oito amostras de DNA positivas à PCR com o uso dos primers para a amplificação do gene da citrato sintase do gênero *Rickettsia*, apresentaram resultados negativos quando testadas para amplificação do gene da proteína de membrana ompA com o uso dos primers Rr190.70 e Rr190.602.

Na Tabela 17 apresenta-se uma associação entre os resultados dos ectoparasitas positivos à PCR com o uso dos primers CS-62 e CS-462 para a identificação do gene da citrato sintase, no município de Santa Cruz do Escalvado, estado de Minas Gerais, e os títulos obtidos na RIFI com o uso de antígeno *Rickettsia* específico.

Tabela 17- Associação entre as amostras positivas à PCR realizada com DNA de ectoparasitas coletados no município de Santa Cruz do Escalvado, estado de Minas Gerais com o uso dos primers para amplificação do gene *gltA* e os títulos observados à RIFI com o uso de antígenos *Rickettsia*-específicos.

AMOSTRA	ORIGEM	TITULAÇÃO	ESPÉCIE
02	Gambá 36	1:128	<i>R.rickettsii</i>
		1:64	<i>R.parkeri</i>
13	Equino 12	Negativo	
18	Equino 6	Negativo	
43	Gambá 35	1:512	<i>R.rickettsii</i>
		1:256	<i>R.parkeri</i>
		1:128	<i>R.amblyommii</i>
57	Gambá 10	1:128	<i>R.rickettsii</i>
		1:128	<i>R.parkeri</i>
77	Cão 1	1:64	<i>R.rickettsii</i>
		1:64	<i>R.rhipicephali</i>
250	Gambá 18	512	<i>R.rickettsii</i>
		512	<i>R.parkeri</i>
		512	<i>R.amblyommii</i>
381	Gambá 23	1:2048	<i>R.rickettsii</i>
		1:1024	<i>R.parkeri</i>
		1:1024	<i>R. amblyommii</i>
		1:256	<i>R. felis</i>

5.7- SEQUENCIAMENTO

Foram obtidas sequências de bases nucleotídicas amplificadas com *primer* para identificação do gene da citrato sintase (*gltA*) das oito amostras de ectoparasitas que se apresentaram positivas para a reação da PCR. Utilizando-se o aplicativo BLASTn, contra o banco de sequências biológicas GenBank, verificou-se que todas as sequências apresentaram homologia significativamente quanto a algumas das sequências de *Rickettsia* sp. já depositadas por outros autores. Na tabela 18 são apresentados os resultados obtidos com os maiores valores de homologias de sequência.

Tabela 18- Resultados de homologia observados comparando-se as sequências obtidas com os produtos amplificados para o gene *gltA* de amostras de DNA de ectoparasitas coletados no município de Santa Cruz do Escalvado, estado de Minas Gerais e as sequências de *Rickettsia* depositadas no GenBank, com o uso do aplicativo BLASTn

Amostra	Ectoparasita	Hospedeiro	Tamanho do	Nº de	Descrição	Homologia
---------	--------------	------------	------------	-------	-----------	-----------

			fragmento	acesso GenBank		(%)
2	<i>Ctenocephalides felis</i>	<i>Didelphis aurita</i>	404	CP000053.1	<i>Rickettsia felis</i> URRWXCal2	98
				AF210692.1	<i>Rickettsia</i> sp. California 2	98
				EU303311.1	<i>Rickettsia</i> endosymbiont of <i>Haemaphysalis punctata</i> isolate Hae69	97
				AF516333.1	<i>Rickettsia</i> sp. RF2125	97
				FJ767737.1	Candidatus <i>Rickettsia</i> <i>hoogstraalii</i>	97
				DQ081187.1	<i>Rickettsia</i> endosymbiont of <i>Haemaphysalis sulcata</i>	97
				AF516331.1	<i>Rickettsia</i> sp. Rf31	97
				GQ255903.1	<i>Rickettsia</i> sp. SGL01	96
13	<i>Amblyomma cajennense</i>	Equino	375	CP000053.1	<i>Rickettsia felis</i> URRWXCal2	99
				AF210692.1	<i>Rickettsia</i> sp. California 2	99
				EU303311.1	<i>Rickettsia</i> endosymbiont of <i>Haemaphysalis punctata</i> isolate Hae69	97
				AF516333.1	<i>Rickettsia</i> sp. RF2125	98
18	<i>Amblyomma cajennense</i>	Equino	391	CP000053.1	<i>Rickettsia felis</i> URRWXCal2	99
				AF210692.1	<i>Rickettsia</i> sp. California 2	99
				EU303311.1	<i>Rickettsia</i> endosymbiont of <i>Haemaphysalis punctata</i> isolate Hae69	97
				AF516333.1	<i>Rickettsia</i> sp. RF2125	98
				FJ767737.1	Candidatus <i>Rickettsia</i> <i>hoogstraalii</i>	97
				DQ081187.1	<i>Rickettsia</i> endosymbiont of <i>Haemaphysalis sulcata</i>	97
				AF516331.1	<i>Rickettsia</i> sp. Rf31	97
GQ255903.1	<i>Rickettsia</i> sp. SGL01	97%				
				EU303311.1	<i>Rickettsia</i> endosymbiont of <i>Haemaphysalis punctata</i> isolate Hae69	96

			CP000053.1	<i>Rickettsia felis</i> URRWXCal2	99
--	--	--	----------------------------	-----------------------------------	----

43	<i>Amblyomma cajennense</i>	<i>Didelphis aurita</i>	402	FJ767737.1	Candidatus <i>Rickettsia hoogstraalii</i>	96
				AF516333.1	<i>Rickettsia</i> sp. RF2125	96
				CP000053.1	<i>Rickettsia felis</i> URRWXCal2	96
				DQ081187.1	<i>Rickettsia</i> endosymbiont of <i>Haemaphysalis sulcata</i>	96
				AF210692.1	<i>Rickettsia</i> sp. California 2	96

57	<i>Amblyomma cajennense</i>	<i>Didelphis aurita</i>	392	AF210692.1	<i>Rickettsia</i> sp. California 2	99
				EU303311.1	<i>Rickettsia</i> endosymbiont of <i>Haemaphysalis punctata</i> isolate Hae69	97
				AF516333.1	<i>Rickettsia</i> sp. RF2125	98
				FJ767737.1	Candidatus <i>Rickettsia hoogstraalii</i>	97
				DQ081187.1	<i>Rickettsia</i> endosymbiont of <i>Haemaphysalis sulcata</i>	97
				AF516331.1	<i>Rickettsia</i> sp. Rf31	97
				GQ255903.1	<i>Rickettsia</i> sp. SGL01	97
77	<i>Amblyomma cajennense</i>	Cão	317	CP000053.1	<i>Rickettsia felis</i> URRWXCal2	100
				AF210692.1	<i>Rickettsia</i> sp. California 2	100
250	<i>Ctenocephalides felis</i>	<i>Didelphis aurita</i>	372	CP000053.1	<i>Rickettsia felis</i> URRWXCal2	99
				AF210692.1	<i>Rickettsia</i> sp. California 2	99
				AF516333.1	<i>Rickettsia</i> sp. RF2125	98
				EU303311.1	<i>Rickettsia</i> endosymbiont of <i>Haemaphysalis punctata</i> isolate Hae69	98
				FJ767737.1	Candidatus <i>Rickettsia hoogstraalii</i>	97
				DQ081187.1	<i>Rickettsia</i> endosymbiont of <i>Haemaphysalis sulcata</i>	97
381	<i>Ctenocephalides canis</i>	<i>Didelphis aurita</i>	376	CP000053.1	<i>Rickettsia felis</i> URRWXCal2	99
				AF210692.1	<i>Rickettsia</i> sp. California 2	99
				EU303311.1	<i>Rickettsia</i> endosymbiont of <i>Haemaphysalis punctata</i> isolate Hae69	97
				AF516333.1	<i>Rickettsia</i> sp. RF2125	98
				FJ767737.1	Candidatus <i>Rickettsia hoogstraalii</i>	98
				DQ081187.1	<i>Rickettsia</i> endosymbiont of <i>Haemaphysalis sulcata</i>	98
				AF516331.1	<i>Rickettsia</i> sp. Rf31	98

VI- DISCUSSÃO

A única espécie encontrada de gambá ao longo das coletas foi o *D. aurita*, popularmente conhecido como Gambá-de-orelha-preta. Um dos fatores que possibilitaram sua identificação foi o seu regionalismo e as características externas. Ele encontra-se distribuído na região leste do Brasil, local onde está inserido a área

estudada, do estado de Alagoas a Santa Catarina, estendendo-se a oeste até o Mato Grosso do Sul (CERQUEIRA & LEMOS, 2001; BROWN B. E., 2004). Essa espécie apresenta porte médio, com comprimento da cabeça entre 355 e 470mm e massa corporal entre 670 e 1882g (VIEIRA, 1997; LANGE & JABLONSKI, 1998; PASSAMANI, 2000). A coloração em seu dorso pode ser negra ou grisalha, já a ventral é creme-amarelada. A cauda é preta em sua parte basal seguida de uma coloração branco-amarelada. Em sua face encontra-se uma listra escura na frente e outra sobre cada olho. Entretanto, a característica morfológica mais marcante é o pavilhão auditivo de coloração totalmente negra (ROSSI et al., 2006).

O grande número desses animais capturados principalmente nos meses de dezembro é consequência das características reprodutivas dessa espécie. Na estação de maior pluviosidade, a qual engloba o mês de dezembro, as fêmeas de *D. aurita* e de outras espécies de *Didelphis* estão em atividade reprodutiva, com ninhadas de outubro a janeiro favorecendo o aumento populacional (PASSAMANI, 2000). Esta variação de captura entre os anos, com um aumento significativo, é devido a um aperfeiçoamento na captura dos gambás, devido à escolha de locais mais apropriados para a montagem das armadilhas. São animais sinantrópicos, ou seja, apresentam alto grau de adaptação aos ambientes urbanos visto que nas cidades a disponibilidade de recursos é grande e fornecem refúgios como forros de casas, por isto o número alto de coletas de gambás próximos aos domicílios em Santa Cruz do Escalvado, estado de Minas Gerais. Essa migração se deve a urbanização e ao desmatamento, entre outros fatores com a consequente destruição dos habitats naturais desses animais, forçando-os assim a procurarem outros lugares para sobrevivência. Dessa forma, estes transportam para áreas próximas aos humanos, parasitas com variado potencial de patogenicidade.

Uma importante associação pode ser feita entre o ciclo reprodutivo do gambá e o ciclo de vida dos carrapatos, principais vetores das FMB. Apesar de que os carrapatos, durante a segunda e terceira fases evolutivas já são obrigatoriamente parasitas, é importante ressaltar que no período da quarta e última fase evolutiva que compreende o período de novembro a março (LABRUNA et al., 2002) na qual existe um maior potencial parasitário, coincide com o período de maior crescimento populacional dos *Didelphis*.

Diante desta observação, pode-se supor que os gambás *D. aurita* possuem um importante papel no ciclo epidemiológico da FMB e de outras riquetsioses, pois como já foi mencionado, pois segundo Linardi (2006), estes animais estão dentre os gêneros mais importantes no papel de hospedeiro para pulgas e carrapatos. Segundo Linardi,

(2006), em uma recente obra quanto ectoparasitos dos marsupiais brasileiros, os gambás do gênero *Didelphis* são os animais mais importantes para estudos na área da acarologia, pois albergam uma quantidade expressiva de espécies, assim como alto grau de infestação de ectoparasitas por indivíduo (n=42), além de albergarem pulgas infectadas por tripanosomatídeos, como demonstrado por Salvador, (2003) e Perez, (2007). Alguns trabalhos pesquisaram a relação ectoparasito-hospedeiro na área silvestre (REIS et al., 2008; BOTÊLHO, et al., 2003; GUITTON et al., 1986; BARROS-BATTESTI et al., 2000), demonstrando diversidade expressiva de ectoparasitas em pequenos mamíferos silvestres, embora trabalhos nessa área ainda sejam raros no Brasil.

Outras características muito importantes desses marsupiais são sua susceptibilidade às riquetsioses assim como seu período de riquettsemia. Nos anos de 1930, o isolamento de *R. rickettsii* proveniente de ambientes naturais em gambás comprovou a susceptibilidade desses animais através de isolamentos dessa bactéria no estado de Minas Gerais na espécie *D. aurita* (reportado como *D. marsupialis*) (MOREIRA & MAGALHÃES, 1935) e também em São Paulo em outro *D. aurita* (TRAVASSOS, 1937)

O período de riquettsemia é outro fator de alta relevância já que nesse período os ectoparasitas não infectados podem se contaminar, e quanto maior esse período, maior será a probabilidade desses invertebrados contraírem a bactéria. Normalmente, esse período varia entre uma a duas semanas (BURGDORFER et al., 1966). Porém estudos recentes têm demonstrado que este período pode abranger de três a quatro semanas (BOZEMAN et al., 1967). De acordo com Horta e cols., (2009), em experimento laboratorial com *D. aurita* infectado com *R. rickettsii*, comprovou-se a riquettsemia por três a quatro semanas, através de PCRs positivas em carrapatos da espécie *A. cajennense*, o que justifica o presente estudo desses animais no ciclo da FMB.

O encontro de pequenos roedores como *R. rattus*, *N. squamipes*, *Bolomys*, *O. subflavus* e *Akodon* sp. nos municípios de Santa Cruz do Escalvado e Pingo D' Água, estado de Minas Gerais, indicam a existência de condições favoráveis à proteção e reprodução desses animais, tais como ausência de espécies predadoras, pela ação do próprio homem ao alterar o equilíbrio biológico de uma região, inclusive pela disponibilidade de alimentos em grãos encontrados em armazéns e paióis ou mesmo em pequenas plantações. A existência dessas espécies na região é bastante condizente com o comportamento sinantrópico desses pequenos mamíferos muito bem adaptados ao ambiente peri-domiciliar e domiciliar (FORATTINI, 1992; NAGY,

1993; FUNASA, 2002). De acordo com Reis e cols. (2006), o alto número de indivíduos da espécie *R. rattus* é justificado pelo seu habitat, já que normalmente esses roedores vivem em locais onde apresentam habitações humanas, e são encontrados nos forros das casas, visto que possuem habilidades de escalar facilmente paredes, também observado por D'Andrea e cols. (1999). A sua proximidade com o homem cria situações de grande risco de transferência de agentes infecciosos dessas espécies, além de dispersarem para outros animais, ampliando, assim, na sua disseminação.

A abundância da espécie *N. squamipes* está diretamente relacionada com proximidades aos cursos d'água (ERNEST & MARES 1986), e ao seu hábito, terrestre-aquático, pois a área de captura em Santa Cruz do Escalvado situa-se próxima às margens do Rio Doce. Seu comportamento foi comprovado por D'Andrea e cols. (1999), ao observarem que esses roedores fugiam para água ao serem soltos das gaiolas de captura, representando comportamento de refúgio frente ao perigo. Esta espécie também é encontrada em ambientes rurais (D'ANDREA et al., 1996)

As espécies *Akodon* sp, *Bolomys* sp. e *O. subflavus* foram as espécies com menores abundâncias. Roedores do gênero *Akodon* geralmente preferem ambientes com vegetações mais densas como capoeirões e matagais (ALMEIDA et al., 1986), o que não foi observado na área onde esses animais foram capturados.

O percentual de sororeatividade apresentado nas amostras da espécie *R. rattus* foi representativamente alta. Este resultado é importante, visto que entre as espécies de roedores coletados nos municípios, *R. rattus* é a espécie mais sinantrópica, cujo hábito intradomiciliar permite um contato mais estreito com homem, colocando-o em risco constante de contaminação por patógenos transportados por esses pequenos mamíferos. Além disso, o fato dessa espécie manter um raio de ação consideravelmente grande, ampliando o contato tanto com animais domésticos ou silvestres, o credencia como possível carreador de riquetsia na região.

A espécie *R. rickettsii* apresentou maior porcentagem de sorologia positiva. Em Santa Cruz do Escalvado, estado de Minas Gerais, dos 39 soros de roedores positivos para *R. rickettsii*, onze (28,2%) dos soros apresentaram título quatro vezes maiores para *R. rickettsii* do que os outros antígenos de espécies de riquetsias. Em Pingo D'Água, estado de Minas Gerais, dos 39 soros de roedores positivos para *R. rickettsii*, nove (23,07%) apresentaram título quatro vezes maiores para *R. rickettsii* do que os outros antígenos de espécies de riquetsias, o que evidencia que essa espécie ou outra muito próxima taxonomicamente tenha estimulado a resposta imunológica, sem que

tenha existido reação cruzada com os antígenos testados. O restante de soros de roedores positivos para riquetsioses não apresentaram certeza de qual espécie desencadeou a resposta imunológica, havendo a possibilidade de reação cruzada com outras espécies, dentre as não patogênicas.

Dessa forma, a riquetsia presente nesses animais simboliza sua circulação nos ambientes peridomiciliares e domiciliares, podendo infectar os animais domésticos e habitantes que ali se encontram, bem como os vetores de riquetsioses (carrapatos, pulgas e ácaros), pois esses pequenos roedores são animais amplificadores. Estudos laboratoriais mostraram que pequenos roedores são susceptíveis à infecção por riquetsias e desenvolvem riquetsemia suficiente para infectar ectoparasitos, embora por um curto período de tempo (REHACEK & URVOLGY, 1978).

De acordo com Pena (2007), o município de Santa Cruz do Escalvado oferece condições ecológicas favoráveis para o estabelecimento do ciclo epidemiológico da FMB e outras riquetsioses. Tal pensamento é sustentado pela reorganização, que aqui se entende por fluxos migratórios e atividades para subsistência ou fonte de renda, das quais o homem do campo está acostumado a fazer. A cidade possui características típicas de pequenas cidades do interior de Minas Gerais, das quais podemos listar um esboço de urbanização mal organizada, com sinal de degradação ambiental, falta de saneamento básico e de assistência médica para a toda população.

Lemos e cols, em estudos realizados nos anos de 1989 a 1990, encontraram sorologias positivas no local em humanos e cães, indicando riquetsioses circulantes no local (LEMOS et al., 1994; LEMOS et al, 1997). Em maio de 2005 a março de 2006, Pena e cols. realizaram um estudo de soroprevalência no mesmo município, indicando que gambás, equinos, cães e roedores apresentaram sorologia positivas para riquetsioses (PENA et al., 2009). Uma hipótese persistente seria a competição entre riquetsias como influência na dominância de uma bactéria sobre a outra, alterando os títulos.

Existem poucas pesquisas com roedores com relação à sorologia. Nos poucos registros da literatura, a espécie *R. rattus* sempre obteve destaque em números de indivíduos infectados com bactérias do gênero em questão, como visto por Ishikura e cols. (1992) e Ibrahim cols (1999).

No nível ecológico, podemos ver tanto no município de Santa Cruz do Escalvado quanto de Pingo D' Água, o trânsito livre de equinos, tanto na área urbana quanto na rural. Por ser um animal bastante utilizado em variadas tarefas como condução de pessoas, transporte de mercadorias, tração de charretes, etc, aliado ao

fato de albergarem grandes infestações de carrapatos (LABRUNA et al., 2000), poderia dispersar carrapatos infectados, os quais podem se estabelecer em outras áreas provocando, assim, o surgimento de novos focos.

Segundo Oliveira (2004), o *A. cajennense* é encontrado com frequência infestando eqüídeos, seus hospedeiros preferenciais, fato este observado nos municípios estudados. Sendo o *A. cajennense* o principal vetor da FMB e considerando, como já mencionado, sua dispersão em eqüídeos, deve-se atentar para o papel sentinela desses animais na cadeia epidemiológica da FMA na região (CARDOSO et al., 2006).

O padrão de distribuição de ectoparasitas encontrados em nosso estudo, no qual há predomínio da espécie *A. cajennense* foram semelhantes aos descritos por Lima e cols. (1995) e Lemos e cols. (1997) em estudos realizados em áreas endêmicas do estado de São Paulo, e por Cardoso (2004) e Pena (2007) no estado de Minas Gerais, o que nos leva a crer que haja maior prevalência desta espécie em áreas endêmicas para febre maculosa.

O cão, assim como os eqüinos, é um animal próximo ao homem, e pode ter também um importante papel na cadeia epidemiológica da FMB. De acordo com Lemos e cols. (1997), a prevalência de reações sorológicas positivas em cães de uma área geográfica põe em evidência o risco de infecção humana, pois os cães serviria em também como hospedeiros sentinelas dessa doença.

Apesar do baixo percentual de sororeatividade em cães e eqüinos nos municípios de Santa Cruz do Escalvado e Pingo D' Água, no estado de Minas Gerais, o resultado do seqüenciamento detectado em *A. cajennense*, espécies de ectoparasitos encontrados em cães e eqüinos das regiões, confirmam que se trata de uma bactéria pertencente ao gênero *Rickettsia*.

O maior percentual de pulgas coletadas foi classificado como pertencentes ao gênero *Ctenocephalides* e foram encontradas parasitando cães, roedores e especialmente gambás. O gênero *Ctenocephalides* possui uma ampla distribuição mundial e amplo espectro de hospedeiros, sendo um dos parasitas mais comuns em cães e gatos, além de se alimentar também em humanos (MÁRQUEZ et al., 2002; KENNY et al., 2003). Esta alta prevalência evidencia o compartilhamento dessas pulgas entre animais silvestres e domésticos, devido à proximidade de seus habitats em ambientes suburbanos (AZAD et al., 1997; LINARDI & GUIMARAES, 2000).

Embora o encontro de *R. felis* em pulgas do gênero *Ctenocephalides* já tenha sido verificada em áreas endêmicas para febre maculosa em São Paulo (HORTA et al,

2007) e em Minas Gerais (Cardoso, et al., 2006; Oliveira et al., 2008), neste trabalho associamos as pulgas positivas de gambás e cães para *R. felis*, verificando uma associação entre o encontro de pulgas infectadas e áreas de casos confirmados de FMB. Porém, mais estudos sobre a capacidade e competência vetorial destes artrópodes precisam ser realizados. A falta de diagnóstico específico da riquetsiose causada pela *R. felis* constituiu uma dificuldade no que diz respeito ao estudo natural da doença e que pode estar contribuindo para a ausência de dados sobre sua morbidade e letalidade.

Esses resultados encontraram evidências de atual circulação de riquetsias nas áreas de coleta em Pingo D'água e Santa Cruz do Escalvado. Embora se tenha detectado a presença de anticorpos anti-riquetsia do GFM, não há registro sistemático de casos de FM nas regiões estudadas, colocando esses municípios num nível de baixa transmissão, embora com considerável risco de ocorrência.

Concluindo, a FMB tem como principal agente a *R. rickettsii* conforme determinado a várias décadas, tendo a riquetsiose causada por *R. felis* sido identificada somente há alguns anos. Os achados encontrados neste trabalho, relacionam possivelmente a presença de *R. felis* em pulgas e carrapatos, provenientes dos municípios de Santa Cruz do Escavado, estado de Minas Gerais, como intrigantes do ponto de vista epidemiológico e indicam a possível participação de mais uma espécie de riquetsia na etiologia da doença. Por esta razão, tornam-se necessárias investigações sobre a história natural destes agentes nas regiões endêmicas para FMB, o que pode fornecer subsídios para o entendimento da epidemiologia deste agavo de saúde e auxiliando no desenvolvimento de estratégias visando a prevenção e controle destas doenças.

VII- CONCLUSÃO

Baseando-se nos resultados obtidos nos trabalhos aqui apresentados, pode-se concluir-se que:

1. A ocorrência de resposta imune contra antígenos *Rickettsia*-específicos do GFM na RIFI, observada em *D. aurora* (42,1%) e roedores (62,91%), capturados no município de Santa Cruz do Escalvado, estado de Minas Gerais, sugere a participação desses animais silvestres no ciclo enzootico dessa doença na região;
2. A ocorrência de resposta imune contra antígenos *Rickettsia*-específicos do GFM na RIFI, observada em cães (20,89%) e eqüinos (15,15%), no município de Santa Cruz do Escalvado, estado de Minas Gerais, sugere a participação

desses animais domésticos como sentinelas no ciclo das riquetsioses na região;

3. A ocorrência de resposta imune contra antígenos *Rickettsia* específicos na RIFI em roedores da espécie *R. rattus* (93,75%), *N. squamipes* (21,74%) e *Akodon* sp.(80%) capturados no município de Santa Cruz do Escalvado, estado de Minas Gerais, fortalece a hipótese destes pequenos mamíferos estarem participando no ciclo da FMB na região do município em questão.
4. A elevada ocorrência de sorologia positiva à RIFI para riquetsias do GFM em roedores (84,73%) observados no município de Pingo D' Água, estado de Minas Gerais, sugere a participação destes no ciclo enzootico dessas doenças na região em estudo.
5. Os resultados de sororeatividade para riquetsioses à RIFI com o uso de antígenos *Rickettsia*-específicos observados em cães (8,33%) e eqüinos (38,09%) no município de Pingo D' Água, estado de Minas Gerais, sugere a participação desses animais domésticos como sentinelas na ocorrência das riquetsioses neste município.
6. A observação de sorologia à RIFI com o uso de antígenos *Rickettsia*-específicos em roedores das espécies *R. rattus* (83,88%), *N. squamipes* (85,72%), *Bolomys* sp.(100%) *Or. subflavus* (85,72%) capturados no município de Pingo D' Água, estado de Minas Gerais fortalece a hipótese destes pequenos mamíferos poderem estar participando no ciclo da FMB na região em questão.
7. Os carrapatos do gênero *Amblyomma* e as pulgas do gênero *Ctenocephalides* predominam dentre os gêneros destes ectoparasitas em gambás, roedores, cães e eqüinos nos municípios de Santa Cruz do Escalvado e Pingo D' Água, estado de Minas Gerais.
8. O seqüenciamento de organismos do gênero *Rickettsia* em carrapatos do gênero *A. cajennense* parasitando gambás, cães, e eqüinos, e em pulgas dos gêneros *C.canis* e *C. felis* parasitando gambás, no município de Santa Cruz do Escalvado, estado de Minas Gerais, confirmam a presença de riquetsias do GFM circulantes nas regiões estudadas.

VIII- PERSPECTIVAS

No caso particular das riquetsioses, nossos achados estimulam a continuação da busca, por exemplo, de reservatórios silvestres das riquetsias no estado de Minas Gerais, correlacionando os achados com a ecologia e a fisiopatologia da FMB, considerando o reduzido número de pesquisas até então realizadas e os vários questionamentos que ainda permanecem sobre essa zoonose.

Os próximos passos que poderão ser feitos serão RIFI para verificação de infecções recentes por riquetsias por meio da detecção de IgM nos soros coletados nas duas regiões em estudo. Nos soros de animais domésticos com alta sorologia dever-se-ia ainda testa-los para organismo riquetsiasis do Grupo Tifo, realizando-se também novas PCRs com o uso de *primers* para amplificação do gene 17kDa, preferencialmente *primers* que amplifiquem fragmentos maiores deste gene, possibilitando desta maneira a obtenção de resultados conclusivos. Também dever-se-ia investigar e analisar a importância do ciclo silvestre destes agentes e seu elo com

os ciclos domiciliar e peri-domiciliar, o que possibilitará estabelecer uma proposta de sistema de vigilância epidemiológica permanente e controle destes agravos de saúde.

IX- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

ADAMS, J. R., et al. Infection of colonized cat fleas, *Ctenocephalides Felis* (Bouche), with a Rickettsia-like Microorganism. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.43, n.4, p.400-409, October. 1990

ALMEIDA, C. R., DE; ALMEIDA, A. M. P., DE; BRASIL, D. P.; SOBRINHO, J. D.; LEAL, M. A. M. Estudo do roedor *Akodon arviculoides*, Wagner, 1842 (Cricetidae) - Importância nos focos pestosos do Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 81, n. 4, p. 409-416, 1986.

ANGERAMI, R. N., et al. Brazilian Spotted Fever: A Case Series from an Endemic Area in Southeastern Brazil: Epidemiological Aspects. *Annals of New York Academy Science*, v.1078, n.1, p.170-172, October. 2006.

ANGERAMI, R.N. Aspectos clínicos e laboratoriais da Febre Maculo Brasileira. Experiência do Hospital das Clínicas- HC/UNICAMP-Campinas-SP-Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Ouro Preto, v.13, p.360, set 2004.

ANTUNES, G. M. *Diversidade e Potencial Zoonótico de Parasitos de Didelphis albiventris Lund, 1841 (Marsupialia: Didelphidae)*. 2005. (Tese: Doutorado em Ciências Veterinárias na Área de Parasitologia). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

ARAGÃO, H. B. & FONSECA, F. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.59, p.115-129. 1961.

ARTHUR, D. R. Feeding in ectoparasitic Acari with special reference to ticks. *Adv. Parasitol.*, v.3, p.249–298. 1965.

ATWOOD, E. L., et al. A contribution to the epidemiology of Rocky Mountain spotted fever in the eastern United States. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.14, p.831-837. 1965.

AUSTAD, S. N. *The adaptable opossum*. *Scientific American*, 256: 98-104, 1988.

AZAD AF, BEARD CB. Rickettsial Pathogens and Their Arthropod Vectors. *Emerg Infect Dis* 4 (2): 179 – 186, 1998.

AZAD, A.F.; RADULOVIC, S.; HIGGINS, J.A.; NODEN, B.H.; TROYER, J.M. Flea-borne Rickettsioses: ecologic considerations. *Emerging Infectious Diseases*, v.3, n.3, p.319-327, 1997.

AZAD, A. F.; SACCI, J. B., JR; NELSON, W. M.; DASCH, G. A.; SCHMIDTMANN, E. T.; CARL, M. Genetic characterization and transovarial transmission of typhus-like *Rickettsia* found in cat fleas. . *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America*, v. 89, p. 43-46, 1992.

AZAD, A. F., et al. Detection of rickettsiae in arthropod vectors by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Annals of New York Academy Science*, v.590, p.557-563. 1990.

BALASHOV, Y. S. Interaction between blood-sucking arthropods and their hosts, and its influence on vector potential. *Ann. Rev. Entomol.*, v. 29, p. 137-156, 1984.

BARCI, L. A. G.; NOGUEIRA A. H. C. *Febre Maculosa Brasileira*. Instituto Biológico, São Paulo, v. 67, n. 1/2, p. 23-29, jan./dez. 2005.

BARLETT, P. C. & JUDGE, L. J. The role of epidemiology in public health. *Office International des Epizooties Scientific and Technical*, v.16, n.2, p.331-336. 1997.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; LINARDI, P. M.; BOTELHO, J. R.; SBALQUEIRO, I. J. *Interrelationship between ectoparasites and wild rodents from Tijucas do Sul, State of Paraná, Brazil*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 93: 719-725, 1998.

BERGALHO, H. G.; BOSSI, D. E. *Os roedores e marsupiais da Juréia: ecologia e parasitismo na comunidade de pequenos mamíferos terrestres*. In: Marques, O. A. V. & Duleba, W. (eds). *Estação Ecológica da Juréia - Itatins: ambiente, físico, flora e fauna*. Editora Holos, Riberão Preto, Brasil, p.296-303, 2004

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

BOOSTROM, A., et al. Geographic association of Rickettsia felis-infected opossums with human murine typhus, Texas. *Emerging Infectious Disease*, v.8, p.549-554. 2002.

BOTÊLHO, M. C. N.; OLIVEIRA, J.B.; LEITE, L. M.R.M.; BASTOS NETO, I. P.; SILVA, L. A. M; CAMPELHO, M. L. C. B.; AGUIAR, M. C. A.; LINARDI, P. M.; SERRA-FREIRE, N.M. Siphonápteros parasitos de marsupiais e pequenos roedores silvestres da Reserva Biológica de Serra Negra, Pernambuco, Brasil. Registro de novos hospedeiros. *Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida*, vol.22. n.2.p.71-74, 2003.

BOTELHO, J. R. & LINARDI, P. M. Interrelações entre ectoparasitos e roedores em ambientes silvestre e urbano de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, v.40, p.425-430. 1996.

BOZEMAN FM, SHIRAI A, HUMPHRIES JW, FULLER HS. Ecology of Rocky Mountain Spotted Fever II. Natural infection of wild mammals and birds in Virginia and Maryland. *Am J Trop Med Hyg* 16(1): 4859, 1967

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 6ed. Brasília:Ministério da Saúde, 816p, 2005.

BRASIL. Portaria Nº. 1943/GM, de 18/10/2001. Define a relação de doenças de notificação compulsória para todo território nacional. Ministério da Saúde. Brasília: DOU, n. 204, seção 1, pág.35, de 24 de outubro de 2001.

BROWN, B. E. Atlas of new world marsupials. Fieldiana Zoology: New Series. v. 102, p. 1-108, 2004.

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

BURGDORFER, W.; VARNA, M. G. R. Trans-stadial and transovarial development of diseases agents in arthropods. *Ann. Rev. Entomol.*, v. 12, p. 347-376, 1967.

BUSTAMENTE, M. E. & VARELA, G. Estudios de fiebre manchada en Mexico. Papel del Rhipicephalus sanguineus en la transmission de la fiebre manchada en la Republica Mexicana. *Rev. Inst. Salub. Enferm. Trop.*, v.8, p.139-141. 1947.

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*, v. 8, p. 259-262, 2004.

CARDOSO, L. D. *Detecção e caracterização de Rickettsia ssp. circulante em foco inativo peri-urbano do município de Caratinga, MG.* 2004. Universidade Federal de Ouro Preto, 2004.

CARDOSO, L. D., et al. Caracterização de *Rickettsia* spp. circulante em foco silencioso de febre maculosa brasileira no Município de Caratinga, Minas Gerais, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v.22, p.495-501. 2006.

CARVALHO NETO, C. *Manual Prático de Biologia e Controle dos Roedores*. São Paulo. Novartis, v. 2005.

CARMICHAEL, J. R.; FUERST, P. A. A rickettsial mixed infection in a *Dermacentor variabilis* tick from Ohio. *Annals New York Academy of Sciences*, v. 1078, p. 334-337, 2006.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Diagnosis and Management of Tickborne Rickettsial Diseases: Rocky Mountain Spotted Fever, Ehrlichioses, and Anaplasmosis - United States; a practical guide for physicians and other health-care and public health professionals. Morbidity and Mortality Weekly Report. CDC, Atlanta, GA. v.55, n.RR-4, 36p, 2006.

CERQUEIRA, R. The distribution of *Didelphis* in South America (Polipromata, Didelphidae). *Journal of Biogeography*, p. 135-145, 1985.

CERQUEIRA, R.; LEMOS, B. *Morphometric differentiation between Neotropical black-eared opossums, Didelphis marsupialis and D. aurita (Didelphimorphia, Didelphidae). Mammalia*. v. 64, n. 3, p. 319-327, 2000.

D'ANDREA, P. S.; GENTILE, R.; CERQUEIRA, R.; GRELLE, C. E. V.; HORTA, C.; REY, L. Ecology of small mammals in a Brazilian rural area. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 16, n. 3, p. 611-620, 1999.

D'ANDREA, P. S.; HORTA, C.; CERQUEIRA, R.; REY, L. Breeding of the water rat (*Nectomys squamipes*) in the laboratory. *Laboratory Animals*, v. 30, p. 369-376, 1996.

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

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

DIAS, E. Depositários naturais e transmissores da febre maculosa brasileira. *Brasil Médico*, v.52, p.269-272. 1938.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, P. J.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; S.C., R.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and HGE agent as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology*, v. 51, p. 2145-2165, 2001.

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

EREMEEVA, M. & DASH, G. A. *Rickettsiae*. In: Encyclopedia of microbiology. New York: Academic Press, v.4, 2000. p.140-180.

ERNEST, K. A.; MARES, M. A. Ecology of *Nectomys squamipes*, the neotropical water-rat in Central Brazil: Home range, habitat selection, reproduction and behaviour. *Journal of Zoology*, v. 210, p. 599-612, 1986.

ESTRADA, D. A. *Aplicação da Reação em Cadeia pela Polimerase para detecção de riquetsias em carrapatos (Acari: Ixodidae) coletados no Município de Campinas, SP*. 57 p. Tese de mestrado. Unicamp. Campinas, 2003

FIGUEIREDO, L. T. M., et al. Report on ticks collected in the Southeast and Mid-West regions of Brazil: analyzing the potential transmission of tick-borne pathogens to man. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.32, p.613-619. 1999.

FINLEY, R. W., et al. *Rickettsia parkeri*: a case of tick-borne, eschar-associated spotted fever in Mississippi. In: American Society for Microbiology, 2006, Atlanta,

Program and abstracts of the International Conference on Emerging Infectious Diseases, 2006. p.19–22.

FLECHTMANN, C. H. W. *Ácaros de importância médico-veterinária*. 3ª. ed. São Paulo: Nobel, 1985.

FOCUS SAÚDE PÚBLICA. Ratos: Prejuízos e Doenças na Área Rural. *Revista Focus Saúde Pública*, v.27, p.4-8. 2000.

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

FONSECA, L. M. G., DA ; MARTINS, A. V. Febre Maculosa: Revisão de literatura - Artigo de revisão. *Saúde & Ambiente em Revista*, v. 2, n. 1, p. 01-20, 2007.

FONTES, L. R., et al. Brazilians spotted fever transmitted by *Amblyomma aureolatum* (Acari) in Mogi das Cruzes, Brazil: report off our human cases an denvironmental control measures. In: 21º Congresso de Entomologia, 2000, Foz de Iguaçu, 2000. p.749.

FOURNIER, P. E., et al. Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae by study of the outer surface protein rOmpA. *Int J Syst Bacteriol*, v.48, n.3, p.839-849, July. 1998.

FUENTES, L. Ecological study of Rocky Mountain spotted fever in Costa Rica. *Am J Trop Med Hyg*. v.35, p.192–6, 1986.

FUNASA. Manual de controle de roedores. *Brasília: Fundação Nacional da Saúde*, p. 132, 2002.

GALVÃO, M. A. M.; ZAVALA-VELAZQUEZ, J. E.; ZAVALA-CASTRO, J. E.; MAFRA, C. L.; CALIC, S. B.; WALKER, D. H. *Rickettsia felis* in the Americas. *Annals New York Academy of Sciences*, v. 1078, p. 156-158, 2006a.

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

GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C. L.; 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*, v. 37, n. 3, p. 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*, v. 9, n. 11, p. 1402-1405, 2003a.

GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C. L.; MORON, C.; ANAYA, E.; WALKER, D. H. Rickettsiosis of the Genus *Rickettsia* in South America. *Annals New York Academy of Sciences*, v. 990, p. 57-61, 2003b.

GALVÃO, M. A. M., et al. *Rickettsia felis* in *Amblyomma cajennense* ticks, Brazil. In: MIDA/Institute of Microbiology and Immunology, Medical Faculty, 2002a, *International Conference on Rickettsiae and Rickettsial Diseases*, 2002. p.103.

GALVÃO, M. A. M. *Febre Maculosa em Minas Gerais: um estudo sobre a distribuição da doença no estado e seu comportamento em área de foco peri-urbano*. (1996). Doutorado em Medicina Tropical - Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo horizonte, 1996.

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

GALVÃO, M. A. M. *A febre maculosa brasileira em Minas Gerais e seus determinantes*. 1988. (Dissertação, Mestrado em Saúde Pública). Escola Nacional de Saúde Pública, ENSP/Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1988.

GARDNER, A.L. *Order Didelphimorphia*. In: Wilson, D.E. & Reeder, D.M. *Mammals species of the world: A taxonomic and geographic reference*. Smithsonian Institution, Washington, USA, p.15-23, 1993

GUITTON, N; FILHO, N.A.; SHERLOCK, I.A. Ectoparasitos de roedores e marsupiais no ambiente silvestre da Ilha Grande, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.81, n.2, p.233-234, 1986.

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

GONÇALVES, A. J. R., et al. Rickettsioses - a propósito de quatro casos diagnosticados no Rio de Janeiro de febre maculosa brasileira. *Folha Médica (BR)*, v.82, p.127-134. 1981.

HACKSTADT, T. The biology of rickettsiae. *Infectious Agents Diseases*, v. 5, p. 127-143, 1996.

HARDEN, V.A. Rocky Mountain SPOTTED FEVER (1990). The Johns Hopkins University press

HECHEMY, K. E., et al. Rickettsiology: present and future directions—preface. . *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.990, p.XVII-XVXX. 2003.

HIGGINS, J. A.; RADULOVIC, A.; SCHRIEFER, M. E.; AZAD, A. F. *Rickettsia felis*: a new species of pathogenic *rickettsia* isolated from cat fleas. *J. Clin. Microbiol.*, v. 34(3), p. 671-674, 1996.

HORTA, M. C. ; MORAES-FILHO, J. ; [CASAGRANDE, R. A.](#) ; SAITO, T. B. ; ROSA, S. C. ; [OGRZEWALSKA, M.](#) ; [MATUSHIMA, E. R.](#) ; [LABRUNA, M. B.](#) . Experimental Infection of Opossums *Didelphis aurita* by *Rickettsia rickettsii* and Evaluation of the Transmission of the Infection to Ticks *Amblyomma cajennense*. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, v. 9, p. 109-117, 2009.

HORTA, M. C., et al. Isolation of *Rickettsia felis* in the Mosquito Cell Line C6/36. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.72, n.2, p.1705-1707, February 1, 2006. 2006.

HORTA, M. C., et al. *Rickettsia felis* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae) in the State of São Paulo, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.57, p.321-325. 2005.

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. (Dissertação de mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2002.

IBGE. Pontos cardiais do Município de Santa Cruz do Escalvado, 2009. Disponível em [http. www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). Acesso em : 20.04.10

IBRAHIM, I. N.; OKABAYASHI, T.; RISTIYANTO; LESTARI, E. W.; YANASE, T.; MURAMATSU, Y.; UENO, H.; MORITA, C. Serosurvey of wild rodents for Rickettsioses (spotted fever, murine typhus and Q fever) in Java Island, Indonesia. *European Journal of Epidemiology*, v. 15, p. 89-93, 1999.

INOKUMA, H., et al. Citrate Synthase Gene Sequence: a New Tool for Phylogenetic Analysis and Identification of Ehrlichia. *J. Clin. Microbiol.*, v.39, n.9, p.3031-3039, September 1, 2001. 2001.

ISHIKURA, M., et al. Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae based on gltA, 17-kDa, and rOmpA genes amplified by nested PCR from ticks in Japan. *Microbiol Immunol.*, v.47, p.823-32. 2003.

ISHIKURA, M.; FUJITA, H.; SHUJI, A.; MATSUURA, K.; WATANABE, M. Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae isolated from ticks in Japan. *Microbiology Immunology*, v. 46, n. 4, p. 241-247, 2002.

ISHIKURA, M.; WATANABE, M.; NAKAYAMA, T.; MATSUURA, K.; MORITA, O.; UCHIDA, T. Seroepidemiology of Spotted Fever Group Rickettsiae in Small Field Rodents in Japan. *Microbiology and Immunology*, v. 36, n. 6, p. 649-653, 1992.

KELLY, P.J.; MEADS, N.; THEOBALD, A.; FOURNIER, P.E., RAOULT, D. *Rickettsia felis*, *Bartonella henselae*, and *B. clarridgeiae*, New Zealand. *Emerging Infectious Diseases*, v.10, n.5, p.967-968, 2004.

KENNY, M.J.; BIRTLES, R.J.; DAY, M.J.; SHAW, S.E. *Rickettsia felis* in the United Kingdom. *Emerging Infectious Diseases*, v.9, n.8, p.1023-1024, 2003.

LABRUNA, M.B. *Epidemiologia da Febre Maculosa no Brasil e nas Américas*. In: I SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ACAROLOGIA, Viçosa-MG. ANAIS... Viçosa, p.63-78, 2006.

LABRUNA, M. B., et al. *Rickettsia* Species Infecting *Amblyomma cooperi* Ticks from an Area in the State of Sao Paulo, Brazil, Where Brazilian Spotted Fever Is Endemic. *J. Clin. Microbiol.*, v.42, n.1, p.90-98, January 2004.

LABRUNA, M. B., et al. Risk factors to tick infestations and their occurrence horses in the State of São Paulo, Brazil. *Vet Parasitol*, v.97, p.1-14. 2001.

LABRUNA, M. B. *Aspectos da biologia e epidemiologia dos carrapatos de equinos no Estado de São Paulo*. (2000). Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada a Zoonoses da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

LANGE, R. B.; JABLONSKI, E. **Mammalia do Estado do Paraná, Marsupialia**. *Estudos de Biologia*. v. 43, n. espec., p. 15-224, 1998.

LEMOS, E. R. Disease in Brazil. **Virus Reviews and Research**, v.7, p.7-16. 2002.

LEMOS, E. R.; ALVARENGA, F. B.; L., C. M.; RAMOS, M. C.; PADDOCK, C. D.; FEREBEE, T. L.; ZAKI, S. R.; FERREIRA, F. C.; RAVAGNANI, 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 Sao Paulo. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 65, p. 329-334, 2001.

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

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

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

LIMA, V. L. C.; FIGUEIREDO, A. C.; PIGNATTI, M. G. Febre Maculosa no município de Pedreira- Estado de São Paulo, Brasil. Relação entre ocorrência e parasitismo humano por ixodídeos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, n. 28, p. 135-137, 1995.

LINARDI, P. M. 2006. Os ectoparasitos de marsupiais brasileiros. *In: Cáceres, N. C. & Monteiro-Filho, E. L. A. (eds). Os marsupiais do Brasil: biologia, ecologia e evolução.* Editora da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, p.37-52, 2006

LINARDI, P.M.; GUIMARÃES, L.R. *Sifonápteros do Brasil*. São Paulo: Museu de Zoologia USP/FAPESP, 2000.29p.

LINARDI, P. M.; BOTELHO, J. R.; XIMENEZ, A.; PADOVANI, C. R.. Notes on ectoparasites of some small mammals from Santa Catarina State, Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 8: 183 -185, 1991.

LONGO L. Gambá. *Curiosidades da Vida Animal - Fauna Brasileira*. Disponível em: http://www.vidadecao.com.br/cao/index2.asp?menu=curiosidade_gamba.htm> Acesso em: 08 jun. 2007.

MAHARA, F. Three Weil-Felix reaction OX2 positive cases with skin eruptions and high fever. *J. Anan. Med. Assoc.*, v. 68, p. 4-7, 1984.

MANCINI, D. A. P.; NACIMENTO, E. M. M.; TAVARES, V. R.; SOARES, M. A. A ocorrência de riquetsioses do grupo *Rickettsia rickettsi*. *Rev. Saúde Pública*, São Paulo, v. 17, n. 6 , dez. 1983.

MATIAS, R. S., et al. *Biologia, comportamento e medidas de controle de roedores*. .In. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Campinas, 2002. p.625-671.

MÁRQUEZ, F.J.; MUNIAN, M. A.; PÉREZ, J. M.; PACHÓN, J. Presence of *Ricketstia felis* in the cat flea from Southweadtern Europe. *Emerging Infectious Diseases*, v.8, n.1, p.89-91, 2002.

MCDADE, J. E.; NEWHOUSE, V. F. Natural history of *Rickettsia rickettsii*. *Anuais da Revista de Microbiologia*, v. 40, p. 287-309, 1986.

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

MILAGRES, B. S. *Perfil sorológico de algumas infecções em capivara (Hydrochaeris hydrochaeris) capturadas no estado de São Paulo e Minas Gerais, Brasil*. (2004). - Dissertação de mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

MONTEIRO JL, FONSECA F. Typho exanthematico de S. Paulo – Novas experiências sobre transmissão experimental por carrapatos (*Boophilus microplus* e *Amblyomma cajennense*). *Mem. Inst. Butantã* 7:33-40, 1932

MOREIRA, J. A. & MAGALHÃES, O. Typho exanthematico de Minas Gerais (7a comunicacao). *Brasil Médico*, v. 51, p.388-392. 1937.

MOREIRA, J.A.; MAGALHÃES, O. Typho exanthemático em Minas Gerais. *Brasil-Médico*, v.21, p.465-470, 1935.

NAGY, T. Normas operacionais de centros de controle de zoonoses. Procedimentos para o controle de roedores. *Brasília: Fundação Nacional da Saúde*, p. 80, 1993.

NASCIMENTO, E. M.; SCHUMAKER, T. T. S. Isolamento e identificação de *Rickettsia* no Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 13, p. 1956-1960, 2004.

NASCIMENTO, E. M. M. *Isolamento e Detecção Molecular de Riquetsias do Grupo da Febre Maculosa, a Partir de Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787) e Espécimens Biológicos Humanos, Procedentes de Áreas Endêmicas do Estado de São Paulo*. 2003. (thesis). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

OLIVEIRA, R. P., et al. Rickettsia felis in Ctenocephalides spp. Fleas, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v.8, n.3, p.317-319. 2002.

OLIVEIRA, P. R. *Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae): Avaliação de Técnicas para o Estudo de Dinâmica Populacional e Biotecnologia*,. 1998. 97. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1998.

PADDOCK, C. D., et al. A Newly Recognized Cause of Spotted Fever Rickettsiosis in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, v.38, p. 805–811. 2004.

PAROLA, P., et al. Tick-Borne Rickettsioses around the World: Emerging Diseases Challenging Old Concepts. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.18, n.4, p.719-756, October 1, 2005. 2005.

PAROLA, P.; SANOGO, O.Y.; LERDTHUSNEE, K.; ZEAITER, Z.; CHAUVANCY, G.; GONZALEZ, J.P.; MIULLER, R.S.; TELFOR III, S.R.; WONGSRICHANALAI, C.; RAOLUT, D. Identification of Rickettsia spp. and Bartonella spp. in fleas from the Thai-Myanmar border. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.990, p. 173-181, 2003.

PASSAMANI, M. *Análise da comunidade de marsupiais em Mata Atlântica de Santa Teresa, Espírito Santo*. Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão, N. Série. v. 11/12, p. 215-228, 2000.

PEACOCK, M.G.; ORMSBEE, R.A.; JOHNSON, K.M. Rickettsioses of Central America. *Am J Trop Med Hyg.* v.20, p.941–9, 1971

PENA, D. C.; MAFRA, C. L.; CALIC, S. B.; LABRUNA, M. B.; MILAGRES, B. S.; WALKER, D. H.; GALVÃO, M. A. Serologic survey for antibodies to Rickettsia among

domestic and wild animal populations in Brazil. *Clinical Microbiology and Infection*, 2009.

PENA, D. C. H. *Epidemiologia das Riquetsioses em área de foco silencioso para Febre Maculosa Brasileira, Município de Santa Cruz do Escalvado, Minas Gerais, 2005-2006*. (2007). Mestrado em Biologia Molecular, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2007.

PEREZ, C.A. Bioecologia e manejo ambiental do carrapato-estrela *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) vetor da febre maculosa brasileira. Tese de doutorado, escola superior de agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo, 2007.

PHILLIP, R. N., et al. Serologic typing of rickettsiae of the spotted fever group by microimmunofluorescence. *Journal of Clinical Biology*, v.121, n.5, p.1961-1968. 1978.

PINTER, A. & LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in Cell Culture from the Tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. *Ann NY Acad Sci*, v.1078, n.1, p.523-529, October 2006.

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. (Mestrado). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

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

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

RAOULT, D. & PADDOCK, C. D. *Rickettsia parkeri* and other spotted fever infections in the United States. *N. Engl. J. Med.*, v.353, p.626-627. 2005.

RAOULT D, FOURNIER PE, ABBOUD P, CARON F. First Documented Human *Rickettsia aeschlimannii* Infection. *Emerg Infec Dis* 8(7): 748 – 749, 2002.

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

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

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

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

REIS, F.S.; BARROS, M.C.; FRAGA, E. C.; PENHA, T.; TEIXEIRA, W.; SANTOS, A.C.G. ; GUERRA, R. M. S. N. Ectoparasitas de pequenos mamíferos silvêstres de áreas adjacentes ao rio Itapecuru e área de preservação ambiental do Inhamum, Estado do Maranhão, Brasil. *Ver. Bras. Parasitol.Vet*, 17 Supl.1. p.69-74, 2008

REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. *Mamíferos do Brasil*. 1. ed. Londrina: EDUEL, 2006.

RIBEIRO, J. M. C. & FRANCISCHETTI, I. M. B. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post sialome perspectives. *Ann Rev Entomol*, v.48, p.73-88. 2003.

RICHTER, J.; FOURNIER, P.E; PETRIDOU, J.; HAUSSINGER, D.; RAOULT, D. *Rickettsia felis* infection acquired in Europe and documented by Polymerase Chain Reaction. *Emerging Infectious Diseases*, v.8, n.2, p.207-208, 2002.

RIPOLL, C.M.; REMONDEGUI, C.E.O.G.; ARAZAMENDI, R. Evidence of rickettsial spotted fever and ehrlichial infections in a subtropical territory of Jujuy, Argentina. *Am J Trop Med Hyg.* v.61, p.350–4, 1999.

ROSSI, R. V. *et al.* *Ordem Didelphimorphia. In: Mamíferos do Brasil.* Paraná, p. 35, 2006.

ROUX, V. & RAOULT, D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (ompB). *Int J Syst Evol Microbiol*, v.50, n.4, p.1449-1455, July 1, 2000. 2000.

ROUX, V. & RAOULT, D. Phylogenetic analysis of the genus *Rickettsia* by 16S rDNA sequencing. *Res. Microbiol.*, v.146, p.385-396. 1995.

SAMBROOK, J., *et al.* *Molecular Cloning - a laboratory manual.*In.: New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. , 1989.

SANTOS, A. P. *Aspectos epidemiológicos da febre maculosa em uma área endêmica do município de Mogi das Cruzes (SP) e estudo em laboratório do ciclo de vida do vetor Amblyomma aureolatum (Acari: Ixodidae).* 2003. (Dissertação de mestrado). Universidade de São Paulo, 2003.

SCHRIEFER, M. E., *et al.* Identification of a novel rickettsial infection in a patient diagnosed with murine typhus. *Journal of Clinical Microbiology*, v.32, n.4, p.949-954. 1994.

SCOLA, B. L.; RAOULT, D. Laboratory diagnosis of rickettsiosis: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 35, p. 2715-2727, 1997.

SEXTON, D. J.; MUNIZ, M.; COREY, G. R.; BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; DUMLER, J. S. *et al.* Brazilian spotted fever in Espírito Santo Brazil: description of a focus of infection in a new endemic region. *Am. J. Trop. Méd. Hyg.*, v. 49, p. 222-226, 1993.

SILVEIRA, I., et al. *Rickettsia parkeri* in Brazil. *Emerg Infect Dis*, v.13, n.7, p.1111-1113. 2007.

SILVEIRA, I. *Investigação de infecção pela bactéria Rickettsia parkeri em carrapatos Amblyomma triste no Estado de São Paulo: isolamento e caracterização molecular da bactéria.* (2006). Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

SOUZA, E. J., et al. Avaliação do efeito in vitro dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sobre ovos e larvas de *Amblyomma cajennense*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.8, p.127-132. 1999.

SOUZA, S. S. L. Aspectos ecológicos da febre maculosa: variação sazonal da fase não parasitária de Ixodídeos na mata ciliar de Campinas. In: 21º Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2001, Rio de Janeiro, 2001.

SUCEN. Superintendência de Controle de Endemias-SP. Febre Maculosa: informações para profissionais da saúde. Acessado dia 04/04/2006. Disponível no site: <http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/index.htm>

SUMNER, J. W., et al. Gulf Coast Ticks (*Amblyomma maculatum*) and *Rickettsia parkeri*, United States. *Emerging Infectious Diseases*, v.13, n.5, p.334-336. 2007.

TRAVASSOS, J. & VALLEJO, A. Possibilidade de *Amblyomma cajennense* se infectar em *Hydrochoerus capybara* experimentalmente inoculado com o vírus da febre maculosa. *Mem. Inst. Butantã* v.15, p.87-90. 1942.

TRAVASSOS, L. Revisão da família Trichostrongylidea Leiper 1912. Memória do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, n.1, 1937

VAIDYA, V. M.; MALIK, S. V. S.; KAUR, S.; KUMAR, S.; BARBUDDHE, S. B. Comparison of PCR, Immunofluorescence Assay, and Pathogen Isolation for Diagnosis of Q Fever in Humans with Spontaneous Abortions. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 46, n. 6, p. 2038-2044, June, 2008.

VENZAL, J. M., et al. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma triste* from Uruguay. *Emerg Infect Dis.*, v.10, p.1493–5. 2004.

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

VIEIRA, A. M. L., et al. *Informe técnico sobre Febre Maculosa.* 2004.

VIEIRA, M. V. *Body size form in two Neotropical marsupials, Didelphis aurita and Philander opossum (Marsupialia: Didelphidae).* *Mammalia.* v. 61, n. 2, p. 245-254, 1997.

WALKER, D. H. Clinical, epidemiologic and control perspectives of rickettsioses and ehrlichioses in the Americas. In: 13º Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e 1º Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses, 2004, Ouro Preto, Minas Gerais, 2004.

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

WALKER, D. H. Rocky Mountain Spotted Fever: a Disease in Need of Microbiological Concern. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 2, n. 3, p. 227-240, 1989.

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

WEINERT, L. A.; WERREN, J. H.; AEBI, A.; STONE, G. N.; JIGGINS, F. M. Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria. *BMC Biology*, v. 7, n. 6, p. 1-15, 2009.

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

WHITMAN, T. J., et al. Infection with *Rickettsia parkeri* in a US serviceman following a tick bite. *Emerg. Infect. Dis.*, v.13, p.334-336. 2007.

WOOLLEY, T. A. In. *Acarology: mites and human welfare*. Fort Collins: Library of Congress, 1988. p.484.

ZAVALA-VELASQUEZ, J. E., et al. *Rickettsia felis*—the etiologic agent of three cases of rickettsiosis in Yucatan. *Lancet*, v.356, p.1079-1080. 2000.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)