

Universidade Federal de Juiz de Fora
Pós Graduação em Ciências Biológicas
Mestrado em Comportamento e Biologia Animal

Liliane Silva Durães

**"BIODIVERSIDADE DE POTENCIAIS VETORES DE RICKETTSIAS EM ÁREAS
DE VULNERABILIDADE PARA FEBRE MACULOSA NO MUNICÍPIO DE JUIZ DE
FORA, MINAS GERAIS, BRASIL"**

Juiz de Fora

2015

Liliane Silva Durães

**"BIODIVERSIDADE DE POTENCIAIS VETORES DE RICKETTSIAS EM ÁREAS
DE VULNERABILIDADE PARA FEBRE MACULOSA NO MUNICÍPIO DE JUIZ DE
FORA, MINAS GERAIS, BRASIL"**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em ciências biológicas (Área de concentração em Comportamento e Biologia Animal).

Orientador: Professor Doutor Gilberto Salles Gazêta

Co-orientador: Professor Doutor Erik Daemon

Juiz de Fora

2015

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Durães, Liliane Silva.

Biodiversidade de Potenciais Vetores de Rickettsias em Áreas de Vulnerabilidade para Febre Maculosa no Município de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil / Liliane Silva Durães. -- 2015.

142 p. : il.

Orientador: Gilberto Salles Gazêta

Coorientador: Erik Daemon

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Comportamento Animal, 2015.

1. Febre Maculosa. 2. Rickettsia. 3. Amblyomma cajennense. 4. Ctenocephalides sp.. 5. Biologia Molecular. I. Gazêta, Gilberto Salles, orient. II. Daemon, Erik, coorient. III. Título.

Liliane Silva Durães

**"BIODIVERSIDADE DE POTENCIAIS VETORES DE RICKETTSIAS EM ÁREAS
DE VULNERABILIDADE PARA FEBRE MACULOSA NO MUNICÍPIO DE JUIZ DE
FORA, MINAS GERAIS, BRASIL"**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em ciências biológicas (Área de concentração em Comportamento e Biologia Animal).

Aprovado em: __/__/__

Banca Examinadora

Professor Doutor Gilberto Salles Gazêta (Orientador)
Universidade Federal de Juiz de Fora
Fundação Oswaldo Cruz

Doutora Marinete Amorim
Fundação Oswaldo Cruz

Doutor Caio Márcio de Oliveira Monteiro
Universidade Federal de Juiz de Fora

*Ao meus amores:
Leonardo Riolino Turolla e Vida Durães.*

Agradecimentos

Primeiramente agradeço ao meu bom Deus pela oportunidade de conclusão de mais esta etapa em minha vida, e por colocar em meu caminho uma pessoa especial que me deu amor, carinho, estudo, saúde... Enfim, todos os requisitos inerentes à formação de um adulto e a oportunidade de me tornar essa mulher que sou hoje, minha Dindinha Ivone, que amo imensamente.

À minha mãe Rita e irmã Tatiane que sempre estiveram ao meu lado, torcendo, apoiando, participando ativamente...

Ao meu amigo Daniel Leal Navarro por me indicar o caminho das pedras, e em especial aos amigos Frederico Rodrigues Ramalho, que em todos os momentos, sejam bons ou ruins, permaneceu ao meu lado, participando de todos os detalhes desta empreitada, e Pedro Eugênio Araújo, que me acolheu com tamanho carinho, zelo e amor.

À Ana Luisa Croce e Silva, que me incentivou, participou e apoiou incondicionalmente.

À Crisley Vieira da Silva, por ter ajudado a me manter firme nos momentos críticos, sempre com uma palavra, com gestos carinhosos, bem como no processo de confecção desta.

Às minhas amigas Silvia Lérias e Priscila Silva, pelo amparo, companheirismo e hospedagem!

Ao Professor Doutor Gilberto Salles Gazêta pela orientação, compreensão, paciência e parceria.

À Professora Marinete Amorim pelo carinho, disponibilidade e entrega.

Aos meus parceiros do Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses-LIRN, por toda força e carinho, em especial à Fernanda Barbosa, Karen Medeiros Cardoso, Pablo Lemos, Karla Bitencourth Garcia e Arannadia Barbosa Silva,

A todos os colaboradores-amigos que me auxiliaram em momentos decisivos, com destaque para Anna Carolina Lima, Willian Fernandes, Talita Peters, Rita Hasters e Alessandra Toledo.

À minha eterna orientadora, a Professora Glênia Maria de Magalhães Campos.

Aos professores, em especial Dr. Erik Daemon e funcionários do Programa de Pós Graduação em Comportamento e Biologia Animais da Universidade Federal de Juiz de Fora.

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

MEU MUITO OBRIGADA!

“Sempre que penso que falhei, ou que meu trabalho foi imperfeito, quando fui criticado com desprezo, e mesmo quando fui excessivamente elogiado, de forma a sentir-me envergonhado, meu grande conforto foi dizer centenas de vezes a mim mesmo que ‘trabalhei tanto e com tanto empenho quanto poderia, e nenhum homem pode fazer mais do que isso’.”

Charles Darwin.

Resumo

O município mineiro de Juiz de Fora se destaca no contexto epidemiológico por possuir indicadores de vulnerabilidade, como alto número de notificações do estado, com casos ocorrentes no perímetro urbano, que detém elevada densidade populacional, ocupação de áreas limítrofes com fragmento de mata, as quais margeiam áreas confirmadamente endêmicas, possibilitando o intercâmbio de artrópodes vetores com mamíferos hospedeiros. Tais áreas propiciam o desenvolvimento e a manutenção dos ciclos enzoótico e epidêmico para Febre Maculosa. Mediante ao exposto, o objetivo geral deste projeto foi investigar e mapear a relação natural entre espécies de *Rickettsia* sp. e seus potenciais vetores em cinco regiões de vulnerabilidade do município. Especificamente, objetivaram-se: a determinação da composição da fauna de ectoparasitos potencialmente vetores coletados sobre hospedeiros vertebrados, bem como livres no ambiente; análise do ciclo enzoótico através da detecção de rickettsias por meio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR); a caracterização dos agentes rickettsias por sequenciamento e análises filogenéticas e a avaliação dos aspectos epidemiológicos da rickettsias circulantes, dos vetores e seus hospedeiros vertebrados. Os ectoparasitos foram coletados no período de 2013-2014 em localidades que carecem de informações sobre a manutenção do ciclo de transmissão de rickettsias: Caetés, Igrejinha, Paula Lima, Torreões e Valadares. No total foram coletados e identificados 12.692 ectoparasitos, entre pulgas do gênero *Ctenocephalides* e carrapatos dos gêneros *Amblyomma*, *Rhipicephalus* e *Dermacentor*, com posterior processamento de 2.379 espécimes de maneira individual ou reunidos em lotes de acordo com localidade, sexo, estágio de desenvolvimento, constituindo 249 amostras. O DNA genômico destas amostras foi extraído e submetido à pesquisa de genes rickettsiais *gltA* (gênero *Rickettsia*) e *ompA* (Grupo da Febre Maculosa-GFM). Foram obtidas 29 amostras positivas, exceto para Caetés; sendo 16 para o gene *gltA*, com 11 amostras sequenciáveis, e 13 amostras para o gene *ompA*, com sete sequenciáveis; com destaque para *Amblyomma cajennense* sendo a espécie mais prevalente e com 4,29% de taxa de infecção mínima. Sequências com 99 e 100% de identidade com a espécie patogênica *Rickettsia felis* foram diagnosticadas em *Ctenocephalides canis* e *Ctenocephalides felis*. E de forma inédita o registro de *Rickettsia bellii* em *Amblyomma dubitatum* na Microrregião de Juiz de Fora, apresentando sequências com 97% de homologia. O presente trabalho revela uma maior distribuição geográfica de rickettsias do GFM, incluindo *R. felis* causadora da rickettsiose felis, na Microrregião de Juiz de Fora.

Palavras-chave: Febre Maculosa, *Rickettsia*, *Amblyomma cajennense*, *Ctenocephalides* sp., *ompA*, *gltA*.

Abstract

The city of Juiz de Fora, in the Brazilian state of Minas Gerais, stands out in the epidemiologic context for possessing vulnerability indicators, such as a high number of this state's notifications, with cases occurring in the urban perimeter, which contains an elevated population density, and the occupation of limit areas with forests' fragments, which have a frontier with confirmed endemic areas, making possible the interchange of arthropod vectors with mammal hosts. Such areas propitiate the development and the maintenance of the enzootic and the epidemic cycles for the Spotted Fever. By the above, the general objective of this project was to investigate and to map the natural relation between *Rickettsia* sp. Species and its potential vectors in five regions of vulnerability in the city. Specifically, here are the objectives: the determination of the fauna composition for ectoparasites potentially vectors, collected on vertebrate hosts, as well as loose in the environment; analysis of the enzootic cycle through the detection of rickettsias by Polymerase Chain Reaction (PCR); the rickettsias agents characterization through sequencing and phylogenetic analyses and the evaluation of the epidemiologic aspects of the circulating rickettsias, of the vectors and their vertebrate hosts. The ectoparasites were collected in the period of 2013-2014 in places that need information on the maintenance of rickettsias transmission cycle: Caetés, Igrejinha, Paula Lima, Torreões e Valadares. As a total, there were collected and identified 12,692 ectoparasites, among fleas from the gender *Ctenocephalides* and ticks from the genders *Amblyomma*, *Rhipicephalus* and *Dermacentor*, with a posterior processing of 2,379 specimens in an individual way or gathered in lots according to place, sex, development state, constituting 249 samples. The genomic DNA from these samples was extracted and submitted to research of rickettsias *gltA* (gênero *Rickettsia*) e *ompA* (Grupo da Febre Maculosa-GFM) genes. There were obtained 29 positive samples, except for Caetés; from which 16 for the *gltA* gene, with 11 sequenced samples, and 13 samples for the *ompA* gene, with seven sequenced; especially *Amblyomma cajennense* as the most prevalent species and with 4.29% of minimal infection rate. Sequences with 99 and 100% of identity with the pathogenic species *Rickettsia felis* were diagnosed in *Ctenocephalides canis* and *Ctenocephalides felis*. And in a surprising way the register of *Rickettsia bellii* in *Amblyomma dubitatum* in Juiz de Fora's Micro-region, presenting sequences with 97% of homology. This paper reveals a bigger geographic distribution of rickettsias from GFM, including *R. felis* that causes rickettsiosis felis, in Juiz de Fora's Micro-region.

Keywords: Spotted Fever, *Rickettsia*, *Amblyomma cajennense*, *Ctenocephalides* sp., *ompA*, *gltA*.

Lista de Figuras

Figura 1: <i>Rickettsia rickettsii</i> parasitando células do endotélio vascular de mamíferos, corada pela técnica de Giemsa	26
Figura 2: <i>Amblyomma cajennense</i> , macho a esquerda e fêmea a direita	31
Figura 3: Ciclo de vida do ixodídeo	32
Figura 4: Larva, ninfa, macho e fêmea de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	33
Figura 5: Fêmea de <i>Amblyomma aureolatum</i>	34
Figura 6: Fêmea de <i>Amblyomma dubitatum</i>	34
Figura 7: Macho de <i>Amblyomma ovale</i>	35
Figura 8: <i>Ctenocephalides felis</i> e <i>canis</i>	36
Figura 9: Esquema de infecção do homem pela <i>R. rickettsii</i> e fases do ciclo do carrapato	37
Figura 10: Dinâmica sazonal do carrapato <i>Amblyomma cajennense</i> no Sudeste do Brasil	43
Figura 11: Exantema nas mãos	48
Figura 12: Exantema nos pés	48
Figura 13: Imagem obtida pelo microscópio de Imunofluorescência Indireta de uma amostra positiva	51
Figura 14: Técnicas de PCR e eletroforese em gel de agarose	52
Figura 15: Paciente vítima de S.A.R.A., CID, edema pulmonar difuso, exantema distribuído na fase e tronco	56
Figura 16: Bacia Hidrográfica do rio Paraíba do Sul	60
Figura 17: Bacia Hidrográfica do Médio Paraíba, em destaque o rio Paraíba e seus afluentes, rio do eixo e Cágado	60
Figura 18: Espaço geográfico do município de Juiz de Fora e em destaque as áreas de estudo	61
Figura 19: Ambiente 1 de Caetés	63
Figura 20: Ambiente 2 de Caetés	64

Figura 21: Ambiente 1 de Igrejinha, com parte assentamento Cigano ao fundo	65
Figura 22: Ambiente 1 de Igrejinha, em destaque os animais e o assentamento Cigano	66
Figura 23: Ambiente 2 de Igrejinha	66
Figura 24: Ambiente 2 de Igrejinha, com destaque para o curso d'água.....	66
Figura 25: Ambiente 1 de Paula Lima	68
Figura 26: Ambiente 1 de Paula Lima, com destaque para o curso d'água	68
Figura 27: Ambiente 2 de Paula Lima, com destaque para os animais	69
Figura 28: Ambiente 2 de Paula Lima	69
Figura 29: Ambiente 1 de Torreões, visto da rodovia	71
Figura 30: Ambiente 1 de Torreões	71
Figura 31: Ambiente 2 de Torreões	72
Figura 32: Ambiente 1 de Valadares, com destaque para os animais	73
Figura 33: Ambiente 1 de Valadares	73
Figura 34: Ambiente 2 de Valadares, com destaque o rio do Peixe ao fundo	74
Figura 35: Ambiente 2 de Valadares, com destaque para os vestígios de excrementos de capivara	74
Figura 36: Coleta de potenciais vetores em hospedeiro vertebrado	75
Figura 37: Coleta de vetores no ambiente, pela técnica armadilha de Carbonato de Cálcio	76
Figura 38: Coleta de vetores no ambiente, pela técnica do arrasto de flanela	76
Figura 39: Acondicionamento de vetores	76
Figura 40: Confecção da armadilha de CO ₂	78
Figura 41: Conta da diluição do ácido láctico; pesagem do carbonato de cálcio, respectivamente	78
Figura 42: Arrasto de flanela, adaptado	79
Figura 43: Esquema da rota percorrida	79

Figura 44: Identificação dos artrópodes	80
Figura 45: Gel de agarose da PCR para fragmento do gene <i>ompA</i> (631pb). PM: Peso Molecular de 100pb; 1: 550; 2: 551A;3: 551B; 4: 551C; 5: 551D; 6: 52A;7: 5517A; C+: Controle positivo; C0: Controle negativo	83
Figura 46: Filodendograma obtido através da comparação das sequências parciais do gene <i>gltA</i> , utilizando o método de Máxima Parcimônia	95
Figura 47: Filodendograma obtido através da comparação das sequências parciais do gene <i>gltA</i> , utilizando o método <i>Neighbor-Joining</i> e distâncias evolutivas determinadas pelo algoritmo Kimura 2 parâmetros	96
Figura 48: Filodendograma obtido através da comparação das sequências parciais do gene <i>ompA</i> , utilizando o método de Máxima Parcimônia	97
Figura 49: Filodendograma obtido através da comparação das sequências parciais do gene <i>ompA</i> , utilizando o método <i>Neighbor-Joining</i> e distâncias evolutivas determinadas pelo algoritmo Kimura 2 parâmetros	98
Figura 50: Mapa do município de Juiz de Fora, destacando os locais das coletas que circundam o perímetro urbano, com a indicação dos locais de casos confirmados	100
Figura 51: Mapa do município de Juiz de Fora, destacando os municípios adjacentes, os quais detém casos confirmados de Febre Maculosa	105
Figura 52: Mapa da distribuição de ocorrência de espécies de rickettsias na Microrregião de Juiz de Fora	110

Lista de Tabelas

Tabela 1: Diversidade de vetores e hospedeiro de rickettsias patogênicas do Grupo Febre Maculosa (GFM)	29
Tabela 2: Georreferenciamento dos pontos de coletas das zonas de vulnerabilidade do município de Juiz de Fora, estado de Minas Gerais, Brasil	62
Tabela 3: <i>Primers</i> utilizados para identificação genotípica de espécies de <i>Rickettsia</i>	82
Tabela 4: Ciclos e condições da Reação em Cadeira da Polimerase (PCR)	82
Tabela 5: Potenciais vetores de <i>Rickettsia</i> coletados em áreas de vulnerabilidade do município de Juiz de Fora, no estado de Minas Gerais, Brasil; no período de julho de 2013 a junho de 2014	86
Tabela 6: Flutuação populacional de potenciais vetores de Febre Maculosa, segundo estágio e estação do ano, coletados em ambientes de vulnerabilidade do município de Juiz de Fora, estado de Minas Gerais, Brasil; no período de julho de 2013 a junho de 2014	87
Tabela 7: Identificação de genes rickettsiais em potenciais vetores de <i>Rickettsia</i> sp. coletados em áreas de vulnerabilidade do município de Juiz de Fora, estado de Minas Gerais, Brasil; no período de julho de 2013 a junho de 2014	88
Tabela 8: Vetores de rickettsias positivos para o gene <i>gltA</i> , em áreas de vulnerabilidade do município Juiz de Fora, estado de Minas Gerais, Brasil; no período de julho de 2013 a junho de 2014	89
Tabela 9: Vetores de rickettsias positivos para o gene <i>ompA</i> , em áreas de vulnerabilidade do município Juiz de Fora, estado de Minas Gerais, Brasil; no período de julho de 2013 a junho de 2014	90
Tabela 10: Frequência mínima de vetores infectados com rickettsia (%), segundo o local de coleta, no município de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil; no período de julho de 2013 a junho de 2014	90
Tabela 11: Identificação de rickettsias detectadas, por análise de sequências de nucleotídeos de fragmento do gene <i>gltA</i> , em amostras de pulgas e carrapato procedentes de áreas de vulnerabilidade do município Juiz de Fora, estado de Minas Gerais, Brasil	92
Tabela 12: Identificação de rickettsias detectadas, por análise de sequências de nucleotídeos de fragmento do gene <i>ompA</i> , em amostras de pulgas e carrapato procedentes de áreas de vulnerabilidade do município Juiz de Fora, estado de Minas Gerais, Brasil	93

Lista de Abreviaturas e Siglas

≥ – Maior ou igual

% – Por cento

°C – Graus Celsius

°GL – Gay Lussac

µg – Micrograma

µL – Microlitro

µm - Micrômetro

µM – Micromolar

10X – 10 vezes concentrado(a)

a.C. – Antes de Cristo

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention* - Centros para Controle e Prevenção de Doenças

cm – Centímetro

D – Dalton

d.C. – Depois de Cristo

DNA – *Desoxyribonucleic Acid* - Ácido Desoxirribonucléico

DNase – *Desoxirribonuclease* RNase

dNTP – *Deoxynucleotidetriphosphates* – Desoxirribonucleotídeo trifosfatados

EDTA – Ácido etileno-diamino-tetracético

e.g. – Por exemplo

et al. – E colaboradores

etc. – *Et Coetera* - e outras coisas

Fe⁺² – Ferro

FMB – Febre Maculosa Brasileira

g – Grama

GA – Grupo Ancestral

GFM – Grupo da Febre Maculosa

h – Hora

HCl – Ácido Clorídrico

HCl-EDTA TRIS – tris (hidroximetil) amino metano

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

kDa – Kilodalton

Km– Quilômetro

Km² – Quilômetro quadrado

L – Litro

M – Molar

m – Metro

M⁺² – Metro quadrado

mg/kg – Miligramas por quilo

mg/mL – Miligramas por mililitros

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

min – Minuto

mL – Mililitro

mm – Milímetros

mM – Milimolar

n^o – Número

N₂ – Nitrogênio

NaCl – Cloreto de Sódio

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – *Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia da Polimerase

PDDU/JF – Plano Diretor de Desenvolvimento Urbano de Juiz de Fora

pH – Potencial Hidrogênio

pmol – picomoles

rpm – rotação por minuto

SDS – *SodiumDodecyl Sulfate* - Dodecil Sulfato de Sódio

SINAN – Sistema Nacional de Agravos de Notificação

sp. – espécie

spp. – espécies

SUCEN – Superintendência de Controle de Endemias

SVS – Sistema Vigilância em Saúde

Taq – *Thermus aquaticus*

TAE – Tris-acetato-EDTA

Tris – Tris (hidroxi) metil amino metano

WHO – *World Health Organization* - Organização Mundial da Saúde

Sumário

1	Introdução	16
2	Revisão de Literatura	18
2.1	Histórico da Febre Maculosa.....	18
2.2	Caracterização Geral das Rickettsias	24
2.3	As Rickettsioses	27
2.4	Os Ectoparasitos Potencialmente Vetores	30
2.5	Epidemiologia da Febre Maculosa	36
2.6	Dinâmica Sazonal	43
2.7	Transmissão, Patogenia e Manifestações Clínicas	44
2.8	Diagnósticos	49
2.8.1	Diagnóstico Sorológico	50
2.8.2	Diagnóstico Molecular	51
2.8.3	Diagnóstico Diferencial	54
2.9	Ocorrência e Distribuição	54
3	Objetivos	58
3.1	Objetivo Geral	58
3.2	Objetivos específicos	58
4	Material e Métodos	59
4.1	Área de Estudo	59
4.1.1	Caracterização das Áreas de Coleta	62
4.1.1.a	Caetés	63
4.1.1.b	Igrejinha	64
4.1.1.c	Paula Lima	67
4.1.1.d	Torreões	70
4.1.1.e	Valadares	72
4.2	Coletas de Potenciais Vetores de <i>Rickettsia</i> sp.	74
4.2.1	Esforço Amostral	76
4.2.1.a	Armadilha de CO ₂	77
4.2.1.b	Arrasto de Flanela	78
4.3	Identificação Taxonômica dos Artrópodes	79
4.4	Pesquisa Molecular do Bioagente	80
4.4.1	Extração do DNAg	81

4.4.2	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	81
4.5	Frequência Mínima de Vetores Infectados (FMVI)	83
4.6	Purificação e Sequenciamento de DNAg	84
4.7	Análise das Sequências	84
4.8	Análise Filogenética	85
5	Resultados	86
6	Discussão	99
7	Considerações Finais	106
8	Conclusão	108
	Referências Bibliográficas	109
	Anexo A	135
	Anexo B	138

1 Introdução

Rickettsioses são doenças infecciosas, potencialmente fatais, causadas por bactérias intracelulares, simbioses em artrópodes, e transmitidas, principalmente, através da picada. Estão presentes em todos os continentes, com exceção da Antártida (CDC, 2006; Graves e Stenos, 2003; OPAS, 2004; SUCEN, 2014). Engloba diferentes gêneros, dos quais se destaca o gênero *Rickettsia*, com o maior número de espécies conhecidas (Eremeeva e Dasch, 2000; Shpynov *et al.*, 2003). Toda infecção humana causada por *Rickettsia* sp. é uma zoonose mantida na natureza por complexos ciclos enzoóticos, envolvendo principalmente ectoparasitos e mamíferos. Humanos são hospedeiros acidentais dentro da dinâmica epidemiológica, não transmitindo o bioagente, e o ciclo epidêmico se desenvolve de forma focal, sustentando um caráter endêmico.

No Brasil, a principal rickettsiose humana é a Febre Maculosa Brasileira (FMB), causada pela *Rickettsia rickettsii*, que tem como vetor carrapatos infectados. É um problema de saúde pública no país, re-emergindo nas últimas décadas com elevados índices de morbidade e mortalidade, devido ao seu potencial zoonótico, por muito tempo subestimado (Lemos, 1991; Paddock *et al.*, 2002; Rozental, 2003; Barci e Nogueira, 2005; Guedes *et al.*, 2005; Souza *et al.*, 2008). Labruna e Machado (2006) observam que, depois do vírus da raiva, *R. rickettsii* é, possivelmente, o bioagente mais letal para humanos, caracterizando a importância da Febre Maculosa (FM).

Segundo La Scola e Raoult (1997) a percepção da re-emergência desta zoonose está associada, entre outros fatores, ao aumento do interesse por parte da comunidade científica, da maior disponibilidade de novas técnicas diagnósticas, bem como pela ampla distribuição de potenciais vetores que podem colonizar ambiente rural, urbano, periurbano e de recente ocupação, atuando como reservatório da doença. Lemos (1991) e Rozental (2003) consideram que essa ampla distribuição é verdadeira, principalmente nos Estados da região Sudeste, em especial São Paulo e Minas Gerais.

Esta ampla distribuição é particularmente assinalada para *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787), apontado por décadas no Brasil como o principal vetor de *R. rickettsii*, (Lemos *et al.*, 1997a; Guedes *et al.*, 2005; Sangioni *et al.*, 2005; Perez *et al.*, 2008). Entretanto, a análise da diversidade de vetores e hospedeiros de *Rickettsia* sp. em diversas regiões do país tem permitido assinalar a importância de outras espécies no ciclo epidêmico e enzoótico. Assim, *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772), *Amblyomma ovale* (Koch, 1844), *Amblyomma*

dubitatum (Neumann, 1899), *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806), *Ctenocephalides canis* (Curtis, 1826) e *Ctenocephalides felis* (Bouché, 1835) também são considerados transmissores ou potencialmente veiculadores (e.g. Moreira e Magalhães, 1937; Lemos, 1991; Pereira e Labruna, 1998; Guimarães *et al.*, 2001; Rozental, 2003, Labruna, 2006; Pinter e Labruna, 2006; Perez-Osório *et al.*, 2008; Horta *et al.*, 2010; Moura-Martiniiano *et al.*, 2014).

Com o elevado processo de antropização de novas aéreas, anteriormente desocupadas pelo homem, criou-se uma nova relação entre humanos, animais e parasitos, e consequentemente a criação de novos nichos ecológicos na cadeia de transmissão das patologias (Corrêa e Passos, 2001), sobretudo no Brasil, país de numerosos ecossistemas, e de admirável biodiversidade da fauna e flora. Porém, tal processo desencadeia a destruição desses ecossistemas em grandes proporções pelas atitudes degradantes do homem ao meio. Além dessas ações, somam-se a este processo de degradação o avanço da agricultura, pecuária, inchaço dos centros urbanos com posterior ocupação desordenada das zonas de expansão urbana e áreas rurais, como também a prática de atividades de ecoturismo e esporte, propiciando, assim, um contato mais estreito entre homens e de seus animais domesticados com animais silvestres em seu habitat. Tais interações resultam em casos de zoonoses, sob forma epidêmica por disseminação de animais susceptíveis e o aumento da propagação espacial da doença (Barlett e Judge, 1997).

Nesse contexto de relevância epidemiológica da FMB, destaca-se Minas Gerais, segundo estado com maior número de casos no país, e, em especial, o município de Juiz de Fora, localizado na Zona da mata Mineira, que apresenta elevados índices de morbidade e mortalidade, sendo o maior notificador (SINAN, 2015). Contudo, não existem casos desta patologia registrados para as zonas de expansão urbana e rurais desse município, mesmo considerando que tais zonas margeiam áreas endêmicas, possuem um grande número de potenciais vetores e estão sob pressão antrópica e econômica, reunindo assim, condições epidemiológicas para a manutenção do ciclo enzoótico de *Rickettsia* sp., podendo permanecer como focos silenciosos (Galvão, 1996), e serem consideradas áreas de vulnerabilidade para FM.

Valendo-se deste contexto, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver a investigação e mapeamento da relação natural entre espécies de *Rickettsia* e seus potenciais vetores em áreas de vulnerabilidade do município de Juiz de Fora.

2 Revisão de Literatura

2.1 Histórico da Febre Maculosa

Doenças deflagradas por bactérias do gênero *Rickettsia* situam-se entre as que mais devastaram os humanos, causando padecimento e mortes, até mesmo para aos pesquisadores precursores no diagnóstico e na pesquisa sobre tais (Galvão, 1996; Birchard e Sherding, 1998; Galvão *et al.* 2002). As doenças produzidas por rickettsias têm ampla distribuição mundial, e vários gêneros e espécies da família *Rickettsiaceae* mantêm ciclos zoonóticos na natureza (Acha e Szyfres, 1986), podendo se apresentar nas formas epidêmica ou esporádica, relacionados intrinsecamente a fatores ecoepidemiológicos (Lemos, 1996).

Provavelmente a primeira epidemia relatada no mundo causada por *Rickettsia*, mais especificamente a *Rickettsia typhi*, agente do tifo Murino, data do século 5 a.C., e foi denominada “praga de Atenas”. Somente 21 séculos depois, já em 16 d.C, foi confirmada na Europa a epidemia de tifo Murino; doravante incontáveis relatos surgiram pelo mundo (Silveira, 2006).

Historicamente, nos Estados Unidos da América (EUA), o primeiro relato da enfermidade se deu em 1896 por Marshal Wood, médico do exército americano em Idaho, (Harden, 1990). Porém, a descrição da patologia- Rocky Mountain Spotted Fever (Febre das Montanhas Rochosas-RMSF)- só se dá em 1899, quando Kenneth Maxcy faz a primeira publicação científica, no vale do Snaker River, no mesmo estado deste país, definindo-a como doença febril endêmica, não contagiosa e infecciosa, caracterizada clinicamente por febre alta, dores musculares, artrite e erupções petequiais ou purpúras profusas na pele, surgindo inicialmente nos tornozelos, pulsos e testa, difundindo-se rapidamente e centrípetamente para todas as partes do corpo (Harden, 1990) e denominado de “*black measles*” (sarampo preto) (SVS, 2011).

Em 1902, Wilson e Chowning denominaram o agente causador da FM como *Piroplasma hominis*, além de sugerirem que a doença seria transmitida através do carrapato *Dermacentor andersoni* (Stiles, 1908) (Wilson e Chowning, 1904). Howard Taylor Ricketts em seus estudos, entre os anos de 1906 a 1909, obteve êxito em seus experimentos com a transmissão do bioagente para porquinhos da Índia, percebendo a presença da bactéria em esfregaços sanguíneos obtidos a partir de tecidos de carrapatos, identificando assim, o agente etiológico da RMSF, como também, designando a função do mesmo na transmissibilidade da patologia, incriminando-o como vetor (Cox, 1952; Galvão *et al.*, 2002; Weiss e Strauss, 1991).

Durante os anos de 1916 a 1919, quando descreveu o bioagente da RMSF, Wolbach denominou a bactéria como *Rickettsia rickettsii* em homenagem ao trabalho de Howard Taylor Ricketts com os porquinhos da Índia, (Wolbach, 1919, Weiss e Strauss, 1991).

Em outubro de 1929, a FMB foi reconhecida pela primeira vez no Brasil por José Toledo Piza no estado de São Paulo, em áreas circunscritas às regiões suburbanas da capital, consideradas com de expansão urbana, onde atualmente são os bairros de Sumaré e Perdizes; ainda no mesmo ano e estado, José Toledo Piza deu início à diferenciação FMB dentre outras doenças exantemáticas no Brasil, como também exibiu sua similaridade com a entidade nosológica descrita pelos americanos como RMSF (e.g. Piza, 1932; Dias e Martins, 1939; Magalhães, 1952; Tiriba, 1972; Silva e Galvão, 2004). De outubro de 1929 até setembro de 1933, foram descritos 88 casos positivos da “nova” doença (Lemos-Monteiro, 1933a).

Há mais de um século, por volta de 1890, já se evidenciava o conhecimento da FMB pela população no interior do país (Pascale, 1946; Lemos *et al.*, 2002), sendo registrada como “sarampão”, “sarampo preto”, “febre tifóide hemorrágica”, “pintada”, “febre chitada” e “febre tifóide das montanhas”, bem conhecida nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (Magalhães, 1952).

Procurando definir o vetor da patologia no Brasil, Lemos-Monteiro e Fonseca (1932a), no início da década de 30, em experimentos laboratoriais, evidenciaram pela primeira vez que ixodídeos da espécie *A. cajennense* podiam se infectar com *R. rickettsii*, quando alimentados em cobaias experimentalmente infectadas, e testaram também a competência vetorial de espécimes dos gêneros *Argas* e *Ornithodoros*, se apresentando positivamente somente o do segundo gênero, especificamente o *Ornithodoros rostratus*, que se infectou e transmitiu a infecção para cobaias.

Todavia, através de estudos epidemiológicos acerca da incidência da patologia, os autores envolvidos no processo afirmaram da possível existência de outros vetores culpados pela transmissão da doença em condições naturais. Posteriormente, apoiaram que o nome da enfermidade em humanos, até então conhecida como tifo endêmico de São Paulo, mudasse para Tifo Exantemático de São Paulo (TESP), nomeando seu agente etiológico de *Rickettsia brasiliensis*. Em tal estudo, os autores examinaram a competência vetorial de diversos ectoparasitos (pulgas, piolhos, ácaros e carrapatos) presentes nas casas e suas adjacências de áreas onde houve casos de TESP, em busca da determinação do provável vetor. De todas as espécies testadas, na sua totalidade foram negativas, sugerindo que o agente etiológico da TESP deveria ocorrer numa proporção muito baixa na população de vetores (Lemos-Monteiro e Fonseca, 1932a).

No mesmo período, os mesmos pesquisadores demonstraram a transmissão transestadial da *Rickettsia brasiliensis* pelo carrapato *A. cajennense*, além de verificar a transmissão transovariana do agente por espécimes do ixodídeo, reconhecendo a bactéria ao examinarem tecidos internos do artrópode (Lemos-Monteiro *et al.*, 1932b) Simultaneamente, Meyer *et al.*, (1932), obtiverem êxito ao reproduzir a enfermidade através da inoculação de emulsão de piolhos retirados de um cadáver humano acometido por TESP, no peritônio das cobaias.

Ainda no início da referida década, através de estudos/experimentos realizados em parceria com o *Rocky Mountain Laboratory*, nos EUA, Lemos-Monteiro, verificou em cobaias, a imunidade cruzada entre amostras de soros de animais imunes ao TESP frente a soros animais imunes a RMSF, sendo esta a primeira evidência de que a patologia no Brasil era causada pela *R. rickettsii* (Lemos-Monteiro, 1933b).

Mais uma contribuição para a elucidação a respeito da epidemiologia da FM foi realizado por Regendaz e Muniz, ainda nos anos 30, no Rio de Janeiro, obtendo êxito ao demonstrar que o *R. sanguineus* era capaz de manter a infecção transestadial, quando realizavam repasto sanguíneo em cobaias infectadas, apesar de não terem conseguido comprovar o parasitismo desse em humanos (Regendaz e Muniz, 1936).

Enquanto em Minas Gerais, Moreira e Magalhães, na mesma década, foram os primeiros a realizarem estudo epidemiológico da doença, pois estavam intrigados com a mesma, que apresentava letalidade próxima de 100% e não exibia correlação com as demais doenças da época; não obstante, a possibilidade da participação de animais silvestres na epidemiologia da FM, já sugerida por Ricketts em 1909. Foi desses autores a proeza de isolar, pela primeira vez o bioagente da doença a partir de um animal silvestre, como também o encontro de *A. cajennense* naturalmente infectado parasitando cão doméstico (*Canis familiaris* Linnaeus, 1766); demonstrando, em seguida, que o cão é susceptível à moléstia (Moreira e Magalhães, 1937).

Como resultado de suas pesquisas, tais autores publicaram um trabalho nomeado de “trabalho definitivo”, suas descobertas acerca da epidemiologia da enfermidade e concluíram que se tratava de uma patologia infecciosa, febril, aguda, via de regra exantemática, de amplo espectro clínico e comumente de elevada letalidade, predominantemente de caráter rural e registrada há mais de 30 anos em todo o estado; determinando distintamente o desempenho do *A. cajennense* como principal vetor da moléstia ao humano (Moreira e Magalhães, 1937).

Os pesquisadores supracitados, valendo-se de técnicas indiretas de diagnóstico, tais como Weil-Felix, registraram uma lista de animais silvestres e domésticos portadores de rickettsioses do Grupo da Febre Maculosa (GFM), como o cão doméstico, gambá (*Didelphis*

marsupialis Linnaeus, 1758), o cachorro do mato *Dusicyon* sp (Sin. *Canis brasiliensis*), o coelho do mato (*Sylvilagus brasiliensis*, sin. *Sylvilagus minensis*), o preá (*Cavia aperea* Erxleben, 1777) e a cutia (*Dasyprocta, spp.*) como possíveis reservatórios do bioagente (Moreira e Magalhães, 1937), dando ênfase para o cão doméstico, cuja importância na epidemiologia da doença foi apurada pela primeira vez em 1933 (Magalhães e Rocha, 1944).

Os pesquisadores ainda classificaram a doença que ocorria no estado como uma variedade da RMSF, frisando, contudo, que se tratava de uma doença autóctone da América do Sul. Devido à coincidência entre os aspectos clínicos do TESP e o Tifo Exantemático de Minas Gerais, foi proposto que ambas moléstias se tornassem conhecidas como Tifo Exantemático do Brasil, embora não reconhecessem *R. brasiliensis*, descrita pelos pesquisadores paulistas, como o possível bioagente da patologia (Moreira e Magalhães, 1937).

Nos anos 40, Travassos e Vallejo pesquisaram a possibilidade de outros animais albergarem o agente da doença e verificaram que o preá era susceptível ao agente, desenvolvendo a doença à semelhança das cobaias, quando inoculados experimentalmente, enquanto que a capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris* Linnaeus, 1766) não apresentava sintomatologia clínica quando inoculadas experimentalmente, apesar da possibilidade em se isolar o agente a partir do sangue e órgãos internos do animal entre o quinto e décimo primeiro dia pós-inoculação. Ainda que não tivessem obtido sucesso nas tentativas de isolamento do agente do Tifo Exantemático do Brasil a partir de capivaras e preás capturados em áreas de ocorrência da doença, houve a constatação de que alguns animais trazidos da natureza eram refratários à infecção experimental do agente da doença. Com isso, concluíram que tais animais já haviam tido contato com a moléstia em seu ambiente natural e sobreviveram (Travassos e Vallejo, 1942a).

Em sua segunda publicação, Travassos e Vallejo demonstraram a infecção de espécimes adultos de *A. cajennense* após se alimentarem em capivaras experimentalmente infectadas pelo agente; apesar não se certificarem que os ectoparasitos utilizados, eram previamente livres do agente etiológico, porque foram coletados em condições naturais de parasitismo (Travassos e Vallejo, 1942b).

Também nos anos 40, os pesquisadores acima mencionados publicam um amplo, completo e ainda atual trabalho sobre a manutenção de ixodídeos em laboratório para produção de uma vacina (Travassos e Vallejo-Freire, 1944-1945), que teve sua primeira tentativa de produção em 1909 por Charles Nicolle's (Falcão, 1966), porém a falta de êxito fez com que pesquisadores testassem métodos mais dinâmicos no tratamento dos doentes (Tibira *et al.*, 1968).

Foi quando no final da década de 40, durante e logo após a 2ª Guerra Mundial, ocorreram grandes avanços tecnológicos na microbiologia, como o advento da antibioticoterapia (Silva, 1985), a qual foi imensamente utilizada, vista como a principal arma encontrada pelos pesquisadores no combate à enfermidade, especialmente a tetraciclina e o cloranfenicol (Tibira *et al.*, 1968), que a doença começou a ter ocorrência duvidosa tanto no Brasil, como nos EUA, ressurgindo com maior força a partir da década de 70 (Burgdorfer, 1975; Reháček *et al.*, 1976; Reháček *et al.*, 1977; Rozental *et al.*, 2002; Rozental, 2003).

Seguido a este período de inúmeras pesquisas, publicações e descoberta de casos, instalou-se uma fase de silêncio epidemiológico, onde não houve descrição na literatura médica a respeito da enfermidade, silêncio esse proveniente do uso indiscriminado das novas drogas, os antimicrobianos (Galvão, 1988), utilizados por pacientes com diminutas manifestações clínicas, como quadro febril a esclarecer, conseqüentemente levando a doença ao esquecimento, por frustrar seus sinais e sintomas mais contundentes, especialmente o exantema máculo-papular; mas nem por isso, a enfermidade deixou de vitimar, seja na transformação do ambiente, como também pela antropização de focos naturais da moléstia (Galvão, 1996).

Porém Jayme Neves, através de relato pessoal, expôs que durante os anos de 1957 até 1979, o Hospital Carlos Chagas, antiga Clínica de Doenças Infecciosas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, atendeu diversos casos, pois era o centro de referência de todo o estado, mas com seu fechamento no ano de 1979, foram perdidos os registros da FMB, e com isso toda sua memória (Galvão, 1988).

Apesar de Lemos-Monteiro e equipe terem sugerido a *Rickettsia brasiliensis* como o plausível agente da enfermidade, a nomenclatura não foi adotada pelos demais pesquisadores (Moreira e Magalhães, 1937). A suspeita sobre a espécie debruçava-se sobre a falta de diagnóstico específico e caracterização do agente, pois o resultado obtido a partir da sorologia tanto de animal, quanto de humano positiva para *R. rickettsii* não era elucidativo em função das reações cruzadas entre as demais rickettsias do GFM, ou seja, a titulação apresentada poderia ter sido induzida por rickettsia não patogênica ou mesmo rickettsia de baixa virulência do GFM (McDade e Newhouse, 1986).

Inicialmente a *R. rickettsii* era considerada como sendo um “vírus”, entretanto, Buxton e Fraser (1977), classificaram-na como bactérias que desenvolveram um modo de vida ultraparasitária. Somente 3 décadas depois, nos anos 70, mais precisamente em 1978, obteve-se a ratificação de que o agente causador da FMB era realmente a *R. rickettsii*, através da técnica de sorotipagem por microimunofluorescência de uma amostra do agente causador do TESP

enviada pelo Doutor Lemos-Monteiro ao Doutor Parker no *Rocky Mountain Laboratory* ainda na década de 30 (Philip *et al.*, 1978).

Nos últimos 40 anos no Brasil, a FMB vem sendo diagnosticada na região Sudeste, principalmente. Desde 1997, o estado do Rio de Janeiro vem confirmando casos nas regiões da Baixada e Médio Paraíba (Burgdorfer, 1975; Reháček *et al.*, 1976; Reháček *et al.*, 1977; Rozental *et al.*, 2002; Rozental, 2003).

No final da década de 70, mais precisamente em 1979, pela primeira vez foi relatada a presença da FMB na capital do estado da Bahia, Salvador, insinuando uma distribuição geográfica ainda mais dilatada da doença do que se reconhecia, pois anteriormente a este caso, a incidência se restringia aos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (Mancini *et al.*, 1983).

Já no início da década de 80, Gonçalves *et al.*, (1981) exibiram casos diagnosticados de FMB no Rio de Janeiro, baseados em aspectos clínico-epidemiológicos e laboratoriais, e chamaram a atenção para as manifestações clínicas da patologia, no que tange ao diagnóstico diferencial da FMB com outras enfermidades frequentes na prática da clínica.

Poucos anos depois, em 1983, Galvão *et al.*, (1983) expuseram um surto epidêmico de FMB ocorrido no norte do estado de Minas Gerais fundamentado em critérios clínico-epidemiológicos e laboratoriais, e efetivaram investigação sorológica para rickettsioses em cães oriundos da mesma região. No fim dos anos 80, Galvão pesquisa a ocorrência da doença, no mesmo estado, e seus determinantes através de averiguação soro-epidemiológico, utilizando-se da reação de imunofluorescência indireta- RIFI (Galvão, 1988).

Em 1992, utilizando-se biópsia de pele, é realizado o isolamento do gênero *Rickettsia* em humanos (Melles *et al.*, 1992), e no ano de 1996, obteve-se o primeiro isolamento do gênero a partir de ixodídeos *A. dubitatum*, contraído a partir da capivara (Lemos *et al.*, 1996b). Em ambas realizações, a identificação foi restringida até gênero.

Galvão (1996) publica pesquisa de casos suspeitos e confirmados de FMB nos anos 80 e 90, dando enfoque às características epidemiológicas de um foco peri-urbano no Vale do Rio Doce, Minas Gerais, e cita diversos municípios desse estado que apresentaram tais relatos.

Os anos 90 e o início dos anos 2000 foram caracterizados pela efetivação de múltiplos inquéritos soros-epidemiológicos na população humana e animal nos estados de Minas Gerais (Galvão *et al.* 2002; Galvão *et al.* 2003), Rio de Janeiro, São Paulo (Del Guercio *et al.*, 1997; Lemos *et al.*, 1996a), Espírito Santo (Sexton *et al.*, 1993), os quais apontaram Minas Gerais como sendo o estado com maior prevalência de FMB (Calic *et al.*, 1998; Galvão, 1996; Lemos

et al., 1994), como também São Paulo (Melles *et al.*, 1992; Lemos *et al.*, 1996a; Lemos *et al.*, 2001).

De 2002 a 2006 foram diagnosticados os primeiros casos de FM nos estados de Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul (SINAN, 2015). Os últimos estados a serem notificados com casos foram Distrito Federal, Mato Grosso e Ceará (SINAN, 2015). No entanto, a confirmação da espécie de *Rickettsia* envolvida nos casos fora da região sudeste, associado a fatores clínicos e epidemiológicos, sugere que pelo menos parte deles não tenha sido causado pela espécie *R. rickettsii* (Labruna, 2006).

Devido ao aumento do número de casos e óbitos por FMB em humanos, instituiu-se a notificação compulsória da doença no Brasil, conforme Portaria do Ministério da Saúde (MS) nº 1.943, de 18 de outubro de 2001 (BRASIL, 2001), entretanto, somente passou a integrar o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) a partir de 2007. Na década seguinte, o MS divulgou uma nova Portaria de nº 1.271, de 6 de junho de 2014 (SVS, 2014), redefinindo a classificação da doença para notificação compulsória imediata; aumentando mais a sensibilidade do sistema de saúde para a captação de casos e permitindo, assim, sua investigação em diferentes ambientes, ampliando o conhecimento sobre a circulação de *Rickettsia* spp. nos diversos espaços geopolíticos, através de um sistema de vigilância epidemiológica com uma rede de laboratórios de referência para enfermidades.

2.2 Caracterização Geral da *Rickettsias*

Com o advento da filogenética molecular, os bioagentes do gênero *Rickettsia* estão, com base em caracteres moleculares e antigênicos, atualmente classificados em quatro grupos bem distintos: o Grupo do Tifo (GT), que inclui *Rickettsia prowazekii*- causadora do tifo epidêmico (a primeira rickettsiose humana ser reconhecida, feito realizado por Henrique da Rocha Lima em 1916, homenageando Howard Taylor Ricketts e Stanislas Von Prowazek, pesquisadores mortos em consequência da moléstia) transmitida por piolho, e *Rickettsia typhi*- causadora do tifo Murino ou endêmico, transmitida por pulgas; o Grupo da Febre Maculosa (GFM), que inclui *R. rickettsii* e *Rickettsia conorii*, dentre outras; o Grupo Ancestral (GA), que inclui *Rickettsia bellii* e *Rickettsia canadensis*, ambas sendo de patogenicidade desconhecida e o Grupo de Transição (GTr), que inclui *Rickettsia felis* e *Rickettsia akari*, conexas a pulgas e a pequenos ácaros dos gêneros *Ctenocephalides* e *Allodermanyssus*, respectivamente (*e.g.*

Stothrd *et al.*, 1994; Roux *et al.*, 1997; Raoult e Roux, 1997; Sekeyová *et al.*, 2000; Roux e Raoult, 2000; Gillespie *et al.*, 2007).

Para diferenciar os grupos supracitados são usadas características, tais como: lipopolissacarídeos e proteínas de membrana específicas para cada grupo (Bacellar, 1996; Eremeeva e Dasch, 2000; Valbuena e Walker, 2006).

As rickettsias são pertencentes à Classe *Proteobactéria*, Ordem *Rickettsiales*, Tribo *Rickettsiidae*, Família *Rickettsiaceae* e gênero *Rickettsia* (Hackstadt *et al.*, 1992). As rickettsias patogênicas compõem um grupo de microrganismos com características de bactérias Gram-negativas, alfa-proteobactérias, sem motilidade e pleomórficas (cocóides, cocobacilares, mas sendo a forma mais comum a de pequenos bacilos), visíveis à microscopia fotônica, que medem aproximadamente 0.3 a 0.5µm de diâmetro por 0.8-2,0µm de comprimento, não se corando pelo Gram, e sim, pelas técnicas de coloração de Giménez ou Giemsa; são proteobactérias do subgrupo α 1, parasitos intracelulares obrigatórias, podendo se localizar no compartimento intracitoplasmático (citoplasma e/ou núcleo) das células hospedeiras infectadas, cujo principal alvo em vertebrados são as células endoteliais, nas quais se multiplica, causando vasculites com ativação de plaquetas e do sistema de coagulação; enquanto nos artrópodes vetores, permanecem em células do intestino, túbulos de Malpighi, hemolinfa, glândulas salivares e ovários (*e.g.* Gimenez, 1964; Burgdorfer, 1970; Elisberg e Bozeman, 1979; Weiss e Moulder, 1984; Walker e Dasch, 1994; Billings *et al.*, 1998; Eremeeva e Dasch, 2000; Dumler *et al.*, 2001; Yu e Walker, 2003; Souza *et al.*, 2004; Lemos, 2005; Raoult *et al.*, 2005; Greene e Breitschwerdt, 2006; Valbuena e Walker, 2006).

A composição de sua parede celular é similar à das bactérias Gram-negativas, apresentando lipopolissacarídeos, peptídeoglicanos, proteínas de 135 kDa, *Outher Membrane Protein B (ompB)* de 17kDa e de *Outher Membrane Protein A (ompA)* 190kDa, específica para as rickettsias do GFM (Elisberg e Bozeman, 1979; Weiss e Moulder, 1984; Olson e McDade, 1994; Walker e Bouyer, 2003; Lemos, 2005). (Figura 1).

O genoma da *R. rickettsii* contém 1.3×10^9 D de ácido desoxirribonucleico (DNA). A percentagem molar de guanina e citosina é de 32 a 33 mol% (Tyeryar *et al.*, 1973, Walker, 1989).

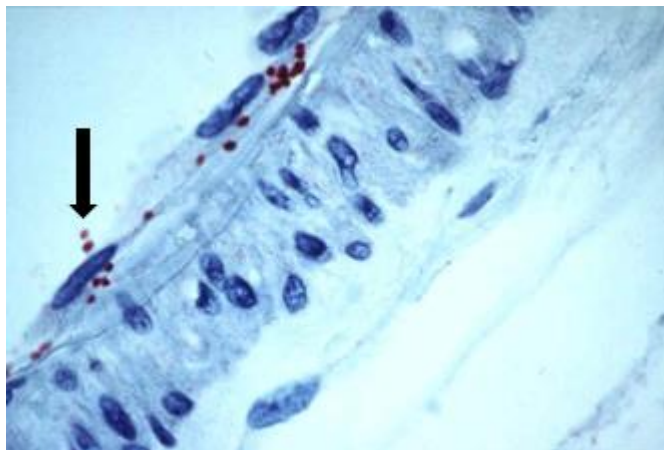


Figura 1: *Rickettsia rickettsii* parasitando células do endotélio vascular de mamíferos, corada pela técnica de Giemsa.
(Fonte: www.cdc.gov/ncidod/dvrd/rmsf/IMAGES/rick-IHC.jpg).

Durante muitos anos, discutiu-se a posição taxonômica das rickettsias, e segundo Lemos (1991), como produtos da degradação das paredes celulares observam-se glicosamina, ácido muramínico, além de glicose, galactose, ácido glicurônico e grande número de diferentes aminoácidos; é encontrado também o ácido diaminopamélico, reforçando o conceito de que as rickettsias são, sem dúvida, bactérias. Porém num passado não muito longínquo, consideravam-nas como “grandes vírus”, devido à sua incapacidade de sobrevivência extracelular, por não serem isoladas em meio artificial e pela ausência de sistemas enzimáticos complexos (WHO, 1988; La Scola e Raoult, 1997; Azad e Beard, 1998).

Em relação à sua distribuição na célula, caracteristicamente as rickettsias do GFM frequentemente invadem o núcleo da célula hospedeira, diferenciando-se das outras espécies que se encontram no citosol, fagossoma como as rickettsias do GT e as ehrlichias, respectivamente (Lemos, 2005).

A principal representante do GFM no Brasil, *R. rickettsii*, apresenta como principal hospedeiro invertebrado os carrapatos do gênero *Amblyomma*, porém a pulga, o piolho e outros gêneros de carrapatos, como por exemplo *Dermacentor* e *Rhipicephalus*, também podem ser hospedeiros invertebrados desse agente. (Galvão *et al.*, 2006; Gehrke *et al.*, 2009; Gehrke, 2010). Casos humanos de infecção por bactérias do gênero *Rickettsia* têm sido descritos em vários países da América do Sul nos últimos vinte anos (Galvão *et al.*, 2006).

2.3 As Rickettsioses

Até o início do século XXI, no GFM (o maior agrupamento, constituído por mais de 30 espécies válidas) somente nove espécies de rickettsias eram tidas como patogênicas para o humano, porém com o avanço das técnicas da biologia molecular, este número saltou para pelo menos 15, que estão ligadas à infecção causadas por rickettsioses no mundo, sendo elas: *Rickettsia aeschlimannii*, *R. africae*, *R. akari*, *Rickettsia australis*, *R. conorii*, *R. felis*, *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia honei*, *Rickettsia japonica*, *Rickettsia marmionii*, *Rickettsia mongolotimonae*, *Rickettsia parkeri*, *R. rickettsii*, *Rickettsia sibirica*, *Rickettsia slovaca*. Todas as outras rickettsias do GFM são veiculadas por carrapatos (Raoult e Roux, 1997; Raoult *et al.*, 2002; Brouqui *et al.*, 2004; Labruna, 2006; Horta *et al.*, 2007; Pacheco *et al.*, 2008; Parola *et al.*, 2009; Labruna, 2009).

Quando registradas somente nos vetores, as rickettsias do GFM são designadas como de patogenicidade desconhecida, já quando em humanos são inseridas nas patogênicas (Paddock *et al.*, 2004).

Ultimamente, determinadas espécies de *Rickettsia* tem sido assinaladas como causadoras de patologias muitas vezes incógnitas ou emergentes, como *Rickettsia massiliae*, na Itália (Vitale *et al.*, 2006), *Rickettsia aeschlimannii*, em Marrocos (Raoult *et al.*, 2002) e a *Rickettsia amblyommii*, que inicialmente foi descoberta na Carolina do Norte, EUA (Apperson *et al.*, 2008), e sua descoberta mais recente no Brasil foi por Nunes em 2014 (dados não publicados), no município de Juiz de Fora. Tais enfermidades tem ocorrido por todo o mundo, manifestando-se de forma branda ou podendo até causar óbitos.

Nas Américas, a FM é causada por algumas rickettsias, como a *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. felis*, *R. africae* e *R. akari*. Recentemente, nesse continente, outras espécies de *Rickettsia* tem sido descritas em ixodídeos com possível associação a casos de FM em humanos ou animais (Billeter *et al.*, 2007; Apperson *et al.*, 2008; Saito *et al.*, 2008).

A espécie de *Rickettsia* mais abundante no Brasil é a *R. bellii*, e já foi isolada de *A. aureolatum*, *A. dubitatum*, *Amblyomma humerale* (Koch, 1844), *Amblyomma scalpturatum* Neumann, 1906), *Amblyomma. rotundatum* (Koch 1844), *Amblyomma oblongogutatum* (Koch 1844), *A. ovale*, *Ixodes loricatus* (Neumann, 1899) e *Haemaphysalis juxtakochi* (Cooley, 1946) (Labruna *et al.*, 2004; Pinter e Labruna, 2006; Labruna *et al.*, 2007).

O agente etiológico *R. parkeri* é responsável por causar Febre Maculosa Ganglionar, porém distingue-se por ser uma enfermidade de curso brando, não apresentando letalidade

registrada, dificultando assim, o diagnóstico clínico, passando despercebida em locais outrora nunca relatada; o primeiro caso de infecção humana por *R. parkeri* ocorreu no estado da Virginia (EUA) no ano de 2004 (Paddock *et al.*, 2004); essa mesma febre foi verificada no Uruguai, Argentina e Brasil, onde já foi detectada e isolada em carrapatos *Amblyomma triste* (Koch, 1844), *A. ovale* e *A. dubitatum* (e.g. Venzal *et al.*, 2004; Labruna *et al.*, 2004a; Pacheco *et al.*, 2006; Silveira *et al.*, 2007; Nava *et al.*, 2008; Krawczak, 2012); contudo, no Brasil, raras são as ocorrências do *A. triste* (Silveira *et al.*, 2007)

A rickettsiose causada pelo agente *R. felis* foi primeiramente descrita no EUA (Schriefer *et al.*, 1994) e em seguida nos continentes: europeu (Perez-Arellano *et al.*, 2005; Raoult *et al.*, 2001; Richter *et al.*, 2002), africano (Znazen *et al.*, 2006) e asiático (Choi *et al.*, 2005; Parola *et al.*, 2003; Tsai *et al.*, 2008). No continente americano, México e Brasil (estado de Minas Gerais) são países que relataram casos de óbitos por rickettsiose felis (e.g. Zavala-Velazquez *et al.*, 2000; Raoult *et al.*, 2001; Galvão *et al.*, 2004; Cardoso *et al.*, 2006).

No Brasil, através da RIFI, pesquisadores detectaram a presença de anticorpos reativos para *R. felis* no soro de 87,5% de gatos (*Felis catus* Linnaeus, 1758) utilizados como fonte alimentar de *C. felis*, e de 40% dos pesquisadores envolvidos no estudo; fato este de elevada importância epidemiológica, pois atesta o potencial das pulgas como vetores na transmissão do bioagente (Horta *et al.*, 2006; Horta *et al.*, 2010).

Em Minas Gerais, além de terem sido descritos casos humanos de rickettsiose felis (Oliveira *et al.*, 2002), o agente foi encontrado em sifonápteros do gênero *Ctenocephalides*, e em ixodídeos *R. sanguineus* e *A. cajennense* (Cardoso *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008),

O gênero *Ctenocephalides* é normalmente encontrado em gatos e cães em muitas regiões temperadas e tropicais, entretanto também infesta ratos (*Rattus* spp. Linnaeus, 1758), camundongos (*Mus musculus* Linnaeus, 1758), gambás e guaxinins (*Procyon lotor* Linnaeus, 1758) (Pung *et al.*, 1994; Loftis *et al.*, 2006), indicando possível participação dessas quatro últimas espécies citadas no ciclo silvestre da doença (Nascimento e Schumaker, 2004); além de acometer o homem (Márquez *et al.*, 2002; Kenny *et al.*, 2003).

O ciclo das rickettsias no ambiente natural se sustenta pela competência dos ixodídeos se portarem como vetores, reservatórios e amplificadores das mesmas (Parola *et al.*, 2005). Deste modo, os hospedeiros vertebrados desses também estão envolvidos no ciclo enzoótico das rickettsias, seja amplificando, mantendo e/ou difundindo carrapatos infectados para animais sinantrópicos ou domésticos (Tabela 1) (Schriefer e Azad, 1994; Fournier e Raoult, 2005).

Tabela 1: Diversidade de vetores e hospedeiro de rickettsias patogênicas do Grupo Febre Maculosa (GFM).

Riquetsia	Vetor	Hospedeiro	Distribuição
<i>Rickettsia rickettsii</i>	<i>Dermacentor andersoni</i>	Pequenos mamíferos	América do Norte, Central e do Sul.
	<i>Dermacentor variabilis</i>	(roedores, marsupiais,	
	<i>Amblyomma americanum</i>	coelhos), cães, equinos e	
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	aves.	
	<i>Amblyomma cajennense</i>		
<i>Rickettsia conorii</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Pequenos mamíferos	Europa, África, Ásia
	<i>Rhipicephalus pumilio</i>	(roedores, marsupiais), cães e aves.	
<i>Rickettsia japonica</i>	<i>Haemaphysalis</i> sp.	Roedores, cães	Ásia (Japão, China)
	<i>Dermacentor taiwanensis</i>		
	<i>Ixodes</i> sp.		
<i>Rickettsia africae</i>	<i>Amblyomma variegatum</i>	Bovinos, caprinos	África
	<i>Amblyomma hebraeum</i>		
<i>Rickettsia slovaca</i>	<i>Dermacentor reticulatus</i>	Suínos	Europa, Ásia (Rússia)
	<i>Dermacentor marginatus</i>		
<i>Rickettsia parkeri</i>	<i>Amblyomma americanum</i>	Cães são apontados como prováveis hospedeiros.	América do Norte e do Sul
	<i>Amblyomma maculatum</i>		
	<i>Amblyomma triste</i>		
<i>Rickettsia sibirica</i>	<i>Dermacentor</i> sp.	Roedores, aves	Ásia, África
	<i>Haemaphysalis</i> sp.		
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>		
<i>Rickettsia aeschlimannii</i>	<i>Hyalomma marginatus</i>	Ovinos, caprinos e bovinos	África, Europa
	<i>Rhipicephalus</i>		
	<i>appendiculatus</i>		
<i>Rickettsia helvetica</i>	<i>Ixodes</i> sp.	Cão, gato, cervídeo	Europa, Ásia
<i>Rickettsia honei</i>	<i>Ixodes</i> spp.	Lagartos, ofídeo, roedor	Austrália, Ásia
	<i>Rhipicephalus</i> spp.	(<i>Rattus rattus</i>)	
<i>Rickettsia australis</i>	<i>Ixodes holocyclus</i>	Roedores, marsupiais	Austrália
<i>Rickettsia akari</i>	<i>Liponyssoides sanguineus</i>	Roedores	América do Norte, Rússia, África
	<i>Alloderm</i> sp.		
<i>Rickettsia felis</i>	<i>Ctenocephalides felis</i>	Cães, gatos, marsupiais	América do Norte e do Sul, Europa, África, Ásia

Fonte: Navarro, 2014.

2.4 Os Ectoparasitos Potencialmente Vetores

Os carrapatos constituem o segundo maior grupo de transmissores de patógenos (vírus, bactérias, protozoários e helmintos) para animais e homens, sendo superados apenas pelos culicídeos (Balashov, 1972; Schwan, 1996, Labruna, 2004).

A espécie *A. cajennense* é originária da região Neotropical, pertence ao Filo Arthropoda; Classe Arachnida; Ordem Ixodida; Família Ixodidae; Sub-família Amblyomminae; Gênero *Amblyomma* e Epíteto *cajennense*.

A denominação original do *A. cajennense* é de Kock de 1844 *Amblyomma*, e deriva de “amblys”, encoberto e “omma”, olho; e como foi descrito pela primeira vez na Guiana Francesa, na cidade de Cayena, o epíteto específico *cajennense* (Freitas, 2007).

No Brasil, o *A. cajennense* é conhecido como “carrapato do cavalo”, “carrapato estrela”, “rodoleiro”, “picaço” ou “carrapato rodolego”, devido ao seu comportamento eclético, pois tem a capacidade de parasitar diversos hospedeiros, é frequentemente visto parasitando humanos em suas fases larvária e ninfal, as quais são vulgarmente denominadas de “micuim, carrapatinho e carrapato pólvora” e “vermelhinho”, respectivamente (Figura 02) (e.g. Travassos e Vallejo-Freire, 1944-1945; Magalhães, 1952; Aragão e Fonseca, 1961; Serra-Freire, 1991; Lemos *et al.*, 1997; Barci e Nogueira, 2005; Souza *et al.*, 2006).

Os hospedeiros primários desses vetores são os cavalos (*Equus caballus* Linnaeus, 1758), antas (*Tapirus terrestres*, Linnaeus 1758) e capivaras (Aragão, 1936; Souza *et al.*, 2006), e para que se haja o pronto estabelecimento da população desse artrópode, é necessário o preenchimento de dois pré-requisitos: presença de hospedeiros primários e condições ambientais favoráveis à fase não parasitária (Vieira *et al.*, 2004).

Percebemos tal população em regiões de pastos sujos, locais em que a vegetação densa estabelece microclima adequado para referido ectoparasito (Oliveira, 2004; Vieira *et al.*, 2004).



Figura 2: *Amblyomma cajennense*, macho a esquerda e fêmea a direita.
(Fonte: www.tickencounter.org).

Estudos contemporâneos de genética, biologia e morfologia do principal vetor no Brasil, demonstraram que *A. cajennense* se trata de um complexo de ao menos seis espécies distintas, com cada uma dessas relacionadas com uma área biogeográfica (Nava *et al.*, 2014).

A. cajennense é um parasito heteroxeno de três hospedeiros (trioxeno), principalmente nos estádios de larva e ninfa (Aragão, 1911; Aragão 1936; Aragão e Fonseca, 1953), as quais possuem seis e oito patas, respectivamente; e adultos, igualmente às últimas, são octópodes; apresenta um rostro alongado e hipostômio constituído de três fileiras de dentes, possui peritrêma com formato triangular de ângulos arredondados, sendo que órgão de Haller e festões marginais estão presentes (Sloss, 1999). As fêmeas possuem escudo menor do que o escudo dos machos, e em formato triangular arredondado anteriormente, enquanto que os machos apresentam escudo que recobre todo o idiossoma, de coloração escura e ornamentado, e não possuem placas adanais (Barros-Battesti *et al.*, 2006).

Suas três fases evolutivas (larvas, ninfas e adultos) (Figura 3) são capazes de transmitir a bactéria durante o repasto sanguíneo (Comer, 1991). Porém, as fêmeas, não somente as da espécie *A. cajennense*, necessitam de uma refeição de sangue para iniciar a cópula e a ovoposição, após a qual morrem (Arthur, 1962).

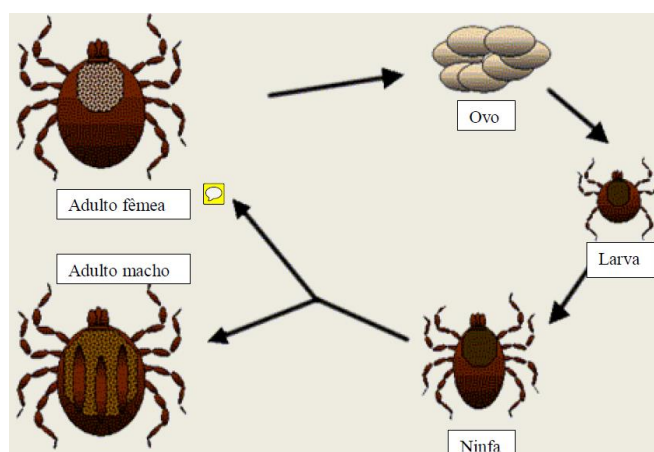


Figura 3: Ciclo de vida do ixodídeo. (Fonte: Cardoso, 2004).

Nesses ectoparasitos, em especial nas fêmeas, a digestão dos fluidos (sangue e linfa) e tecidos, se dá intracelularmente e processa-se em três fases:

1) Fase Reparatória: caracteriza-se pelo início da digestão, quando o pH dos fluidos ingeridos inibe a ação das proteases do trato intestinal dos artrópodes;

2) Digestão Propriamente Dita: inicia-se durante a fase de ingurgitação, quando se dá a concentração de nutrientes e a excreção, pelas glândulas salivares, do excesso de fluidos de volta à circulação do hospedeiro;

3) Fase Final: ocorre após a separação do artrópode do hospedeiro, seguindo-se a digestão dentro de células fagocíticas até a ovoposição.

Um possível fator da sobrevivência de agentes patogênicos no sangue e linfa ingeridos do hospedeiro, como também sua disseminação pelos organismos do ixodídeos, é a não existência da ação de enzimas proteolíticas no lúmen intestinal dos mesmos. (Akov, 1982; Kaufman, 1989; Friedhoff, 1990; Sonenshine, 1993).

A espécie *R. sanguineus*, popularmente conhecido como “carrapato marrom do cão” ou “carrapato vermelho do cão”, semelhantemente ao *A. cajennense*, possui ampla distribuição mundial; sendo originário da região Afrotropical, foi introduzido em vários países do mundo, provavelmente, pelas migrações humanas, levando consigo esses ectoparasitos, como também, pelas importações de cães domésticos infestados, seus hospedeiros de eleição; sendo, talvez, o ixodídeo de maior prevalência mundo (Labruna, 2004; Estrada-Peña e Jongejan, 1999; Dantas-Torres *et al.*, 2006; Evans *et al.*, 2000; Sexton *et al.*, 1976; Pegram *et al.*, 1987).

Historicamente o parasitismo por *R. sanguineus* ocorre ocasionalmente na região Mediterrânea, América Central e mais raramente nos EUA, enquanto que na Europa, é de suma

importância, porque esse artrópode é vetor e reservatório da *R. conorii*, o agente causador da Febre Botonosa, também conhecida como Mediterranean Spotted Fever (WHO, 2004).

No Brasil, o *R. sanguineus* é o principal carrapato que parasita os cães que habitam ambientes rurais, como também peri-urbanos e urbano (Labruna, 2004) (Figura 4); sendo encontrado em todas as regiões do país é capaz de sobreviver em ambientes fechados (Moraes-Filho *et al.*, 2009). É um ectoparasito de interesse em saúde pública (Palmas *et al.*, 2001), devido a sua capacidade de carrear e transmitir inúmeros patógenos aos seres humanos (Dantas-Torres *et al.*, 2006), apesar de que este parasitismo seja relativamente inesperado e incomum para alguns autores.



Figura 4: Larva, ninfa, macho e fêmea de *Rhipicephalus sanguineus*. (Fonte: www.tickencounter.org).

Até o ano de 2004 nenhum caso tinha sido relatado neste país, porém em 2005, foram descritos quatro casos de parasitismo humano por esta espécie de Ixodídeo, na região metropolitana de Recife, Pernambuco (Labruna, 2004; Dantas-Torres *et al.*, 2006). Além disso, foi evidenciada pela primeira vez a participação do *R. sanguineus* na epidemiologia da *R. rickettsii* como vetor em área endêmica da região metropolitana de São Paulo (Cunha *et al.*, 2009; Moraes-Filho *et al.*, 2009). Na zona rural do Rio de Janeiro, pela primeira vez houve relato de infecção natural por *R. rickettsii* em *R. sanguineus* com registros anteriores de casos humanos de FMB (CUNHA *et al.*, 2009). Evidências dos dois últimos estudos mostram a participação desse ixodídeo na transmissão do agente etiológico da FMB a humanos neste país.

O *A. aureolatum*, popularmente denominado de “carrapato-amarelo-do-cão”, é avistado nas regiões Sul e Sudeste, as quais apresentam bioma Mata Atlântica, extensão esta que está inserida na faixa de transição entre o clima tropical e subtropical, onde as condições de alta

umidade e temperaturas amenas prevalecem durante o ano todo (Pinter *et al.*, 2004) (Figura 5). No leste do estado de São Paulo, este ixodídeo foi incriminado como possível vetor de FMB (Moraes-Filho *et al.*, 2009), sendo avaliado em alguns locais endêmicos, como principal vetor da bactéria aos humanos (Evans *et al.*, 2000). Quando em ambientes rurais próximos às porções residuais de floresta tropical, os canídeos são seus principais hospedeiros para as formas adultas (Evans *et al.*, 2000).



Figura 5: Fêmea de *Amblyomma aureolatum*.
(Fonte: www.cloud.cnpqc.embrapa.br).

O *A. dubitatum*, anteriormente denominado *Amblyomma cooperi*, é um ectoparasito que, embora pouco prevalente no Brasil, detém uma grande importância no cenário epidemiológico, pois foi descrita sua infecção por *R. rickettsii* (Moura-Martinião *et al.*, 2014). Mesmo tendo um maior tropismo por capivaras, há relatos do *A. dubitatum* infestando bovinos (Squire, 1972), mediante a este fato, podemos conjecturar um possível parasitismo em humanos, uma vez que esses, em virtude da criação, possuem uma relação estreita com o animal. (Figura 6).



Figura 6: Fêmea de *Amblyomma dubitatum*.
(Fonte: www.cloud.cnpqc.embrapa.br).

Assinalado como o ixodídeo de maior potencial de transmissão de FM nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, o *A. ovale*, foi durante o período de inquéritos de casos, a espécie mais coletada, apresentando maior antropofilia e maior positividade nos focos. No estado do Ceará, na região de Baturité, esta espécie é incriminada com maior evidência de transmissão no ciclo epidêmico (Gazêta *et al.*, 2013). (Figura 7).



Figura 7: Macho de *Amblyomma ovale*.
(Fonte: www.cloud.cnpqc.embrapa.br).

Sifonápteros do gênero *Ctenocephalides* spp. são responsáveis por transmitir a *R. felis*, que foi encontrada pela primeira vez no intestino médio de *C. felis*, coletada de um gato, e caracterizada posteriormente como nova espécie por ferramentas moleculares (Adams *et al.*, 1990; Bouyer *et al.*, 2001) (Figura 8). Ultimamente, a identificação por técnica genotípica de biologia molecular está sendo amplamente utilizada, pois admite a caracterização das espécies anteriormente não encontradas, como a *R. felis* (Bouyer *et al.*, 2001). Apesar de existirem subsídios da detecção da *R. felis*, por Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês *Polymerase chain reaction-PCR*), em ixodídeos (Ishikura *et al.*, 2003; Duh *et al.*, 2005; Cardoso *et al.*, 2006; Horta *et al.*, 2007), ainda não há na literatura prova científica da transmissão de *R. felis* ao ser humano por vetoração de carrapatos.



Figura 8: Fêmea de *Ctenocephalides felis* e macho de *Ctenocephalides canis*.
(Fonte: www.cookislands.bishopmuseum.org).

2.5 Epidemiologia da Febre Maculosa

A determinação dos principais aspectos epidemiológicos da FM dá-se pela ecologia e a distribuição geográfica do carrapato vetor (Lemos *et al.*, 1997b; Raoult e Roux, 1997).

Diversos animais participam na manutenção do ciclo da FM, como hospedeiros primários ou acidentais, como por exemplo as aves domésticas e selvagens, mamíferos, roedores selvagens e até os ofídios podem conter algumas rickettsias (Nascimento e Schumaker, 2004).

A manutenção das rickettsias do GFM no meio ambiente está acoplada à transmissão cíclica entre ectoparasitos vetores e seus hospedeiros vertebrados, que diferem marcadamente de uma área geográfica para outra. Ao contrário dos hospedeiros que raramente manifestam rickettsemia, os carrapatos, uma vez infectados, assim permanecem pelo resto de sua vida, constituindo, desta forma, um reservatório natural de *Rickettsia* spp., principalmente pela sua aptidão de transmitir a infecção verticalmente (Lemos, 1996). (Figura 9).

Diversos gêneros de ixodídeos, incluindo *Amblyomma*, *Dermacentor* e *Rhipicephalus* são importantes reservatórios do agente etiológico da FMB na natureza (Burgdorfer, 1988). Esses ectoparasitos exercem tal função devido à competência de transmitir a *R. rickettsii* verticalmente e horizontalmente; portanto, o vetor persiste infectado durante toda a vida, sendo capaz de difundir a bactéria para futuras gerações. No entanto, somente tal método seria escasso para perpetuar o bioagente ativo ao longo do seu curso de vida, pois existem evidências laboratoriais de que a *R. rickettsii* é patogênica para o ixodídeo vetor (Mcdade e Newhouse, 1986; Burgdorfer, 1988; Reháček, 1989).

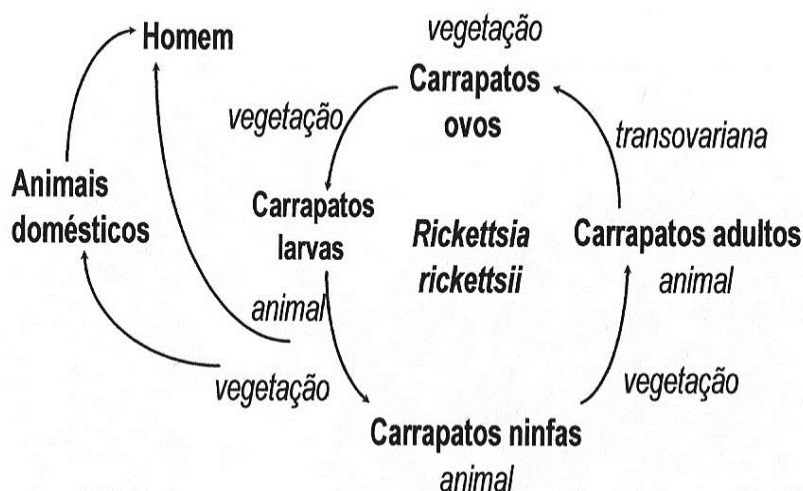


Figura 9: Esquema de infecção do homem pela *R. rickettsii* e fases do ciclo do carrapato. (Fonte: Rozental, 2003).

Já nas pulgas, a *R. felis* é também conservada pela transmissão vertical por contínuas gerações, sem a obrigação de reservatório, justificando, assim, a alta incidência desse agente nesses vetores (Wedincamp e Foil, 2002). Ademais, as infecções por *R. typhi* e *R. felis* não são funestas para seus respectivos vetores naturais, ao contrário do que sucede com outras *rickettsias*, como por exemplo a *R. prowazekii* (Azad *et al.*, 1997) e *R. rickettsii* (Niebylski *et al.*, 1999) para piolhos e carrapatos, respectivamente.

No Brasil, os principais ixodídeos vetores de *Rickettsia* spp. pertencem ao gênero *Amblyomma*: *A. cajennense* (Dias e Martins, 1939; Sangioni *et al.*, 2005; Guedes *et al.*, 2005), *A. aureolatum* (Pinter *et al.*, 2004; Pinter e Labruna, 2006; Labruna, 2009), *A. triste* (Silveira *et al.*, 2007). O *A. dubitatum* que é comum em capivaras, é indicado como possível vetor, embora isso ainda não tenha sido comprovado (SUCEN, 2014), e sua importância médica se dá devido à uma possível manutenção do ciclo enzoótico da *R. rickettsii* na natureza, pela transmissão vertical para gerações futuras, e também quando infectam capivaras (Vieira *et al.*, 2004; Labruna, 2006).

O *A. dubitatum*, além de infecção por *R. rickettsii*, pode também apresentar infecção por *R. parkeri* que detém patogenicidade branda, ou ainda por outra espécie de *Rickettsia* de patogenicidade desconhecida (Guglielmone *et al.*, 2006; Labruna *et al.*, 2004a; Labruna e Machado, 2006).

Mesmo o gênero *Amblyomma* possuindo diversas espécies capazes de transmitir *Rickettsias* spp., somente o *A. cajennense* continua sendo o vetor mais extraordinário na transmissão da FMB, devido ao seu comportamento eclético, pois tem a capacidade de parasitar

diversos hospedeiros, inclusive o homem (Del Gercio *et al.*, 1997; Lemos *et al.*, 2007a). Entretanto, outras espécies de ixodídeos e sifonápteros também estão envolvidas na transmissão da moléstia.

Dentre as gerações do carrapato, a forma adulta é a que se apresenta com menor densidade populacional, mostrando também uma menor predileção por parasitismo em humanos. Por apresentar uma picada mais dolorosa, a probabilidade de uma pessoa permitir que um adulto fique fixado por mais de cinco horas em sua pele é diminuída. Por outro lado, as infestações com larvas desses artrópodes em humanos são mais intensas, devido às pequenas dimensões desse estágio de desenvolvimento (Mcdade e Newhouse, 1986).

Como anteriormente visto, tanto vertebrados quanto invertebrados se comportam como hospedeiros para as bactérias da família Rickettsiaceae, porém alguns autores consideram que a associação das mesmas com os invertebrados seria evolutivamente mais remota, pois os artrópodes, exceto o piolho e a pulga, não apresentam patologias evidentes associadas à infecção por estes microrganismos, atuando, portanto, como vetores ou hospedeiros primários, os quais transmitem a doença ao humano, que é considerado hospedeiro errátil e sendo sua infecção reconhecida com reflexo de alterações ecológicas produzidas no ambiente (Hoogstraal, 1967; Friedhoff, 1990).

A especificidade entre ixodídeos e seus hospedeiros vertebrados se dá de forma mais ou menos restrita (Katz *et al.*, 1994); enquanto que o agente da FM está intimamente associado a distintas espécies de carrapatos e seus hospedeiros vertebrados.

Tal especificidade supracitada, está na dependência não somente das espécies envolvidas, mas, sobretudo, no estágio de desenvolvimento. A dispersão geográfica dos estádios larvares e ninfais é restrita e a capacidade de picar é dada pela extensão do aparelho bucal (Kaufman, 1989). Por ter uma maior área de alcance geográfico, adultos de algumas espécies deslocam-se à procura do hospedeiro, enquanto outras permanecem próximas da área onde se deu a ecdise, subindo à vegetação à espera do hospedeiro, para que assim, possa se fixar a ele (Lane e Stubbs, 1990).

A incidência da doença em humanos, que não servem como reservatórios, depende, em grande proporção, dos vetores, sua distribuição e ecologia. Assim, a distribuição geográfica da FM corresponde a dos vetores, além de depender de uma complexa interação de densidade populacional e ciclos anuais dos carrapatos e vertebrados hospedeiros envolvidos (Lemos, 1991). O *A. cajennense* é uma espécie de carrapato que parasita uma gama de hospedeiros (eurixeno), podendo ser visto parasitando tanto animais homeotérmicos quanto ectotérmicos. Além dos hospedeiros primários, podem ainda ser encontrados parasitando outras espécies como boi, carneiro, coelhos, cotias, tatus e inclusive o homem que é frequentemente vítima

destes carrapatos; o que nos leva a considerar a possibilidade de epidemiologia mais rica e complexa (Travassos e Vallejo-Freire, 1944-1945; Dias e Martins, 1939; Hoogstraal, 1967; Lemos, 2005).

O surgimento e a expansão das rickettsioses se dá também em função das atividades humanas, especialmente àquelas voltadas para vegetação, como por exemplo o reflorestamento com arbustos e a prática agrícola de criar monoculturas de gramíneas circundados por cordões, beneficiando assim, a propagação de artrópodes, pois formar-se-ão microclimas adequados e à abundância de cobertura de solo, gerando excelente nicho ecológico para os mamíferos hospedeiros dos estádios imaturos; como ocorrido no estado de Virgínia, EUA, onde houve a interferência humana, criando áreas reflorestadas, gerando, assim, microclimas propícios para sobrevivência de artrópodes e hospedeiros relacionados com a RMFS, que por consequência teve seu número de casos aumento (Atwood *et al.*, 1965; Sonenshine *et al.*, 1972).

Por tomar nichos ecológicos abertos, carrapatos que se encontram nesses ambientes, tornam-se subordinados aos fatores ambientais, tais como as variações das condições climáticas. Na transcorrência de sua evolução, e perante à esse infortúnio, dentre outros, como por exemplo, falta de alimento, procura pelo hospedeiro, condições climáticas desfavoráveis, reconhecimento de períodos sazonais ótimos para o início da postura e da ecdise (fotoperiodismo), esses ectoparasitos desenvolveram uma incrível capacidade de adaptação às tais condições desfavoráveis. A sua longevidade e elevada taxa de reprodução contribuem para manter a densidade populacional elevada numa determinada área geográfica, garantindo assim sua sobrevivência (Oliver, 1984; Friedhoff, 1990).

A obrigação da presença de hospedeiros reservatórios para circulação da enfermidade e manutenção do agente na natureza é fundamental (Burgdorfer *et al.*, 1962); permitindo assim, que a FM tenha em vários grupos de mamíferos seus potenciais reservatórios, como equinos, gatos, cães, roedores silvestres, marsupiais, morcegos e capivaras (Dias e Martins, 1939; Vianna, 2002; Lemos, 2002); sendo a capivara não somente hospedeiro reservatório, mas também o principal hospedeiro amplificador, atuando como elo entre os ciclos enzoóticos e zoonóticos da moléstia. Através de infestações de caráter experimental de *A. dubitatum* em várias espécies de mamíferos e aves revelou que a capivara foi o melhor hospedeiro para formas imaturas (Perez *et al.*, 2008).

Durante a década de 80 a capivara tornou-se alvo de caça predatória, levando à intervenção de órgãos governamentais, pois sendo um animal silvestre teria que ser amparado pela Lei 5.197/67 de proteção à fauna; a partir deste ato houve uma grande recuperação da espécie, que sem predadores naturais e habitat natural deteriorado, teve uma exploração

demográfica, tornando-se assim, um problema em regiões rurais e urbanizadas, pois o crescimento de sua população está diretamente relacionado com aumento da comunidade de carrapatos associados à FMB, (BRASIL, 1967; Pinto, 2003; Souza *et al.*, 2004); somando-se a isto o agravamento do fato, devido à este animal ser um hospedeiro amplificador.

É sabido que para ser considerado um hospedeiro amplificador eficaz de *R. rickettsii* na natureza necessita-se que a espécie em questão preencha cinco pré-requisitos, tais como: ser abundante na área endêmica para a FMB (1); necessita-se também que o aspirante seja bom hospedeiro para o artrópode vetor em condições naturais (2); como também ser susceptível à infecção (3); apresentar rickettsemia suficiente para que o bioagente esteja níveis plasmáticos satisfatórios para infectar os futuros vetores que se alimentarem nele (4); e finalmente possuir elevada taxa de renovação populacional (5) (Burgdorfer, 1988; Labruna, 2006), tornando-se assim, um excelente amplificador.

Portanto, o efeito amplificador que determinados animais silvestres exercem deve existir para garantia da conservação da *R. rickettsii* na natureza. Diante disso, a espécie que desempenha o papel de hospedeiro amplificador conserva o microrganismo em níveis elevados em sua corrente sanguínea por alguns dias ou semanas, permitindo que novos ixodídeos se infectem, amplificando assim, a infecção em sua população (Burgdorfer, 1988).

No Brasil, pesquisas realizadas desde dos anos 40 já apontavam as capivaras e os gambás como sendo espécies hospedeiros amplificadores (Moreira e Magalhães, 1935; Travassos e Vallejo, 1942a; Labruna, 2006; Horta *et al.*, 2009; Perez *et al.*, 2008); podendo-se utilizá-los como bioindicadores de infestação de carrapatos em locais endêmicos para a FMB (Perez *et al.*, 2008). Somando-se a essas espécies, foram apontados o cão doméstico, o cachorro do mato, o coelho do mato, o preá, e a cutia (Moreira e Magalhães, 1935).

Ainda sobre animais amplificadores, no Arizona (EUA), foi relatado um caso humano de RMSF que teria sido transmitida pelo “carrapato do cão”, o *R. sanguineus* reerguendo assim, a hipótese de que cães exercem função de hospedeiros amplificadores, pois os mesmo preenchem os dois primeiros pré-requisitos, sendo abundantes na área endêmica para a moléstia, como também bons hospedeiros para os ectoparasitos vetores em condições naturais, além do que todos os estágios parasitários de *R. sanguineus* os acometem primariamente; visto que ele, os cães, serviram possivelmente de fonte de infecção para os carrapatos *R. sanguineus* no foco endêmico do Arizona (Demma *et al.*, 2006).

A domesticação dos cães data de 10.000 anos atrás e esta espécie possui distribuição mundial, tendo íntima relação com humanos. Os cães são um bom meio para disseminar carrapatos infectados e seu papel, estudado por diversos autores, é observado com alta

frequência na associação deste mamífero com os relatos de casos humanos (Feng *et al.*, 1979; Kelly *et al.*, 1982; Smith *et al.*, 1983; Breitschwerdt *et al.*, 1987; Greene, 1987; Weyer, 1978, Zaki, 1989; Szabó *et al.*, 2001).

A ocorrência de FMB em humanos já foi confirmada em vários estados do Brasil, porém na população de cães a doença clínica foi descrita recentemente, diante da confirmação de dois animais nativos de Itu, interior do estado de São de Paulo (Labruna, *et al.*, 2009), destacando, portanto, a gravidade da doença e a dificuldade de diagnóstico na população de cães (Silva, 2012). Todavia, devido à maior exposição dos cães aos potenciais ixodídeos vetores e à susceptibilidade à infecção por *R. rickettsii*, perante a tal fato, pode-se prever que ocorra maior incidência da patologia em cães do que no homem.

Devido ao limitado conhecimento a respeito da epidemiologia da moléstia, certamente a subnotificação da doença em cães é existente (Fortes *et al.*, 2011). A partir de investigações sorológicas para *R. rickettsii* em hospedeiros sentinelas, principalmente o cão, pode-se determinar novos limites para FMB, e assim, fornecer mais informações sobre a epidemiologia acerca da enfermidade, como também, alertar proprietários dos mesmos onde o agente é endêmico (Cardoso *et al.*, 2006; Freitas, 2007; Paddock *et al.*, 2002; Piranda *et al.*, 2008).

Cães que resistem à FM produzem anticorpos (Demma *et al.*, 2006), sendo conseqüentemente, veículo viável de determinação à exposição de humanos a *Rickettsia* spp. (Raoult e Parola, 2007), porém não indica necessariamente que seja infecção recente (Paddock *et al.*, 2002; Sangioni *et al.*, 2005). Desta forma, cães são tidos como importantes sentinelas para a FM (Breitschwerdt *et al.*, 1987; Paddock *et al.*, 2002; Sangioni *et al.*, 2005). Entretanto, algumas infecções por *R. rickettsii* apresentam-se sob formas subclínicas, e uma alta taxa de cães aparentemente salutar que vivem em áreas endêmicas é soropositivo para a enfermidade. Apesar disso, após o contato com a bactéria, a soropositividade prossegue por um bom tempo (Piranda *et al.*, 2008). O uso do resultado da sorologia de cães vem sendo utilizada por alguns países, demonstrando ser um veículo plausível na determinação da incidência da circulação de *Rickettsia* spp., podendo-se conjecturar assim, o nível de exposição de humanos ao bioagente, e prognosticar alterações na incidência das infecções nos homens (Raoult e Parola, 2007). A soroprevalência em determinadas áreas geográficas se aproxima da encontrada em humanos (Breitschwerdt *et al.*, 1987), contudo, já houve constatação da infecção ocorrendo nos dois hospedeiros, o sentinela e o errátil, concomitantemente. (Paddock *et al.*, 2002; Elchos e Goddard, 2003; Zavala-Castro *et al.*, 2006). Perante ao exposto, ratifica-se o propósito e a importância de se considerar o cão como hospedeiro sentinela para vigilância da FMB (Paddock *et al.*, 2002; Sangioni *et al.*, 2005).

Como geralmente os cães domésticos são abundantes nas áreas endêmicas para a enfermidade e também são bons hospedeiros para os vetores em condições naturais, atendem, assim, aos pré-requisitos para serem hospedeiros competentes, portanto, torna-se plausível o inquérito epidemiológico da FM a partir desses; sendo, contudo, necessários estudos para avaliar a sua susceptibilidade à infecção por *Rickettsia* spp. (Silva, 2012).

Existe correlação positiva entre a ocorrência de FM em humanos e o número de cães domésticos soropositivos, pois ambos hospedeiros são parasitados pelas mesmas espécies de vetores, como carrapatos e pulgas. Perante a este inconveniente, os cães tornam-se pontos de total importância epidemiológica na doença humana, refletindo assim, na saúde pública, desde o momento em que atuam como carreadores de carrapatos (*A. cajennense* e *R. sanguineus*) e pulgas (*C. canis* e *C. felis*) como quando atuando como bioindicadores de atividade rickettsiana (Feng *et al.*, 1979; Kelly *et al.*, 1982; Smith *et al.*, 1983; Breitschwerdt *et al.*, 1987; Greene, 1987; Weyer, 1978; Zaki, 1989; Szabó *et al.*, 2001).

Já os equinos são considerados exímios sentinelas para a FMB (Sangioni *et al.*, 2005), não havendo relatos de sintomatologia clínica, embora exiba elevada titulação (≥ 1024) de anticorpos contra *R. rickettsii* (Lemos *et al.*, 1996a). São também os principais hospedeiros para fase adulta do *A. cajennense*, e caso estejam saudáveis, possuem a capacidade de albergar grandes infestações deste carrapato - até 50 mil larvas, 12 mil ninfas e dois mil adultos (Labruna *et al.*, 2002; Vieira *et al.*, 2004), destacando-se assim, como ponto importantíssimo da epidemiologia da FMB.

Alguns autores, destacaram a função dos carroceiros na cadeia de transmissão da FMB, os quais se caracterizam por serem trabalhadores informais, resultantes da desigualdade social e pressão econômica, e que para sobreviverem mantêm seus equinos em periferias das cidades, e em grande parte das vezes em condições inadequadas de salubridade, favorecendo assim, o estabelecimento de populações do vetor; pois sem informações adequadas a respeito do combate aos carrapatos, tais trabalhadores fazem uso de acaricidas sem nenhum critério e nem respaldo técnico, como também uso de mecanismos nada aconselháveis (Leite *et al.*, 2008; Oliveira, 2004).

Através de ensaios experimentais, foi confirmada a sensibilidade à infecção por *Rickettsia* spp. em pequenos roedores, os quais apresentaram rickettsemia satisfatória para infectar, por pelo menos um breve período de tempo, ectoparasitos que neles se alimentavam. Tais roedores quando encontrados naturalmente infectados, se apresentam como bons bioindicadores de atividade rickettsiana de determinada área, pois possuem área de dispersão

limitada e um tempo de vida curto (Reháček e Urvolgyi, 1978; Reháček, 1993), como também representam um elo entre o ciclo enzoótico e zoonótico da patologia.

Existem outras espécies de ectoparasitos, como *A. ovale*, *Amblyomma brasiliense* (Aragão, 1908) e *Rhipicephalus microplus*, (Canestrini, 1887) que se encontram naturalmente infectados e/ou podem participar, eventualmente, na transmissão da bactéria para o ser humano, comprovando a potencial magnitude da ecologia da FM (Magalhães, 1952; Lemos-Monteiro e Fonseca, 1932b; Gomes, 1933; Lemos *et.al.*, 1997).

2.6 Dinâmica Sazonal

A ocorrência de numerosas populações do *A. cajennense* nas áreas endêmicas para FMB é um achado comum, completando somente uma geração por ano no Sudeste brasileiro, com os estádios parasitários marcadamente distribuídos em um ano (Souza, 1990, Oliveira, 1998). As larvas predominam de abril a julho, as ninfas de julho a novembro e os adultos de novembro a março (Labruna *et al.*, 2002).

A doença possui prevalência sazonal definida, apresentando números de casos mais abundantes de setembro a novembro, abrangendo a primavera e início do verão (Dias e Martins, 1939; Galvão, 1996; Lemos *et al.*, 1997b). Esta sazonalidade pode ser melhor visualizada na Figura 10.

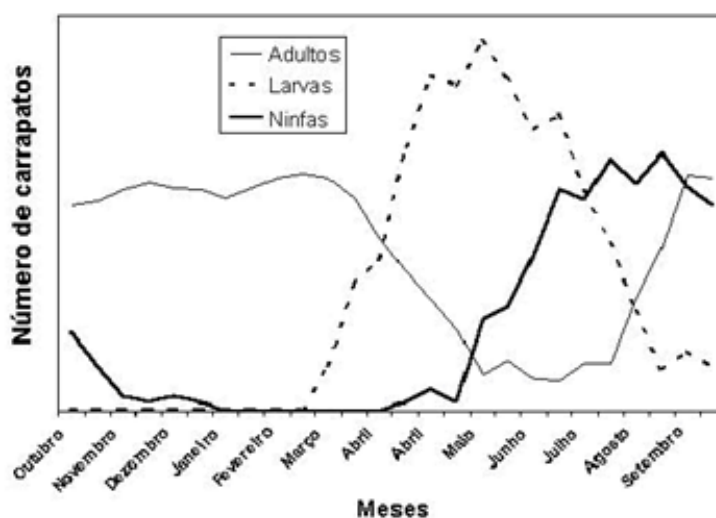


Figura 10: Dinâmica sazonal do carrapato *Amblyomma cajennense* no Sudeste do Brasil. (Fonte: Vleira *et al.*, 2014).

2.7 Transmissão, Patogenia e Manifestações Clínicas

Outrora acreditava-se que eram necessárias mais de 30 horas de repasto sanguíneo para que o bioagente fosse transmitido (Magalhães, 1952). Entretanto, o sinal para o fim da dormência celular do ixodídeos, a qual sucede durante o período de diapausa, é dado quando há ingestão de sangue, que só ocorre uma vez por cada estágio de desenvolvimento, e no instante posterior a esse os carrapatos transmitem a *R. rickettsii* após permanecerem fixados por no mínimo de três a seis horas na pele do hospedeiro, para que causem a infecção, dependendo da temperatura, entre outros fatores (Pereira e Labruna, 1998; Reháček, 1989; Vranjac, 2003; Vieira *et al.*, 2004; Mancini *et al.*, 1983; Greene, 1987). Este fenômeno é chamado de *tempo de reativação*, e é o tempo imprescindível para que ocorra a proliferação e ativação patogênica do agente nas glândulas salivares do vetor e o aumento de seu metabolismo, após o repasto sanguíneo (Johnson e Kadull, 1967; Sexton *et al.*, 1975; Wells *et al.*, 1978; Reháček, 1989).

Tal fenômeno está relacionado com a interação ixodídeo-*Rickettsia*, e foi experimentado por Ricketts, quando associou a variação na virulência de rickettsias com o estado de alimentação do artrópode. Somente na década de 20 impetrou-se que a virulência da bactéria no vetor está diretamente relacionada com o estado fisiológico do mesmo (Weiss, 1987); pois demonstrou-se que as rickettsias dos vetores não ingurgitados tinham a capacidade de indução de resposta imune no hospedeiro/cobaia, porém não eram eficientes no processo de indução da doença, enquanto que nos vetores infectados e ingurgitados ou após período de incubação a 37°C por 24 a 48 horas, as cobaias apresentavam a infecção típica, caracterizando, assim, o mecanismo de reativação (Hayes e Burgdorfer, 1982); o qual foi reproduzido *in vitro* usando-se estirpes virulentas de *R. rickettsii* (Walker *et al.*, 1982).

Outro fenômeno decorrente desta relação é o fenômeno de interferência, visto que alguns autores citam que a taxa de infecção desses artrópodes por rickettsias patogênicas ao humano deva ser regulada pela infecção por rickettsias não patogênicas, resultado este da competição pela colonização sistêmica dos ixodídeos; lê-se primo-infecção (Price, 1954; Loving *et al.*, 1978; Burgdorfer *et al.*, 1981).

Sendo a FM uma infecção típica de carrapatos e de seus hospedeiros naturais e reservatórios, a transmissão e conseqüentemente a infecção do homem dá-se de maneira errátil, como anteriormente dito; não tendo o ser humano nenhuma importância na manutenção da infecção na natureza (Lemos, 1996; Lemos, 2005). O carrapato infectado no final do repasto sanguíneo, por regurgitação da saliva e parte do alimento ingerido, transmite o agente etiológico

através da picada (Veronesi e Focaccia, 1996), ou coçadura da pele no local da lesão coberta por fezes do carrapato (Contran *et al.*, 1996; Veronesi e Focaccia, 1996).

Além da transmissão natural pela picada do parasito infectado, são conhecidas a infecção por exposição a aerossóis de material contaminado em laboratórios ou em ambientes promíscuos, e a transmissão entre seres humanos através da hemotransfusão (Travassos e Vallejo-Freire, 1944-1945; Kenyon e Pedersen Jr, 1975; Wells *et al.*, 1978; Veronesi e Focaccia, 1996).

A transmissão transovariana, também conhecida como transmissão vertical, da *Rickettsia* por fêmeas do gênero *Amblyomma* sp. foi descrita por Lemos-Monteiro e Fonseca (1932a). Tais bactérias multiplicam-se em vários órgãos do artrópode, inclusive nos ovários, permitindo a transmissão transovariana para, pelo menos uma geração.

A transmissão transestadial, ou também transmissão horizontal, dá-se, se o ovo estiver infectado, conseqüentemente, larvas, ninfas e adultos apresentarão o bioagente (Raoult e Roux, 1997). Segundo Barci e Nogueira (2005), caso os ixodídeos não tiverem a possibilidade de se reinfectar periodicamente, a concentração de *R. rickettsii* nesses tende ao desaparecimento após algumas gerações. Acrescente-se a isso, o fato de que nem todos os ectoparasitos que se alimentam em hospedeiro parasitêmico tornam-se positivos para tal bioagente.

Ixodídeos machos através de fluidos corporais, incluindo o esperma, podem transferir o agente para a fêmea durante a cópula (Raoult *et al.*, 2005).

Tratando-se ainda de mecanismos de transmissibilidade, foi obtida com êxito, por via alimentar, a co-infecção de ixodídeos, em circunstâncias laboratoriais, alocando-se artrópodes infectados para se alimentarem simultaneamente com não infectados sobre um mesmo hospedeiro saudável (Price, 1954). Corroborou-se que a infecção primária ou primo-infecção, de um ixodídeo por via alimentar, reside na dependência da quantidade de *Rickettsia* que o mesmo ingere juntamente com o sangue. Conforme alguns autores, quando essas bactérias são ingeridas em quantidades suficientes, essas ultrapassam a barreira intestinal penetrando assim, no hemocélio, local onde serão fagocitadas pelos hemócitos (Burgdorfer *et al.*, 1966; Burgdorfer, 1975; Burgdorfer e Brinton, 1975).

Perante ao acima exposto, verifica-se que a presença de rickettsias não patogênicas nos ixodídeos pode desempenhar ação profilática, atuando de modo positivo na redução da capacidade de reservatório e vetoração desses artrópodes, pois valendo-se do fenômeno da interferência (primo-infecção), uma vez infectados por rickettsias não patogênicas (as quais também são capazes de induzir a produção de anticorpos no organismos do hospedeiro) esses ixodídeos não se infectam por rickettsias patogênicas (Bacellar, 1996).

Até o momento, nenhum artrópode vetor foi encontrado na natureza infectado por mais de uma espécie de *Rickettsia* (Labruna *et al.*, 2004a). Tem-se observado em alguns experimentos que a presença de *Rickettsia* spp. não patogênicas dentro de uma população de ixodídeos pode minimizar a transmissão vertical de uma *Rickettsia* patogênica (Burgdorfer, 1988; Macaluso *et al.*, 2002), o que pode explicar a baixa prevalência da infecção na população de carrapatos na natureza (Philip *et al.*, 1981; Pinter e Labruna, 2006).

A patogenia em humanos se dá após a inoculação da saliva do carrapato infectado no hospedeiro vertebrado, faz-se necessário a penetração das rickettsias nas células endoteliais dos vasos sanguíneos, que ocorre por via linfoematogênica para todo o corpo; as bactérias através da proteína de superfície *ompA* e da enzima fosfolipase A₂, se aderem a receptores que contêm colesterol de membrana, sendo endocitadas por fagolisossomos, escapando para o citosol, penetrando e multiplicando-se por divisão binária nas células do endotélio, estabelecendo numerosos focos de disseminação bacteriana, provocando lise celular localizada, constituindo assim, o mecanismo da patogenia da FM (Walker e Mattern, 1980; Deberaldini *et al.*, 1996; Contran *et al.*, 1996; Silverman *et al.*, 1992).

Diferentemente de outras rickettsias que através de sua multiplicação rompem a célula, o mecanismo patogênico da FMB é determinado pelo agrupamento de *R. rickettsii* e dado pela liberação de endotoxina, produzida durante sua multiplicação, causando lesões direta em vários focos da região endotelial, lesões essas que estão associadas à liberação de radicais livres, à atividade da protease e fosfolipase A₂ rickettsiana. As células degeneradas caracterizam uma vasculite generalizada, levando à hemorragia, com posterior aderência plaquetária por ativação do sistema calcitrina-cinina do hospedeiro, resultando em trombocitopenia, que por sua vez gera distúrbio de coagulação, levando a um conjunto de distúrbios vasculares, lesões nos capilares e arteríolas de tecido nervoso, baço, rim e pele. Como consequências deste mecanismo tem-se aumento da permeabilidade vascular culminando em edema, hipovolemia, hipotensão, queda da perfusão tecidual e desordens tissulares (necrose tecidual), com posterior resposta mononuclear leucocitária do hospedeiro, configurando assim, os efeitos deste mecanismo (Walker e Mattern, 1980; Turner *et al.*, 1986; Contran *et al.*, 1996; Pereira e Labruna, 1998).

Ocorrem infartos endoteliais, seguido de isquemia cerebral, principalmente no mesencéfalo e nas regiões dos núcleos, e, menos frequentemente, no coração. No fígado, pode haver lesão perivascular, com degeneração gordurosa dos hepatócitos, levando a icterícia. As alterações renais consistem de lesões vasculares intersticiais focais, acometendo poucos néfrons, resultando em azotemia pré-renal, conexas a hipovolemia, com consequente necrose tubular aguda. Já em nível pulmonar, revelam-se tosse, edema pulmonar e alterações

radiológicas, incluindo infiltrado alveolar, pneumonia intersticial, derrame pleural. Os achados neurológicos expressam-se por déficit neurológico, meningoencefalite e vasculite retiniana, dentre outras (Barci e Nogueira, 2005; Bell e Lascari, 1970; Hattwick *et al.*, 1973; Tiriba e Monteiro, 1982; Helmick *et al.*, 1984; Lemos *et al.*, 2001).

A FMB é uma moléstia multissistêmica, tendo curso clínico variável, apresentando sintomatologia clássica aos quadros atípicos, sem exantemas (Lemos, 2005). A sintomatologia corriqueira é dada por: febre alta, comprometimento gastrointestinal, dores de cabeça, mialgia, artralgia e prostração. Sendo que alguns casos se apresentam de maneira extremamente graves, com necrose tecidual. Tem-se edema e aparência brilhante de pálpebras, rosto, pernas. Hipotensão e tosse são frequentes (De Cicco, 2007).

O exantema (erupção geralmente avermelhada que aparece na pele devido à dilatação dos vasos sanguíneos ou inflamação) é o sinal mais importante da FMB e aparece, em média, no quarto dia de doença, podendo estar ausente em 15 a 20% dos casos, dificultando e retardando o diagnóstico, sendo a maior causa de óbitos (Helmick *et al.*, 1984; Lemos, 2005). Caracteriza-se por manchas pequenas, achatadas e róseas nas extremidades, em torno do punho e do tornozelo, tronco, face, pescoço, palmas das mãos e solas dos pés (Figuras 11 e 12), disseminando-se de forma centrípeta para o tronco (Lemos, 2005; De Cicco, 2007). Entretanto, este sinal pode não ser observado em alguns pacientes, principalmente em idosos ou naqueles de difícil identificação, como nos negros, impedindo a confirmação diagnóstica e o tratamento precoce (Lemos, 2005).

Já as lesões cutâneas decorrem devido a proliferação bacteriana no endotélio dos pequenos vasos, com subsequente formação de trombos, hemorragias, infiltração perivascular e necroses teciduais focais, podendo levar à formação de nódulos típicos na pele, músculo cardíaco e cérebro (Veronese e Focaccia, 1996).



Figura 11: Exantema nas mãos.
(Fonte: www.lincol.com).



Figura 12: Exantema nos pés. (Fonte: www.mhhe.com).

A rickettsiose manifesta-se após um período de incubação de 2 a 14 dias, com média de sete dias (Nelson e Conto, 1994; Deberaldini *et al.*, 1996; Dos Santos, 2003). O período de incubação está relacionado à quantidade de inócuo, sendo de essencial importância à retirada precoce do ixodídeo e limpeza do local. No entanto, 25% dos casos não são relatados os antecedentes da picada do carrapato (Deberaldini, *et al.*, 1996).

Já nos ixodídeos as rickettsias se multiplicam no citoplasma celular de todos os órgãos, causando assim, infecção multissistêmica (Reháček, 1989), a qual ocorre de maneira maciça, porém sem ser observados efeitos citopatogênicos (Reháček, 1984).

Os efeitos deletérios da bactéria nos ectoparasitos não são tão intensos e graves, pois a relação existente entre *Rickettsia*-ixodídeo parece ser muito antiga filogeneticamente, pois ambos organismos encontram-se altamente adaptados entre si. Porém tal relação não pode ser caracterizada como comensalismo, já que artrópodes experimentalmente infectados exibem decréscimos em seu *fitness*, como por exemplo, diminuição da ovoposição, má formação de ovos e alta taxa de mortalidade, quando confrontados com os não infectados. Percebe-se que as bactérias em questão são mais beneficiadas que seu correlacionado (Reháček, 1989). Um exemplo desta relação é dado pelo experimentos laboratoriais de Niebylski *et al.*, (1999), que valeram-se de cepas virulentas de *R. rickettsii* em *D. andersoni*, e notaram que 98% das ninfas infectadas na fase larval e 34% dos adultos infectados na fase ninfal morreram durante a ecdise e 83% dos adultos restantes não conseguiram realizar o repasto sanguíneo; explicando assim, a baixa prevalência de carrapatos adultos infectados por esse bioagente.

Como nos ixodídeos os efeitos citopatogênicos não são observados (Reháček, 1984), tal infecção explicaria as transmissões transestadial e transovariana (Friedhoff, 1990; Smith e Dunn, 1991). Nota-se que os ixodídeos tornaram-se não somente vetores de rickettsias, mas também seus reservatórios naturais, via transmissão transovariana, suprimindo, em tese, a necessidade de um hospedeiro vertebrado no ciclo vital das *Rickettsia*, tudo isso devido ao fenômeno da invasão citoplasmática celular (Reháček, 1984; Burgdorfer e Brinton, 1975; Hayes e Burgdorfer, 1982).

Enquanto nos cães os casos clínicos de infecção por *R. rickettsii* tem sido relatado nos EUA, tendo como sintomatologia a febre, letargia, anorexia, anemia e trombocitopenia (Grindem *et al.*, 1999; Gasser *et al.*, 2001). No Brasil, cães foram analisados clinicamente após serem submetidos à infecção experimental por *R. rickettsii*, e a sintomatologia apresentada foi idêntica à observada por Grindem, somando-se as lesões oculares (Piranda *et al.*, 2008). E mais atualmente, houve a descrição dos primeiros casos de infecção natural em cães oriundos do estado de São Paulo (Labruna *et al.*, 2009).

Após pronto restabelecimento, humanos e cães infectados por *R. rickettsii* desenvolvem imunidade à reinfecção. Possivelmente infecções causadas pelo bioagente em questão que não foram diagnosticadas e tiveram um desenvolvimento brando ou assintomático, ou a exposição repetida a rickettsias do GFM não patogênicas, colaborem para a prevenção de FM na sua forma grave em cães com exposição maciça de carrapatos em regiões endêmicas.

A ocorrência de FM não foi relatada duas vezes no mesmo cão nem no homem, sugerindo imunidade permanente (Greene, 1987; Greene e Breitschwerdt, 1990).

2.8 Diagnósticos

A semelhança sintomática inicial (febre, cefaléia, mialgia, náuseas, etc.) da FMB com outras doenças é um dos problemas mais graves no diagnóstico desta em relações a outras doenças comuns, como a gripe e hoje em dia a dengue. Isso faz com que os pacientes na maioria dos casos não procurem o tratamento adequado precocemente e a doença evolua para um quadro mais grave. Cerca de 80% dos indivíduos com forma grave, se não diagnosticados e tratados a tempo, evoluem para óbito (De Cicco, 2007). Estes são fatores que contribuem também para que se suponha que a incidência da doença seja maior do que a conhecida através dos casos que chegam a ser notificados pelas autoridades de saúde (Del Guercio *et al.*, 1997).

Infelizmente, mesmo nos dias atuais as rickettsioses não recebem a devida importância por parte do sistema de saúde, como realmente deveria fazê-lo, pois trata-se de uma doença infecciosa para o homem e de caráter global, afetando assim, todos os continentes, exceto a Antártida. Do mesmo modo, a ação real destas infecções na saúde pública mundial, são dissimuladas, pois existem a prevalência de casos não diagnosticados, mal diagnosticados e não notificados (Bacellar, 1996).

Perante a tais fatos, é de fundamental importância associar o diagnóstico laboratorial com a situação e os antecedentes epidemiológicos da região em questão, a origem do caso suspeito nos últimos 15 dias, a época do ano, pois em épocas chuvosas pode ser confundida com leptospirose, histórico de contato prévio com possíveis vetores e se o mesmo frequentou áreas de risco da moléstia, para que se possa ser feita a diferenciação de outras enfermidades (Deberaldini *et al.*, 1996; Gasser *et al.*, 2001), e assim, obter um diagnóstico rápido e preciso.

O diagnóstico específico é realizado de forma indireta e/ou direta, através das seguintes técnicas: Sorológico [RIFI, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Reação de Weil-Felix], Isolamento, PCR e Anatomopatológico (Barci e Nogueira, 2005); e as condições de biossegurança necessárias para trabalhos com bactérias do gênero *Rickettsia* são as mesmas utilizadas para os vírus (Biohazard-II) (Marrero e Raoult, 1989). Devemos considerar que no Brasil, onde anualmente são relatados casos clínicos com suspeita de participação de rickettsias, o diagnóstico rápido e eficiente é fundamental e decisivo, para que não ocorra demora no tratamento. Todavia, é claro que a avaliação clínica ainda é o mais rápido e dinâmico método diagnóstico (Galvão *et al.*, 2005), por isto torna-se essencial o preparo e conscientização dos profissionais de saúde.

Mesmo com esforços dos laboratórios de referência do país, o diagnóstico laboratorial protocolado pelo MS (isolamento em cultura de células e/ou RIFI) não possibilita a identificação das possíveis espécies circulantes no Brasil.

As rickettsioses fazem parte do Código Internacional de Doenças (C. I. D.), sob número A77 temos a FMB causada pela *R. rickettsii* (Fonseca e Martins, 2007).

2.8.1 Diagnóstico Sorológico

O diagnóstico da FM é usualmente sorológico/indireto, retrospectivo e diversas técnicas podem ser utilizadas, disponíveis na FIOCRUZ (Rio de Janeiro), Instituto Adolfo Lutz (São Paulo) e Fundação Ezequiel Dias-FUNED (Minas Gerais). A RIFI é considerada o teste padrão-

ouro para diagnóstico da FMB tanto em humanos quanto em animais (Figura 13), e uma única amostra de soro com títulos $\geq 1:64$ para Imunoglobulina G (IgG) e/ou presença de Imunoglobulina M (IgM) possibilita a confirmação diagnóstica (Newhouse *et al.*, 1979; Hays, 1985; Walker, 1988; La Scola e Raoult, 1997;).

Anticorpos contra *R. rickettsii* são também detectados no soro de animais e homens, através, de ELISA, hemaglutinação indireta, aglutinação em látex (Greene *et al.*, 1993).

No entanto, como geralmente a primeira amostra de soro é negativa, uma segunda amostra de soro, após um período médio de duas semanas, deve ser obtida para análise simultânea (Lemos, 2005).

Como anteriormente visto, o diagnóstico indireto do agente da FMB é baseado em reações sorológicas (Comer, 1991). Todavia, devido à existência de reações heterólogas/cruzadas entre as diferentes espécies de rickettsias do GFM e entre as do GT, nenhum desses métodos citados é capaz de distinguir a espécie de *Rickettsia* em questão (Philip *et al.*, 1978; Mcdade e Newhouse, 1986; Comer, 1991).

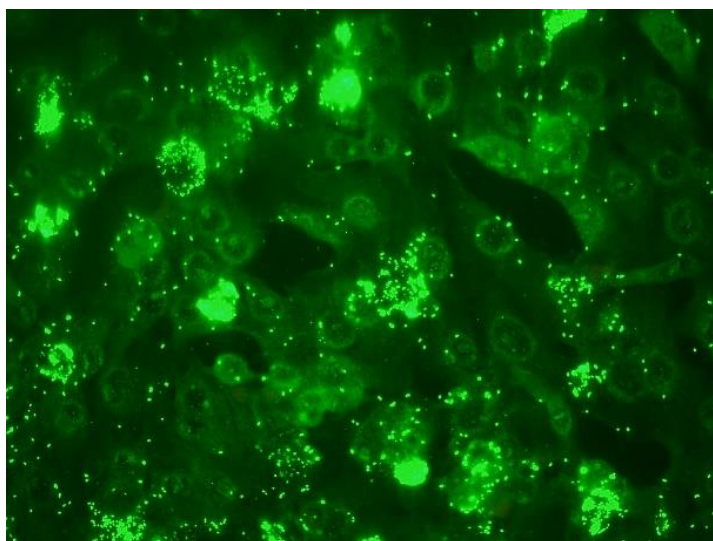


Figura 13: Imagem obtida pelo microscópio de Imunofluorescência Indireta de uma amostra positiva. (Fonte: Navarro, 2014).

2.8.2 Diagnóstico Molecular

Perante à necessidade de busca de novas ferramentas diagnósticas, devido à deficiência de diagnósticos conclusivos dos casos com clínica compatível com a FM dados pelos exames laboratoriais normalmente utilizados, como por exemplo a RIFI, o emprego da biologia molecular (Nascimento e Schumaker, 2004) foi de excepcional importância, tendo sua posterior

introdução e implementação de seus métodos, como também os recentes progressos nas técnicas laboratoriais, tanto na investigação de rickettsioses, quanto nos estudos das rickettsias.

Na detecção e identificação de rickettsias são utilizados métodos moleculares- a PCR, sendo possível assim, a análise de polimorfismos de fragmentos de restrição e sequenciamento, através da amplificação de ínfimas quantidades de DNA rickettsiano de sangue, tecido ou mesmo de ectoparasitos coletados dos pacientes ou ambiente (La Scola e Raoult, 1997). (Figura 14).

Segundo Azad (1990), a PCR proporciona ensaios rápidos, sensíveis e altamente específico para detecção de rickettsias. Além do mais, esta técnica comporta a posterior realização do sequenciamento de nucleotídeos do gene amplificado. Sendo assim, a identificação molecular adjunta ao sequenciamento tornaram-se o método de eleição para precoce identificação e análise filogenética das diferentes espécies de rickettsias (Regnery *et al.*, 1991; La Scola e Raoult, 1997), com fornecimento de resultado antes mesmo que haja a soroconversão.

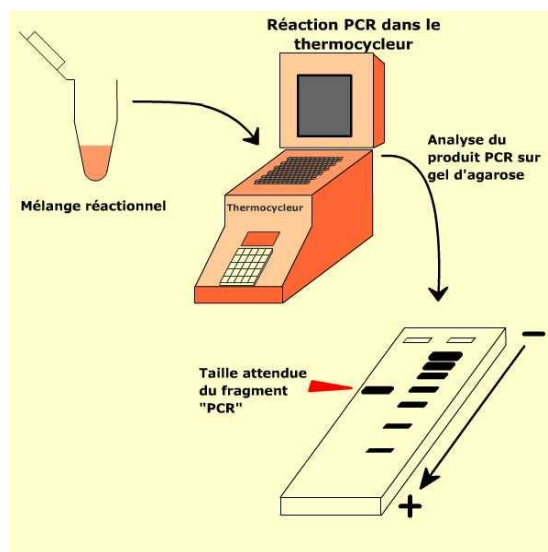


Figura 14: Técnicas de PCR e eletroforese em gel de agarose.
(Fonte: <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/PCR/images/PCR-principe.jpg>).

Ensaio moleculares tem sido de grande valia na detecção de várias novas espécies do gênero *Rickettsia* em vetores, humanos e animais, possibilitando a caracterização molecular de espécies já conhecidas como a *R. rickettsii*, como também a identificação de outras espécies como a *R. felis*, que era conhecida desde 1990, designada “ELB” e classificada como membro do GT, devido à sua reatividade sorológica com *R. typhi*; porém com a utilização de técnicas moleculares, pode-se demonstrar que há diferença gênica satisfatória entre “ELB” e a *R. felis*; desta forma, o número de casos de infecções humanas devido a este patógeno aumentou

dramaticamente nos últimos anos (Higgins *et al.*, 1996; Raoult *et al.*, 2001). Com isto, Gillespie reagrupou-a para o GTr com relação ao seu genoma, o qual é maior quando comparado com o de outras espécies de rickettsias. Tal sequência genômica apresenta plasmídeos (PRF) e o conjugativo pili, responsável pela transferência genética (Gillespie *et al.*, 2007).

É suma importância advertir que a detecção de *Rickettsia* spp. em amostras sanguíneas normalmente é rara, devido ao curto período de rickettsemia apresentada, que persiste por apenas alguns dias ou semanas e, posteriormente, o agente não mais é detectado (Burgdorfer, 1988). Em um estudo que utilizava técnicas da PCR em cães experimentalmente infectados, demonstrou-se que o período de rickettsemia somente foi possível até 10 dias após infecção (Kidd *et al.*, 2008). Outro fator que dificulta a detecção por análise molecular de *Rickettsia* spp. em amostras de sangue, é que tais bactérias colonizam células endoteliais dos vertebrados, apresentando assim, baixa rickettsemia (La Scola e Raoult, 1997).

Já a detecção de *Rickettsia* spp. por PCR em potenciais ectoparasitos vetores tem sido vastamente utilizada em inquéritos epidemiológicos ou em períodos de surtos, e a técnica baseia-se na amplificação de um segmento do genoma comum a todas as rickettsias, utilizando-se diferentes *primers* que codificam o gene de antígeno 17 KDa, e/ou o gene da enzima respiratória citrato sintase (*gltA*), responsável pela condensação do acetil-CoA com o oxalacetato para a formação do citrato no ciclo do ácido cítrico, e que 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 (Marrero e Raoult, 1989; Webb *et al.*, 1990; Regnery *et al.*, 1991; Eremeeva *et al.*, 1994; Inokuma *et al.*, 2001; Labruna *et al.*, 2004b; Guedes *et al.*, 2005; Sangioni *et al.*, 2005;).

Amplifica-se também os segmentos de genes que codificam proteínas de superfície da membrana *omp*, existentes nas rickettsias como *ompA* (rickettsias do GFM), *ompB* (rickettsias do GT e GFM). Posteriormente à amplificação, os segmentos são digeridos por enzimas de restrição e são obtidos mapas de fragmentos que são específicos para cada espécie (Marrero e Raoult, 1989).

Após a amplificação é realizada a identificação através de comparação com as bases de dados genômicos depositados no *GeneBank* (Regnery *et al.*, 1991). Contudo, deve-se atentar para possíveis resultados falsos positivos, que se originam dos muitos fatores deletérios relacionados à coleta e preservação das amostras, como a ação de enzimas que degradam a estrutura do DNA, as DNAses e do ácido ribonucleico (RNA), as RNAses, e a inibição da reação pelo íon Fe^{+2} (Galvão *et al.*, 2005).

Mesmo com a intensa utilização da biologia molecular, seus métodos e técnicas, essa ainda não são práticas de escolha para a rotina, e somente será em um futuro próximo, quando os custos dos aparelhos e reagentes forem mais acessíveis, e as condições de coleta e conservação das amostras estiverem devidamente otimizadas (Galvão *et al.*, 2005).

2.8.3 Diagnóstico Diferencial

Com o surgimento do exantema, o diagnóstico diferencial deve ser feito com as seguintes doenças: febre amarela, tifo endêmico, febre tifoide, dengue, enterovirose, caxumba, rubéola, salmonelose, pneumonia por *Mycoplasma pneumoniae*, toxoplasmose, sarampo, hepatite viral, leptospirose, malária, meningites e meningoencefalites tanto virais como bacterianas, meningococcemia estafilocócica, quadros purpúricos, histoplasmose, sepsis com coagulação intravascular disseminada (CID), mononucleose infecciosa, além de doenças auto-imunes como lúpus eritematoso sistêmico e as fármacodermias, entre outras (Veronese e Focaccia, 1996; Melles *et al.*, 1999), e mais recentemente o ebola.

Com o aumento de casos de doenças transmitidas por carrapatos, borreliose (doença de Lyme) e erlichiose devem também fazer parte do diagnóstico diferencial (Lemos, 2005).

2.9 Ocorrência e Distribuição Geográfica

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

No continente Americano (EUA, Brasil, Colômbia, Costa Rica, México, Panamá e Uruguai), a enfermidade causada por *R. rickettsii*, o bioagente mais importante da FM (Guedes *et al.*, 2005), tem recebido maior atenção das autoridades sanitárias, tanto por sua elevada mortalidade (Lemos, 1991), como também pela ocorrência de novos casos em regiões onde antes não havia relatos.

Os ixodídeos são artrópodes que possuem baixa capacidade de locomoção à grandes distâncias (Falco e Fish, 1991; Wilson *et al.*, 1972). Larvas e ninfas dispersam-se somente por poucos centímetros a partir do local de emergência (Daniels e Fish, 1990), enquanto que formas

maturas alcançam entre 2 a 10 metros partindo do local onde foram libertos (Falco e Fish, 1991; Wilson *et al.*, 1972). No entanto, esses ectoparasitos possuem altas taxas de reprodução e podem assim, serem transportados por grandes distâncias através de seus hospedeiros (Perez *et al.*, 2008), como por exemplo, os pássaros migradores que se encontram infestados, os quais funcionam como dispersores de rickettsias, fazendo-as circularem através dos continentes, causando assim, focos pontuais de infecção em zonas não endêmicas; e caso haja habituação desses artrópodes no novo espaço geográfico, pode-se então, constituir novos focos (Burgdorfer, 1975, Reháček e Tarasevich, 1991; Nice, 1994).

No Brasil, é uma doença de caráter endêmico em várias cidades dos estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, dentre outros estados. Em um trabalho realizado no município de Campinas, São Paulo, foram identificadas espécies do gênero *Rickettsia* provenientes de carrapatos das espécies *A. cajennense* e *A. dubitatum*. Estes carrapatos infestavam capivaras no Lago do Café, local muito visitado por humanos; os autores chamaram atenção para o risco zoonótico que este local apresenta (Estrada *et al.*, 2006).

Nos últimos aproximadamente 30 anos, no Brasil, múltiplos casos de FM têm sido diagnosticados na região Sudeste, mas menos de 100 casos foram confirmados e notificados, a maioria ocorrendo de agosto a dezembro. Neste mesmo período, vários outros casos suspeitos não foram confirmados, em virtude, na maioria das vezes, da indisponibilidade de exames para esta doença (Rozental, 2003).

Desde do ano de 1997, novos casos vêm sendo confirmados no estado do Rio de Janeiro, procedentes dos municípios de Barra do Piraí, Piraí e Nova Iguaçu, ampliando, assim, o número de municípios brasileiros com relato de FMB (Rozental *et al.*, 2002; Rozental, 2003).

Nas regiões de Campinas e São João da Boa Vista, São Paulo, em 1996, elaborou-se um programa de vigilância epidemiológica da FMB, objetivando o controle de sua transmissão, e a doença foi considerada de notificação compulsória somente nessas regiões (CVE, 2002).

Em Minas Gerais tem-se registrado, desde a década de 80, a ocorrência de inúmeros casos da doença na forma de epidemias em áreas rurais e peri-urbanas, com predominância nos Vales do Jequitinhonha, do Mucuri e do Rio Doce. Em 1992, foi registrada através da Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais (SES-MG), a existência de um foco peri-urbano de rickettsiose expressivo em termos de ocorrência de casos, no Município de Caratinga, localizado no Vale do Rio Doce. No período de junho a outubro de 1992, a SES-MG notificou a ocorrência de 15 óbitos nesse município, sendo que, na ocasião, a hipótese de FM como causadora dos óbitos foi baseada em critérios clínico-epidemiológicos e laboratoriais (Cardoso *et al.*, 2006).

Ainda no estado de Minas Gerais, foram reportados casos de rickettsioses do GFM no município de Coronel Fabriciano, os casos ocorreram nos meses de maio e junho de 2000. Durante este período, ocorreram dois óbitos em crianças procedentes de uma área peri-urbana conhecida como Pedreira. Os resultados sorológicos confirmaram a dificuldade no diagnóstico diferencial de pacientes com sintomas de doenças rickettsiais (Galvão *et al.*, 2003).

Estudo realizado na Mesorregião da Zona da Mata Mineira, no município de Santa Cruz do Escalvado, detectou sororreatividade positiva em roedores para rickettsias do GFM, em gambás a sororreatividade foi expressiva não somente para bactérias do GFM, mas também para *R. rickettsii*, nos equinos a sororreatividade apresentada foi para *R. bellii*, rickettsias do GFM, enquanto nos cães foi para *R. rickettsii* e *R. parkeri* (Pena, 2006).

Além do município anterior, a Zona da Mata Mineira é constituída por mais 142 municípios, deste total, 15 notificaram casos confirmados de FM, no período de 2001 a 2014 (SINAN, 2015), sendo Juiz de Fora o município que apresenta o maior número de casos, tendo sido notificados 22 neste mesmo período. Entretanto, até o ano de 1995 não haviam sido relatados casos de rickettsioses na microrregião de Juiz de Fora, quando três casos autóctones foram identificados, dos quais dois em Piau (Hallack, *et al.*, 1996). Depois disso foram identificados outros quatro casos (dois em Juiz de Fora, um em Simão Pereira e um em Piau). Porém, em um destes dois casos de Juiz de Fora, houve manifestações clínicas incomuns, pois o paciente demorou a apresentar os exantemas e desenvolveu um choque séptico acompanhado da Síndrome da Angústia Respiratória do Adulto (S.A.R.A.) e coagulação intravascular disseminada (CID), falência renal seguido de óbito após seis dias (Figura 15). Portanto, evidencia-se a importância de estar alerta à possibilidade da FMB causar tais sintomas e não só os mais vistos na clínica médica (Costa *et al.*, 2002).



Figura 15: Paciente vítima de S.A.R.A., CID, edema pulmonar difuso, exantema distribuído na fase e tronco. (Fonte: Costa *et al.*, 2002).

Dados do SINAN, fornecidos pela Coordenadoria de Epidemiologia da Gerência Regional de Saúde de Juiz de Fora, referentes ao período de 2001 a 2006, apresentam a notificação de 58 casos suspeitos de FMB, onde 55 casos residiam no município de Juiz de Fora, 1 em Piau, 1 em Ewbanck da Câmara e 1 em Muriaé. Destes casos, 8 foram confirmados, sendo que 2 foram a óbito (comunicação pessoal GRS/ Juiz de Fora, 2007).

Somando-se ao exposto acima, estudos realizados nesta mesma microrregião nos últimos dez anos por Guedes *et al.* (2005), Guedes *et al.* (2011), Pacheco *et al.* (2011), Navarro *et al.* (2014a) e Nunes *et al.* (2014) demonstram a circulação de *R. rickettsii* pelos dois primeiros estudos e *Rickettsia* sp., e *R. amblyommii* pelos dois últimos. Estes sugestivos achados ratificam a substancial importância desta região no cenário epidemiológico para FM.

Como anteriormente citado, de todos os municípios da Zona da Mata Mineira, Juiz de Fora se destaca neste contexto epidemiológico, pois possui indicadores de vulnerabilidade, como alto número de notificações do estado, com casos ocorrentes no perímetro urbano, que detém elevada densidade populacional, área de preservação, ocupação de áreas limítrofes com fragmento de mata, possibilitando o intercâmbio de artrópodes vetores com mamíferos hospedeiros, ambientes esses que propiciam a desenvolvimento e mantimento dos ciclos enzoótico e epidêmico para FM.

Além disto, este município faz parte da Bacia do Paraíba do Sul, na qual em estudos anteriores já foram encontrados potenciais vetores infectados por *R. rickettsii*, *R. bellii* e *R. felis* (*e.g.* Gehrke *et al.*, 2009 e Moura, 2011).

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

O objetivo principal deste trabalho foi investigar e mapear a relação natural entre espécies de *Rickettsia* e seus potenciais vetores, em cinco regiões de vulnerabilidade do município de Juiz de Fora, estado de Minas Gerais, Brasil.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a composição da fauna de ectoparasitos potencialmente vetores de *Rickettsia* sp. nas áreas estudadas;
- Analisar o ciclo enzoótico de *Rickettsia* sp. através da detecção desses organismos em potenciais vetores (carrapatos e pulgas), utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR);
- Caracterizar os organismos do gênero *Rickettsia* detectados na PCR através de sequenciamento dos fragmentos amplificados;
- Avaliar aspectos epidemiológicos das rickettsias circulantes, artrópodes vetores e seus hospedeiros vertebrados;

4 Material e Métodos

4.1 Área de Estudo

O município de Juiz de Fora está localizado a 21°41'20" de latitude sul e 43°20'40" de longitude oeste, a sudeste do estado de Minas Gerais, na Mesorregião Geográfica da Zona da Mata Mineira (PDDU/JF, 2004). Com posição privilegiada, o município encontra-se a apenas 283 Km da capital Belo Horizonte e 184 Km do Rio de Janeiro, importantes centros econômicos do país (PDDU/JF, 2004).

Pertencendo ao domínio morfoclimático dos mares de morros florestados como afirma Ab'Saber (2003) e tendo como área total 1.435,664 km², as médias altimétricas do município variam entre 700 a 900 m e tem seu ponto mais alto a 1.000 m de altitude próximo a Serra dos Cocais já os pontos mais baixos variam entre 650 a 750 m de altitude, correspondendo estes ao fundo do vale do rio Paraibuna (PDDU/JF, 2004).

Em decorrência dos fatores altimétricos, o clima da região é o tropical de altitude, uma derivação do tropical, porém com temperaturas mais amenas. Este tipo climático caracteriza-se por apresentar dois períodos bem definidos, sendo que um vai de outubro a abril (primavera e verão), com temperaturas mais elevadas e maiores índices pluviométricos, com as chuvas concentradas no verão, e outro que vai de maio a setembro (outono e inverno), mais frio e com menor presença de chuvas; apresentando precipitação média anual de 1.538 mm (IBGE, 2015; PDDU/JF, 2004).

Somando-se aos fatores naturais como atuação de massas de ar, relevo, altitude, etc, o clima sofre ainda a interferência de fatores antrópicos, onde pode-se citar impermeabilização do solo, poluição gerada principalmente por veículos automotores, disposição das edificações, supressão vegetacional em função do crescimento urbano, agricultura e pecuária, dentre outros.

O município de Juiz de Fora está inserido na bacia hidrográfica do rio Paraibuna (médio Paraibuna), pertencente à bacia hidrográfica do rio Paraíba do Sul, localizado na região Sudeste do País, o qual drena a área mais densamente povoada (Figura 16). A porção oeste é drenada pelo rio do Peixe e o extremo sudeste pelo rio do Cágado, ambos afluentes do rio Paraibuna (Figura 17). A área urbana é drenada por 156 sub-bacias de diversas dimensões (PDDU/JF, 2004).

Com densidade demográfica estimada de 550.710 habitantes, o espaço geográfico do município é dividido no distrito sede, composto por área urbana, zonas urbanas em expansão e zona rural, e três outros distritos compostos por núcleos urbanos e zonas rurais (PDDU/JF, 2004; IBGE, 2015). (Figura 18).



Figura 18: Espaço geográfico do município de Juiz de Fora e em destaque as áreas de estudo. (Fonte: IBGE/GeoMINAS/PJF, Oliveira, 2005).

Se inicialmente a região da Zona da Mata Mineira tinha como característica a presença de densas florestas que recobriam todo o território, daí sua denominação, atualmente a realidade é outra. Em função do processo de ocupação pelo qual passou, a vegetação original foi substituída por plantações de café, durante este ciclo econômico, o qual foi responsável pela remoção da cobertura vegetal dando lugar a Mata Estacional Semidecidual Secundária, onde o termo secundário remete ao processo sucessionário pelo qual passou a vegetação. Somando-se ao ciclo supracitado, a pecuária e atualmente o processo de expansão urbana tiveram grande importância no processo de alteração da paisagem (Silva, 2010).

4.1.1 Caracterização das Áreas de Coleta

Os espécimes foram coletados em cinco localidades distintas: Caetés, Igrejinha, Paula Lima, Torreões e Valadares. Desses, somente Igrejinha e Paula Lima pertencem área urbana do município; entretanto, em função da descontinuidade da mancha urbana, estas podem ser classificadas como áreas de expansão urbana, já as demais localidades são caracterizadas como núcleos urbanos (PDDU/JF, 2004).

As áreas investigadas guardam semelhanças morfoclimáticas e contornam as áreas que detêm um dos maiores índices de casos humanos (suspeitos, compatíveis ou confirmados) de FM e animais soropositivos para *Rickettsia* spp. do estado (Monteiro *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2008a; Pacheco *et al.*, 2011; Navarro *et al.*, 2014a); agrupando condições ecoepidemiológicas favoráveis para manutenção do ciclo das *Rickettsia* spp., como presença de fragmentos de matas, coleções hídricas e, principalmente, o convívio próximo entre humanos e animais (*e.g.* bovinos, equinos, caninos, felinos e capivaras).

Em função da economia e infraestrutura educacional pouco desenvolvidas, o movimento pendular é uma característica comum das áreas citadas.

Em sua totalidade foram realizadas 40 coletas de campo, subdivididos em dois ambientes de coleta, tendo perfis sócio-econômico-cultural diferentes, sendo um ponto que possui maior nível de antropização e uso e ocupação do solo ('ambiente 1'), e outro com características rurais ('ambiente 2'); com o propósito de se ampliar as zonas investigadas (Tabela 2).

Tabela 2: Georreferenciamento dos pontos de coletas das zonas de vulnerabilidade do município de Juiz de Fora, estado de Minas Gerais, Brasil.

Distrito	Localidades	Ambiente*	Coordenada Geográfica
Sarandira	Caetés	1	21° 48' 15.52" latitude Sul; 43° 15' 11.27" longitude Oeste
		2	21° 49' 02.86" latitude Sul; 43° 15' 54.37" longitude Oeste
Sede	Igrejinha	1	21° 42' 32.65" latitude Sul; 43° 28' 55.93" longitude Oeste
		2	21° 41' 24.54" latitude Sul; 43° 28' 13.99" longitude Oeste
	Paula Lima	1	21° 34' 40.39" latitude Sul; 43° 29' 08.86" longitude Oeste
		2	21° 36' 12.59" latitude Sul; 43° 29' 15.59" longitude Oeste
Torreões	Torreões	1	21° 51' 37.95" latitude Sul; 43° 31' 36.79" longitude Oeste
		2	21° 50' 10.33" latitude Sul; 43° 30' 43.00" longitude Oeste
Rosário de Minas	Valadares	1	21° 45' 43.75" latitude sul; 43° 36' 23.14" longitude Oeste
		2	21° 46' 38.74" latitude Sul; 43° 36' 17.42" longitude Oeste

*1= Área de maior antropização, uso e ocupação do solo; 2= área rural.

4.1.1.a Caetés

A localidade caracteriza-se por ser núcleo urbano do distrito de Sarandira, está situado a sudeste da sede municipal e liga-se à ela através de estradas vicinais pavimentadas e da BR-267.

Possui terreno relativamente plano com altitudes de aproximadamente 600 metros de altitude e áreas de várzea.

A economia ainda baseia-se na criação de gado de leite e um pequeno comercio local.

As residências são unifamiliares com moradias de até três pavimentos e no entorno são encontrados sítios e fazendas. De acordo com Foscarini-Neto (2008), a área urbanizada deverá ter um crescimento significativo tanto de suas partes urbanizadas já consolidadas, quanto com seu crescimento ao longo de sua via principal.

- **Ambiente 1:**

As coletas foram realizadas em um campo de futebol que serve como área de lazer da comunidade. Em seu entorno apesar de pouco adensado, são observadas algumas casas unifamiliares e pequenos sítios (Figura 19).

Além da presença de pessoas no local principalmente aos finais de semana, foi registrada a presença de bovinos, equinos e caninos.



Figura 19: Ambiente 1 de Caetés. (Fonte: Liliane Silva Durães, 2014).

- **Ambiente 2:**

O segundo ponto de coleta foi uma fazenda de gado de leite onde além da ordenha, são comercializados animais sendo constante o a chegada de novos exemplares.

Em decorrência da existência de uma mata no interior da propriedade, foram notadas a presença de animais silvestres (primatas). Nota-se ainda a presença de um curso d'água (Figura 20).

O deslocamento e parte das atividades da fazenda é feita com a utilização de equinos.

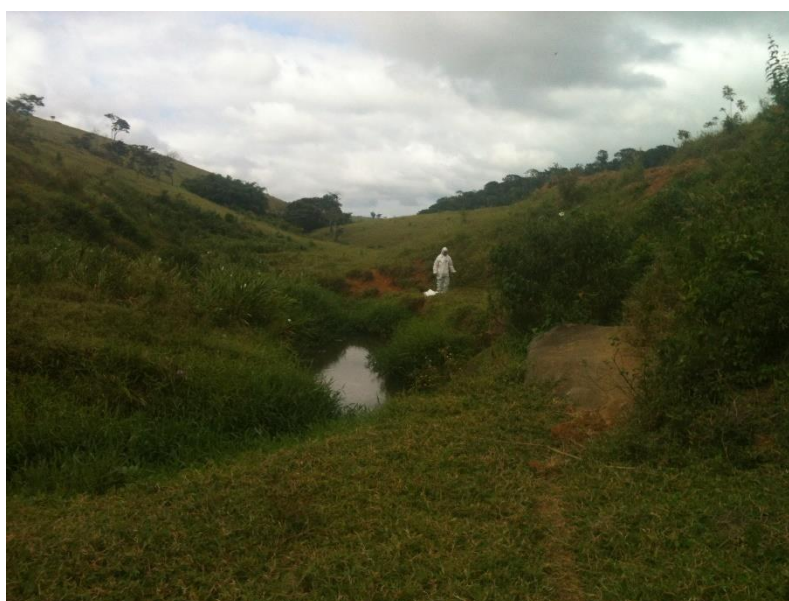


Figura 20: Ambiente 2 de Caetés. (Fonte: Liliane Silva Durães, 2014).

4.1.1.b Igrejinha

Tendo surgido a partir da construção da linha férrea, o bairro tem como característica a presença de áreas de várzea e baixas declividades, fatores estes que naturalmente favorecem a ocupação.

Apesar das condições favoráveis do relevo, a presença da BR-267 e da implantação das indústrias Paraibuna de Metais e Votorantim Metais, a região apresenta baixo crescimento urbano e populacional.

A atividade econômica é pouco expressiva na região. Além das indústrias citadas, nota-se ainda a presença de atividades agropecuárias e um pequeno comércio local pouco significativo.

Com exceção dessas indústrias, predomina na região o uso residencial com construções unifamiliares de população de baixa renda, com habitações populares. As vias apesar de asfaltadas não apresentam captação de rede pluvial.

- **Ambiente 1:**

Neste ambiente, o que destaca é a presença de um assentamento Cigano (Figura 21). Os ectoparasitos foram coletados em um campo de futebol, o qual é utilizado pela comunidade como área de lazer, principalmente aos finais de semana, pela escola pública onde são desenvolvidas atividades curriculares e pela comunidade cigana.

Dentre esses, os principais usuários da área são os Ciganos, que utilizam o espaço como área de lazer, moradia e criatório de animais como porcos, cavalos e aves para comércio. Além destes, são criados animais de estimação como cães e gatos (Figura 22).

Além do assentamento, este ambiente é delimitado pela BR 267, e por uma área utilizada como pasto para os animais do povo Cigano.



Figura 21: Ambiente 1 de Igrejinha, com parte assentamento Cigano ao fundo. (Fonte: Liliane Silva Durães, 2014).



Figura 22: Ambiente 1 de Igrejinha, em destaque os animais e o assentamento Cigano. (Fonte: Liliane Silva Durães, 2014).

- **Ambiente 2:**

Neste, os espécimes foram coletados em um condomínio fechado. O local possui residências unifamiliares destinadas a moradia e também como casas utilizadas aos finais de semana.

Dentro da área do condomínio foi construído um haras destinado a cuidados dos animais dos moradores, bem como de terceiros. Estes animais utilizam um lote vago como área de pastagem (Figura 23).

Delimitando a área de coleta foi registrada a presença de um urso d'água (Figura 24).



Figura 23: Ambiente 2 de Igrejinha. (Fonte: Liliane Silva Durães, 2014).



Figura 24: Ambiente 2 de Igrejinha, com destaque para o curso d'água (Fonte: Liliane Silva Durães, 2014).

4.1.1.c Paula Lima

Situa-se no extremo norte da área urbana do município de Juiz de Fora, localidade caracterizada pela distância da área urbana e baixa densidade demográfica.

Possui características rurais com grandes extensões produtivas de gado leiteiro, gado de corte e culturas. Estas áreas após terem sido desmembradas formaram os povoados de pequena expressão em torno da via férrea, porém os núcleos se estagnaram devido ao crescimento da cidade no extremo oposto à esta região.

Apresenta relevo com baixa declividade, além de áreas de várzea. Como atividade econômica, observam-se apenas o comércio local pouco expressivo e atividade agropecuária extensiva.

O tipo de ocupação é residencial com moradias unifamiliares de no máximo dois pavimentos. Ocorre ainda a existência de granjas e sítios no entorno do núcleo urbano.

- **Ambiente 1:**

Os potenciais vetores foram coletados em uma área de pasto sujo utilizado para manejo de bovinos e equinos (Figura 25). Apesar de não ser utilizada como área de lazer, a circulação de transeuntes é grande, em função da proximidade do local com a principal rua/ acesso da localidade. Em frente ao ambiente de coleta, existe uma casa onde são criados cerca de 30 cães retirados das ruas.

O ambiente de coleta é delimitado pela rua principal e por um curso d'água (Figura 26).



Figura 25: Ambiente 1 de Paula Lima. (Fonte: Liliane Silva Durães, 2014).



Figura 26: Ambiente 1 de Paula Lima, com destaque para o curso d'água. (Fonte: Liliane Silva Durães, 2014).

- **Ambiente 2:**

Se deu em um haras que atualmente é pouco utilizado, sendo criados cerca de seis equinos, três caninos e alguns galináceos (Figuras 27 e 28). Por este motivo, é pequeno o fluxo de pessoas, só tendo sido relatado a movimentação da família do caseiro e visitas esporádicas dos proprietários. Esses utilizam os cavalos da propriedade como meio de transporte e trabalho,

circulando com os animais dentro das dependências do haras, bem como para atividades particulares como supermercado, escola, passeios, etc.

Próximo ao haras existe uma propriedade rural destinada a criação de gado leiteiro, onde o caseiro do haras presta serviços, fazendo o deslocamento a cavalo.



Figura 27: Ambiente 2 de Paula Lima, com destaque para os animais. (Fonte: Liliâne Silva Durães, 2014).



Figura 28: Ambiente 2 de Paula Lima. (Fonte: Liliâne Silva Durães, 2014).

4.1.1.d Torreões

Este núcleo urbano encontra-se a sudoeste da sede municipal é banhado pelo Rio do Peixe e tem como um de seus principais acessos as rodovias BR-040 e MG-353.

Em função do baixo adensamento populacional, a região apresenta fragmentos do bioma Mata Atlântica. Estas características naturais têm contribuído para a exploração do turismo com destaque para o ecoturismo, praticado nos sítios e fazendas da região. A presença de restaurantes funciona como atrativos para o turismo da região.

Além do turismo, merece destaque como atividade econômica a produção de leite e comercialização de bovino criados de maneira extensiva, bem como de equinos.

A região abriga ainda fazenda escola da Universidade Presidente Antônio Carlos (UNIPAC), utilizada para aulas práticas do curso de Medicina Veterinária de manejo e clínica de grandes animais.

Em relação ao uso do solo, este é essencialmente residencial com moradias unifamiliares de até dois pavimentos.

- **Ambiente 1:**

As coletas foram realizadas no entorno de uma propriedade particular que fica as margens da rodovia MG-353, que fica em uma área de declive acentuado é cercada por fragmento de mata (Figura 29 e 30). No local é praticada agricultura de subsistência para sustento da família que toma conta da casa.

Além dos cavalos utilizados para lazer dos proprietários e deslocamento dos caseiros, são criados galináceos e leporídeos para sustento da família.



Figura 29: Ambiente 1 de Torreões, visto da rodovia.
(Fonte: Liliane Silva Durães, 2014).



Figura 30: Ambiente 1 de Torreões. (Fonte: Liliane Silva Durães, 2014).

- **Ambiente 2:**

Ocorreu em um campo de futebol desativado, hoje utilizado como pastagem para alguns exemplares de bovinos e equinos; além destes, notou-se ainda a presença de caninos (Figura 31). A área é delimitada pela presença de um córrego e de uma estrada não pavimentada sendo este o principal acesso ao local.

Apesar do ambiente de coleta pertencer a uma propriedade privada, o local é eventualmente utilizado para comemorações religiosas.



Figura 31: Ambiente 2 de Torreões. (Fonte: Liliane Silva Durães, 2014).

4.1.1.e Valadares

Este núcleo urbano pertence ao distrito de Rosário de Minas e situado a noroeste da sede municipal; é banhado pelo rio do Peixe e o acesso é feito pela BR-267.

Sua economia está atrelada ao meio rural, merecendo destaque a criação de gado de leite e a criação de aves. O comércio local é pouco expressivo destinado a atender as necessidades básicas da comunidade.

As residências são unifamiliares com até dois pavimentos.

- **Ambiente 1:**

Os espécimes foram coletados em um campo de futebol destinado ao lazer da comunidade, e por ser a única área de lazer da comunidade, é intensa a presença e pessoas sobretudo crianças e jovens.

A área é cercada pela BR-267 e pela principal rua de acesso ao núcleo urbano, além de residências unifamiliares de até dois pavimentos

Apesar de não ser este o principal uso, é frequente a utilização do gramado como pastagem de equinos e bovinos (Figura 32 e 33).



Figura 32: Ambiente 1 de Valadares, com destaque para os animais. (Fonte: Liliane Silva Durães, 2014).



Figura 33: Ambiente 1 de Valadares. (Fonte: Liliane Silva Durães, 2014).

- **Ambiente 2:**

As coletas foram realizadas em uma fazenda de gado leiteiro. A área da fazenda é dividida entre a criação e plantações de milho destinadas a alimentação dos animais.

Equinos existentes são utilizados no manejo dos bovinos e no deslocamento no interior da propriedade, e os cães para fazer a segurança da mesma.

Em função da proximidade com um fragmento de Mata Atlântica e da presença do Rio do Peixe cortando a fazenda, é comum a presença de animais silvestres como as capivaras.

Os espécimes foram coletados em um dos pastos, o qual é adjacente ao rio (Figura 34), local onde foram encontrados carcaças e vestígios dos roedores (Figura 35).



Figura 34: Ambiente 2 de Valadares, com destaque o rio do Peixe ao fundo. (Fonte: Liliane Silva Durães, 2014).



Figura 35: Ambiente 2 de Valadares, com destaque para os vestígios de excrementos de capivara. (Fonte: Liliane Silva Durães, 2014).

4.2 Coletas de Potenciais Vetores de *Rickettsia* sp.

As coletas foram realizadas entre o período de julho de 2013 a junho de 2014, em duas zonas de expansão urbana (Igrejinha e Paula Lima) do distrito sede e nos núcleos urbanos de Caetés, Torreões e Valadares, nos três distritos restantes.

O cronograma foi estabelecido de forma a cobrir a variação sazonal da população de artrópodes vetores, sendo efetuadas no pico das quatro estações climáticas, caracterizadas por apresentarem períodos de estiagem entre outono e inverno, e período chuvoso entre primavera e verão.

As coletas nos hospedeiros (caninos, bovinos e equinos) foram realizadas em conjunto com a equipe de saúde da Secretaria Municipal de Saúde de Juiz de Fora, durante a campanha de vacinação antirrábica; enquanto que no animal silvestre (capivara), o mesmo foi encontrado morto. Os potenciais vetores foram detectados através de inspeção visual e manual; as pulgas foram coletadas com auxílio de pinças, enquanto os carrapatos, a técnica de obtenção se deu por torção em torno do próprio eixo longitudinal do idiossoma, também com auxílio de pinça (Figura 36).

Já as coletas em ambiente seguiram a metodologia que faz uso da técnica da armadilha de gás carbônico (CO₂) (Cançado *et al.*, 2006; Cançado, 2008) (Figura 37); somando-se a essa, as coletas também foram realizadas por meio da técnica do arrasto de flanela (Oliveira, 1998; Oliveira *et al.*, 2000) (Figura 38).



Figura 36: Coleta de potenciais vetores em hospedeiro vertebrado. (Fonte: Liliane Silva Durães, 2014).

Os artrópodes capturados foram acondicionados em tubos plásticos estéreis contendo álcool isopropílico (Figura 39), e encaminhados à diagnose específica.



Figura 37: Coleta de vetores no ambiente, pela técnica da armadilha de CO₂. (Fonte: Liliane Silva Durães, 2014).



Figura 38: Coleta de vetores no ambiente, pela técnica do arrasto de flanela. (Fonte: Liliane Silva Durães, 2014).



Figura 39: Acondicionamento de vetores. (Fonte: Liliane Silva Durães, 2014).

4.2.1 Esforço Amostral

O tempo de coleta no ambiente foi protocolado em 2 h para garantir a regularidade do experimento com o mesmo esforço amostral em todas as coletas.

A equipe era constituída por dois membros, com isso o tempo de esforço amostral por ambiente foi de 4 h, como cada uma das cinco localidades foram subdivididas em dois

ambientes, tem-se 8 h de esforço por localidade. Levando-se em conta que foram realizadas coletas nas quatro estações climáticas, tem-se 32h por localidade, totalizando 160 h de esforço de captura nas 40 coletas realizadas.

Nos hospedeiros vertebrados, totalizando de 33 animais (caninos, equinos, bovinos e capivaras) o tempo médio no esforço de captura foi de 5 min por animal, totalizando 3 h e 15 min.

Dessa forma, o esforço amostral nesse estudo foi de 163 h e 15 min.

4.2.1.a Armadilha de CO₂

Segundo a metodologia desenvolvida por Butler *et al.*, (1984), a armadilha de CO₂ dá-se através da reação química entre Carbonato de Cálcio (CaCO₃) com ácido láctico (C₃H₆O₃), em uma dinâmica onde a primeira substância, o ácido, goteja sobre a segunda, o sal, resultando em CO₂, que é a substância atrativa para carrapatos, pois mimetiza a respiração dos hospedeiros.

Para confecção da armadilha, foram utilizadas duas vasilhas plásticas de aproximadamente 1L de volume (7 cm de altura X 13,5 cm de diâmetro), as quais foram sobrepostas e unidas entre si pelo fundo perfurado centralmente da vasilha superior e tampa da inferior, que também continha perfuração central para o perfeito encaixe de um microtubo de plástico de 0,5 mL, sem tampa e com um pequeno orifício realizado com agulha (25x7), precisamente fixado nas perfurações supracitadas, funcionando como conector entre as vasilhas, permitindo assim, o gotejamento da vasilha superior (C₃H₆O₃) e sobre a inferior (CaCO₃), onde se dá a reação, e a posterior liberação do produto desta, o CO₂, que é lentamente eliminado por perfurações de 5 mm de diâmetro em sua lateral, e a 5mm de distância da tampa (Figura 40). Tal armadilha foi posta sobre uma flanela branca de 1 m², para melhor visualização e captura do ixodídeos (Cançado, 2008).

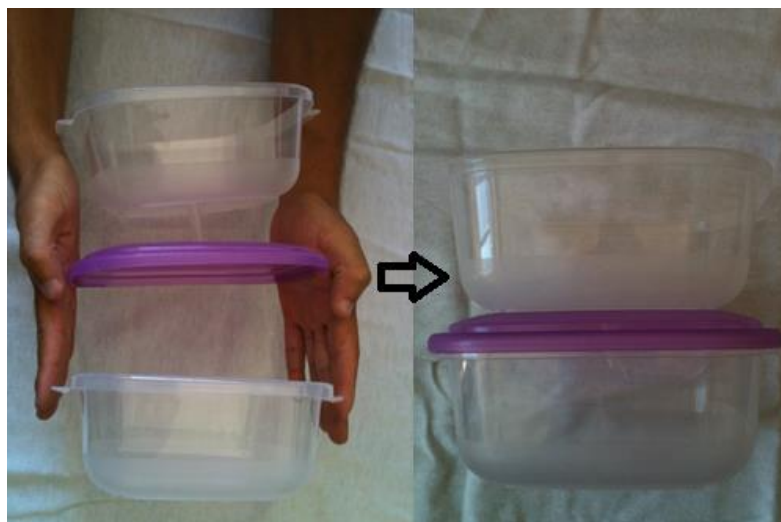


Figura 40: Confeção da armadilha de CO_2 . (Fonte: Liliane Silva Durães, 2014).

Para utilização da armadilha, foram utilizados 500 mL de solução aquosa de ácido láctico à 20% e 300g de Carbonato de Cálcio (Figura 41). Esta quantidade foi suficiente para manter a reação química por, no mínimo, duas horas. O gotejamento com velocidade de aproximadamente 4 mL/min de ácido láctico controla a velocidade da reação e mantém um fluxo contínuo de CO_2 .



Figura 41: Conta da diluição do ácido láctico; pesagem do carbonato de cálcio, respectivamente. (Fonte: Liliane Silva Durães, 2014).

4.2.1.b Arrasto de Flanela

No presente estudo, foi utilizado uma adaptação da confecção do equipamento desenvolvido por Oliveira (1998) e Oliveira *et al.*, (2000); e fez-se uso de flanela branca com

dimensões de 1,50 m de comprimento por 0,80 m de largura, a qual foi fixada por grampos de metal em duas hastes de madeira de 1,20 m cada, disposta em cada extremidade, afim de se manter a flanela distendida e o mais próximo possível da vegetação.

Para melhor tração do arrasto, foi-se fixado às extremidades de uma das hastes um cordão de *nylon* de 2,5 m de comprimento (Figura 42).

O arrasto de flanela foi utilizado em locais com vegetação do tipo herbácea (gramíneas, leguminosas, compostas e outras forrageiras), como também em áreas de pasto ou peridomicílio. Para se obter uma maior área de abrangência, foi pré-estabelecida uma rota a ser percorrida (Figura 43), e a inspeção da flanela era realizada a cada 5 m.

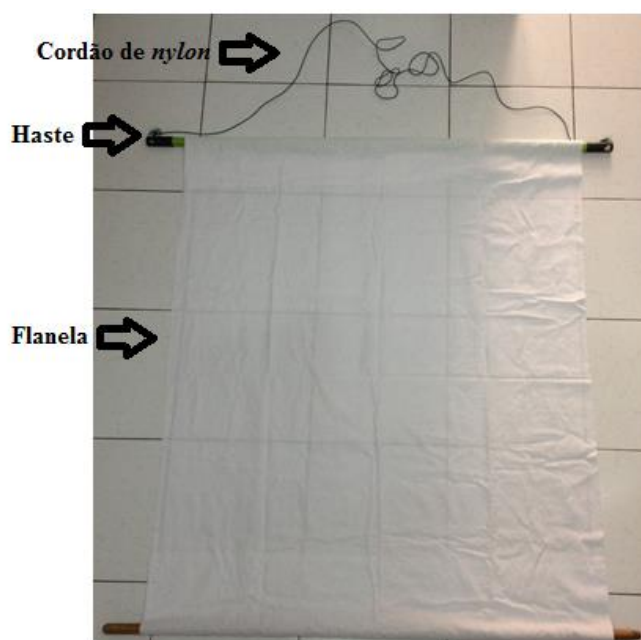


Figura 42: Arrasto de flanela, adaptado.
(Fonte: Liliane Silva Durães, 2014).

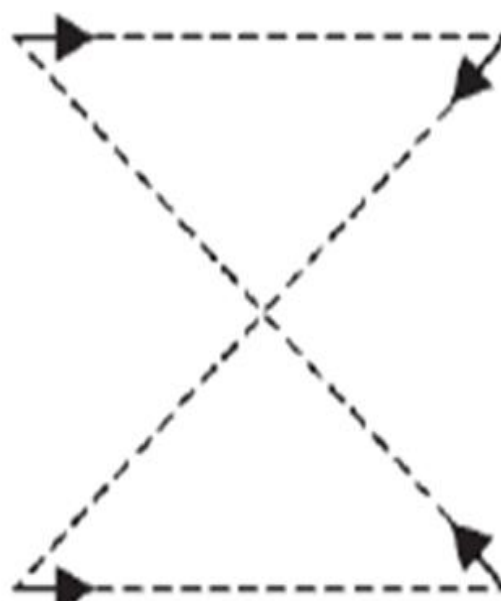


Figura 43: Esquema da rota percorrida.
(Fonte: Oliveira *et al.*, 2000).

4.3 Identificação Taxonômica dos Artrópodes

Os ectoparasitos foram identificados no Laboratório de Microscopia do Programa de Pós Graduação em Comportamento e Biologia Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora, com o auxílio de um microscópio estereoscópio com iluminação incidente, seguindo as chaves dicotômicas: Aragão e Fonseca (1961) e Onofrio *et al.* (2006) para ixodídeos adultos, Martins *et al.* (2010) para ninfas de carrapatos e Amorim e Serra-Freire (1999) para larvas desses artrópodes. Sifonápteros foram identificados segundo Bicho e Ribeiro (1998), (Figura 44).



Figura 44: Identificação dos artrópodes.(Fonte: Liliâne Silva Durães, 2014).

Após o processo de identificação dos vetores, os espécimes foram agrupados em alíquotas de acordo com o estágio de desenvolvimento (adulto, larva e ninfa), animal ou vegetação de origem e mantidas a -20°C , e posteriormente encaminhados para extração total de DNA genômico (DNAg).

4.4 Pesquisa Molecular do Bioagente

Os ixodídeos e sifonápteros foram processados individualmente ou reunidos em alíquotas (adultos de todas as espécies foram processados individualmente, ninfas em alíquotas que variaram de 1 a 10 artrópodes, dependendo do montante disponível, enquanto as larvas em lotes de 12 a 50 espécimes) de acordo com sexo, estágio de desenvolvimento, vegetação de origem, processo de ingurgitamento, e hospedeiro.

As amostras dos espécimes vetores foram submetidos à extração de DNAg, amplificação de fragmentos desse e análise dos produtos da PCR. O sequenciamento do DNAg foi realizado para caracterizar as cepas e/ou espécies de *Rickettsia*.

4.4.1 Extração do DNAg

A etapa de extração foi realizada no Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses (LIRN) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, estado do Rio de Janeiro), e o DNAg foi obtido através da técnica de extração por NaCl (Aljanabi e Martinez, 1997), com posterior armazenamento à -20°C .

Os ectoparasitos foram triturados em banho de nitrogênio líquido e ressuspensos em volume máximo de 400 μL de Buffer A (NaCl 0,4 M; EDTA 2 mM pH 8,0; Tris HCl 10 mM pH 8,0), em seguida foi adicionado 40 μL SDS 2% e 8 μL de Proteinase K (Invitrogen™) (20 mg/mL) - Promega, Madison, EUA- e homogeneizada por 15 s, para posterior incubação em banho-maria a $55-56^{\circ}\text{C}$ por 1 h. Após incubação, à mistura foi acrescentada 300 μL de NaCl 6 M, que novamente foi homogeneizada por 30 s, com posterior centrifugação a 10.000 rpm por 30 min à 4°C . Após esta etapa, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e precipitado com igual volume (600 μL) de álcool isopropílico por 1 h à -20°C ; com posterior centrifugação a 10.000 rpm por 10 min à 4°C ; sendo desprezado o sobrenadante (aproximadamente 600 μL), e adicionado igual volume de Etanol 70°GL para lavagem do *pellet*; para uma nova centrifugação a 10.00 rpm por 10 min à 4°C . Desprezou-se novamente o sobrenadante do microtubo, deixando-o invertido sobre papel toalha para secar por 30 min, aproximadamente; em seguida o *pellet* foi ressuspensado em 25 μL de água Milli-Q, com posterior homogeneização manual. Os microtubos contendo o DNAg extraído, foram armazenados a -20°C até sua utilização.

Após a extração, amostras escolhidas randomicamente foram encaminhadas à quantificação do DNAg em espectrofotômetro GeneQuant (Amersham Pharmacia Biotech, Cambrigde, Londres), para avaliar a qualidade do DNA extraído.

4.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Todas as amostras de DNAg de ectoparasitos foram submetidas a reações de PCR utilizando dois *primers*: um par gênero-específico (*gltA*), RpCS2-78 *forward* (*f*) e RpCS2-323 *reverse* (*r*), para detecção de *Rickettsia* sp. (Regnery *et al.*, 1991); e um par grupo-específico (*ompA*), Rr190.70*f* e Rr190.701*r*, para detecção de *Rickettsia* do GFM (Regnery *et al.*, 1991; Roux *et al.*, 1996) (Tabela 3). Como controle positivo, de cada reação de PCR, utilizou-se

DNAg de *Rickettsia parkeri* (GFM, patogênica), e como negativo foi utilizado água estéril. O preparo das soluções e as condições da PCR foram adequados para cada tipo de gene pesquisado (e.g. Azad *et al.*, 1990; Regnery *et al.*, 1991; Eremeeva *et al.*, 1994; Roux *et al.*, 1996; Labruna *et al.*, 2004a).

Tabela 3: Primers utilizados para identificação genotípica de espécies de *Rickettsia*.

Genes	Primers	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Fragmento amplificado (pb)
<i>ompA</i>	Rr 190.70 forward	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA	631
	Rr 190.701reverse	GTTCCGTTAATGGCAGCATCT	
<i>gltA</i>	Rp CS2-78forward	GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT	401
	Rp CS2-323reverse	GCTTCCTTAAATTCATAAATCAGGAT	

Fonte: Regnery *et al.*, 1991; Roux *et al.*, 1996.

Cada reação de PCR (25 µL de volume final) foi realizada adicionando-se 2 µL da amostra de DNAg a 17 µL de água milli-Q, 2,5 µL de Buffer, 1 µL de Cloreto de Magnésio (MgCl₂ -50 mM), 0,5 µL de dNTPs (10 mM), 0,75 µL de primers *f* e 0,75 µL de primers *r*, e por fim foi adicionado 0,5 µL de *Taq* DNA polimerase (Fermentas, Vilnius County, Lituânia). As amostras foram levadas ao termociclador conforme as condições descritas para cada gene (Tabela 4).

Tabela 4: Ciclos e condições da Reação em Cadeira da Polimerase (PCR).

Etapas	<i>gltA</i>	<i>ompA</i>
Desnaturação Inicial	95°C por 3 minutos	95°C por 5 minutos
Número de Ciclos	25 de:	35 de:
	Desnaturação à 95°C por 15 segundos	Desnaturação à 95°C por 40 segundos
	Anelamento à 48°C por 30 segundos	Anelamento à 58°C por 30 segundos
	Extensão à 72°C por 30 segundos	Extensão à 65°C por 45 segundos
Extensão Final	72°C por 7 minutos	72°C por 10 minutos

Para a visualização dos fragmentos de DNAg amplificados na reação de PCR, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2% (100 mL de TAE 1X; 2 g de agarose UltraPure™ Agarose Invitrogen™) à 89 Volts durante 60 min (Figura 45).

Posteriormente foram coradas com brometo de etídio e observadas em *scanner* de gel com luz de ultravioleta (Sambrook e Russel, 2001).

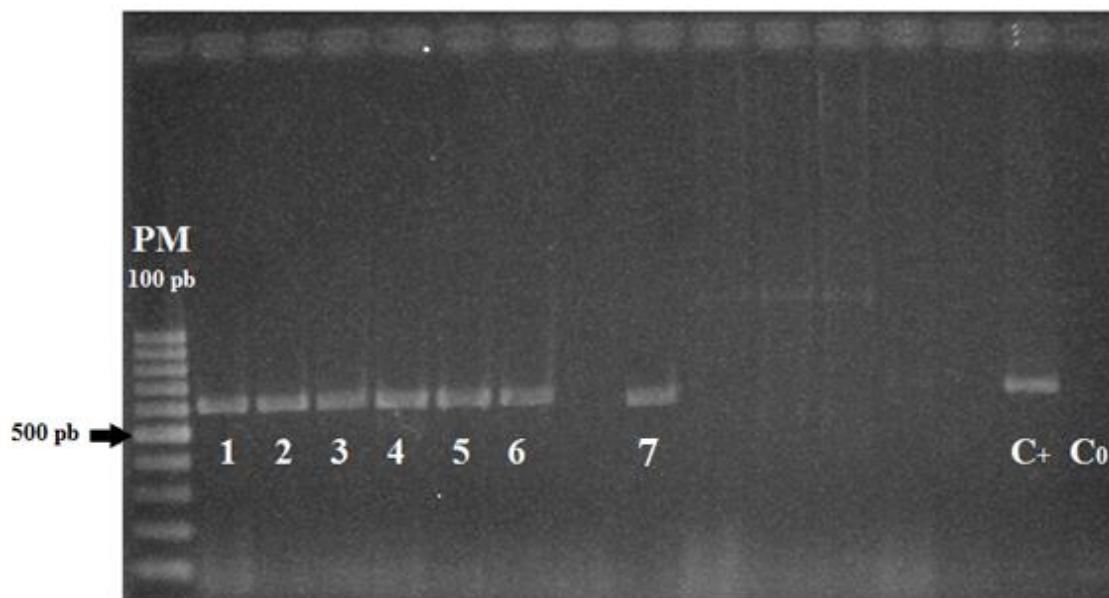


Figura 45: Gel de agarose da PCR para fragmento do gene *ompA* (631pb). PM: Peso Molecular de 100pb; 1: 550; 2: 551A; 3: 551B; 4: 551C; 5: 551D; 6: 552A; 7: 5517A; C+: Controle positivo; C0: Controle negativo. (Fonte: Liliane Silva Durães, 2014).

Todos os produtos da PCR (amplicons) obtidos correspondendo ao tamanho de DNAg esperado, para cada gene, foram selecionados para purificação e sequenciamento.

4.5 Frequência Mínima de Vetores Infectados (FMVI)

Este cálculo permite inferir, com segurança, a FMVI de uma dada espécie em uma determinada área. A FMVI para cada espécie foi calculada utilizando como base os resultados sobre a infecção dos vetores obtidos por PCR, empregando a fórmula segundo Burket *et al.* (1998):

$$FMVI = \frac{\text{n}^\circ \text{ de amostras positivas para cada espécie}}{\text{n}^\circ \text{ total de vetores de cada espécie}} \times 100$$

4.6 Purificação e Sequenciamento de DNAg

Como preparação para o sequenciamento de DNAg, os amplicons que corresponderam ao tamanho de produto amplificado esperado, para cada gene analisado, foram purificados utilizando o *kit* NucleoSpin Extract II (Macherey Nagel, Duren, Colonia, Germany), de acordo com as recomendações do fabricante.

O sequenciamento do DNAg foi realizado na Plataforma de Sequenciamento de DNA (PDTIS- Redes de Plataformas Tecnológicas), do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) da FIOCRUZ.

As amostras foram submetidas a reações de sequenciamento utilizando o *kit* BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Carlsbad, California, U.S.A.), de acordo com as recomendações do fabricante. Foram empregados os mesmos *primers* (à 3,2 pmol) utilizados na PCR, para determinação das sequências em ambas as direções (3'-5' e 5'-3'). Posteriormente, as amostras foram precipitadas, ressuspendidas em formamida e aplicadas em sequenciador automático ABI 3730xl (Applied Biosystems, Carlsbad, California, U.S.A.).

As sequencias obtidas, para cada gene, serão depositadas no *GenBank*.

4.7 Análises das Sequências

Inicialmente, as sequências adquiridas para cada gene foram editadas no programa Chromas Pro 1.5 (Technelysium, Queensland, Australia).

As sequencias de nucleotídeos obtidas no atual trabalho foram identificadas por avaliação de similaridade, através de análise comparativa com as sequências depositadas no banco de dados do *GenBank*, com auxílio do programa BLASTN (Nacional Center For Biotechnology Information, 2015).

Posteriormente, as sequências de cada gene foram alinhadas, com sequências de espécies de rickettsias depositadas no banco de dados *GenBank*, utilizando o algoritmo ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) disponível no programa MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). Todos os alinhamentos foram inspecionados manualmente. Foi criado um arquivo com o alinhamento de cada gene analisado.

4.8 Análise Filogenética

Para a análise filogenética foram construídos filodendogramas, através do método de Distância (*Neighbor-Joining*) e Máxima Parcimônia, no programa MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). O cálculo de distância foi realizado através do algoritmo Kimura 2 parâmetros. Os valores de suporte dos ramos internos das árvores filogenéticas foram estimados utilizando o teste de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) com 1.000 réplicas.

Para análise das sequências do *gltA* de *Rickettsia* sp., foram empregadas as sequências de *R. africae* (nº de acesso *GenBank* U59733), *R. sibirica* (nº de acesso *GenBank* U59734), *R. parkeri* (nº de acesso *GenBank* U59732), *R. japonica* (nº de acesso *GenBank* U59724), *R. slovacica* (nº de acesso *GenBank* U59725), *R. aeschlimannii* (nº de acesso *GenBank* DQ235776), *R. conorii* (nº de acesso *GenBank* U59730), *Rickettsia peacockii* (nº de acesso *GenBank* DQ100162), *Rickettsia rhipicephali* (nº de acesso *GenBank* U59721), *R. massiliae* (nº de acesso *GenBank* U59719), *R. rickettsii* (nº de acesso *GenBank* CP000848), *Rickettsia monacensis* (nº de acesso *GenBank* DQ100163), *R. felis* (nº de acesso *GenBank* CP000053), *R. australis* (nº de acesso *GenBank* U59718), *R. akari* (nº de acesso *GenBank* U59717), *R. prowazekii* (nº de acesso *GenBank* U59715), *R. typhi* (nº de acesso *GenBank* U59714) e *R. bellii* (nº de acesso *GenBank* U59716). Como grupo externo foram usadas sequências de *gltA* de *Ehrlichia canis* (nº de acesso *GenBank* AY647155.1) e *Anaplasma marginale* (nº de acesso *GenBank* CP001079).

Já para análise das sequências do *ompA* de *Rickettsia* GFM, foram empregadas as sequências de *R. felis* (nºs de acesso *GenBank* DQ408668, AF191026, EU012496, AY727036 e AY394853), *R. massiliae* (nº de acesso *GenBank* U43793), *R. rhipicephali* (nº de acesso *GenBank* U43803), *R. aeschlimannii* (nº de acesso *GenBank* DQ379980), *R. japonica* (nº de acesso *GenBank* U43795), *R. conorii* (nº de acesso *GenBank* U43794), *R. slovacica* (nº de acesso *GenBank* U43808), *R. rickettsii* (nº de acesso *GenBank* U43804), *R. sibirica* (nº de acesso *GenBank* U43807), *R. parkeri* (nº de acesso *GenBank* U43802) e *R. africae* (nº de acesso *GenBank* HQ335137). Como grupo externo foi utilizada sequência desse gene de *R. akari* (nº de acesso *GenBank* L01461).

5. Resultados

Foram coletados 12.692 espécimes de artrópodes potenciais vetores de FM, sendo um total de 12.502 no ambiente, entre carrapatos das espécies *A. cajennense*, *Dermacentor nitens*, *R. microplus*; já nos hospedeiros encontrou-se um total de 190 ectoparasitas, entre carrapatos de *A. cajennense*, *A. dubitatum*, *R. microplus*, *R. sanguineus* e *D. nitens* e pulgas das espécies *C. canis* e *C. felis*.

A espécie mais predominantemente encontrada foi *A. cajennense* em todas as áreas investigadas. (Tabela 5).

Tabela 5: Potenciais vetores de *Rickettsia* coletados em áreas de vulnerabilidade do município de Juiz de Fora, no estado de Minas Gerais, Brasil; no período de julho de 2013 a junho de 2014.

	ÁREAS DE VULNERABILIDADE	HOSPEDEIRO (n)	ESPÉCIE	ARTRÓPODES				Total	
				M	F	N	L		
Caetés	Ambiente 1	Livre no ambiente	<i>Amblyomma cajennense</i>	0	0	9	473	482	
			<i>Rhipicephalus microplus</i>	0	1	0	0	1	
			Sub Total	0	1	9	473	483	
	Ambiente 2	Livre no ambiente	<i>Amblyomma cajennense</i>	0	2	11	1511	1524	
			<i>Rhipicephalus microplus</i>	1	0	0	0	1	
			Sub Total	1	2	11	1511	1525	
Igrejinha	Ambiente 1	Livre no ambiente	<i>Amblyomma cajennense</i>	5	0	226	1809	2040	
			<i>Canis familiaris</i> (11)	<i>Amblyomma cajennense</i>	0	3	5	0	8
				<i>Dermacentor nitens</i>	0	0	2	0	2
				<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	17	10	4	0	31
				<i>Ctenocephalides canis</i>	1	4	0	0	5
	Sub Total	23	17	231	1809	2086			
	Ambiente 2	Livre no ambiente	<i>Amblyomma cajennense</i>	18	16	195	2138	2367	
			<i>Canis familiaris</i> (1)	0	0	7	0	7	
			<i>Equus caballus</i> (1)	0	0	16	0	16	
			Sub Total	18	16	218	2138	2390	
Paula Lima			Ambiente 1	Livre no ambiente	<i>Amblyomma cajennense</i>	5	2	121	903
	<i>Canis familiaris</i> (7)	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>			11	15	0	0	26
		<i>Ctenocephalides canis</i>			3	10	0	0	13
		<i>Ctenocephalides felis</i>			3	4	0	0	7
		Sub Total			22	31	121	903	1077
	Ambiente 2	Livre no ambiente	<i>Amblyomma cajennense</i>	5	1	160	1004	1170	
			<i>Dermacentor nitens</i>	0	1	1	0	2	
			<i>Equus caballus</i> (2)	2	7	0	3	12	
			<i>Rhipicephalus microplus</i>	1	0	0	0	1	
			<i>Dermacentor nitens</i>	0	6	0	0	6	
Sub Total	8	15	161	1007	1191				
To	Ambiente 1	Livre no ambiente	<i>Amblyomma cajennense</i>	5	2	296	257	560	
			<i>Canis familiaris</i> (7)	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	2	2	1	0	5

			<i>Ctenocephalides canis</i>	7	8	0	0	15
			<i>Ctenocephalides felis</i>	0	2	0	0	2
			Sub Total	14	14	297	257	582
Valadares	Ambiente 2	Livre no ambiente	<i>Amblyomma cajennense</i>	0	0	1	1141	1142
		<i>Equus caballus</i> (1)	<i>Dermacentor nitens</i>	0	2	8	0	10
			Sub Total	0	2	9	1141	1152
	Ambiente 1	Livre no ambiente	<i>Amblyomma cajennense</i>	0	0	38	800	838
			Sub Total	0	0	38	800	838
	Ambiente 2	Livre no ambiente	<i>Amblyomma cajennense</i>	0	0	3	1339	1342
		<i>Rhipicephalus microplus</i>	1	1	0	0	2	
<i>Bos taurus</i> (1)		<i>Rhipicephalus microplus</i>	0	4	0	0	4	
<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> (2)		<i>Amblyomma dubitatum</i>	6	11	3	0	20	
		Sub Total	7	16	6	1339	1368	
TOTAL				91	115	1108	11378	12692

A flutuação sazonal evidenciou o predomínio de larvas ao longo do ano, com pico de ocorrência no período do outono para larvas, inverno para ninfas e verão/inverno para adultos. (Tabela 6).

Tabela 6: Flutuação populacional de potenciais vetores de Febre Maculosa, segundo estágio e estação do ano, coletados em ambientes de vulnerabilidade do município de Juiz de Fora, estado de Minas Gerais, Brasil; no período de julho de 2013 a junho de 2014.

Estádios \ Estações	Estações				
	Inverno	Primavera	Verão	Outono	Total
Larvas	1.289	1.850	2.261	5978	11.378
Ninfas	865	199	24	19	1.107
Machos	38	16	36	3	93
Fêmeas	50	15	45	4	114
Total	2.242	2.080	2.366	6.004	12.692

Do total de vetores coletados, 2.379, distribuídos em 249 amostras foram pesquisados para a presença dos genes *gltA* e *ompA* de rickettsia (tabela 7), resultando em 29 (11,65%) amostras positivas, sendo 16 amostras para *gltA* (tabela 8), 13 para *ompA* (tabela 9), e deste total 5 amostras foram positivas para ambos os genes.

A exceção de Caetés, as demais localidades apresentaram amostras positivas, destacando-se *C. canis* e *A. cajennense* como as espécies mais vezes encontrada positiva.

Tabela 7: Identificação de genes rickettsiais em potenciais vetores de *Rickettsia* sp., coletados em áreas de vulnerabilidade do município de Juiz de Fora, estado de Minas Gerais, Brasil; no período de julho de 2013 a junho de 2014.

Hospedeiro (n)	Artrópodes						Amostras			
	Espécie	M	F	N	L	Total	N*	gltA	ompA	
Caetés 1	Livre no ambiente	<i>A. cajennense</i>	0	0	6	160	166	-	-	
		<i>R. microplus</i>	0	1	0	0	1	9	-	-
Caetés 2	Livre no ambiente	<i>A. cajennense</i>	1	0	6	300	307	-	-	
		<i>R. microplus</i>	1	0	0	0	1	16	-	-
Igrejinha 1	Livre no ambiente	<i>A. cajennense</i>	1	2	118	180	301	24	-	+
		<i>A. cajennense</i>	0	2	6	0	8		-	+
	Cão (11)	<i>R. sanguineus</i>	9	7	2	0	18	29	+	-
		<i>D. nitens</i>	0	0	1	0	1		-	-
<i>C. canis</i>	1	3	0	0	4		+	+		
Igrejinha 2	Livre no ambiente	<i>A. cajennense</i>	7	7	75	122	211	27	+	+
	Cão (1)	<i>A. cajennense</i>	0	0	4	0	4	3	-	+
		<i>A. cajennense</i>	0	0	5	0	5	5	-	-
P. Lima 1	Livre no ambiente	<i>A. cajennense</i>	3	1	41	240	285	18	-	-
		<i>R. sanguineus</i>	5	6	0	0	11		-	-
	Cão (7)	<i>C. canis</i>	1	1	0	0	2	15	+	+
		<i>C. felis</i>	1	1	0	0	2		+	+
P. Lima 2	Livre no ambiente	<i>A. cajennense</i>	3	1	70	133	207	17	-	-
		<i>D. nitens</i>	0	1	1	0	2		-	-
	Equino (2)	<i>A. cajennense</i>	2	4	0	0	6		-	-
		<i>D. nitens</i>	0	2	0	0	2	9	-	-
<i>R. microplus</i>	1	0	0	0	1		-	-		
Torreões1	Livre no ambiente	<i>A. cajennense</i>	3	2	75	50	130	14	-	-
		<i>R. sanguineus</i>	1	2	1	0	4		-	-
	Cão (7)	<i>C. canis</i>	5	5	0	0	10	16	+	+
		<i>C. felis</i>	0	2	0	0	2		-	-
Torreões 2	Livre no ambiente	<i>A. cajennense</i>	0	0	1	260	261	11	-	-
	Equino (1)	<i>D. nitens</i>	0	1	3	0	4	4	-	-
Valadares 1	Livre no ambiente	<i>A. cajennense</i>	0	0	21	175	196	11	-	+

Valadares2	Livre no ambiente	<i>A. cajennense</i>	0	0	4	210	214	12	-	-
		<i>R. microplus</i>	1	1	0	0	2		-	-
	Bovino (1)	<i>R. microplus</i>	0	2	0	0	2	2	-	-
	Capivara (1)	<i>A. dubitatum</i>	3	3	3	0	9	7	+	-

M: macho; F: fêmea; N: ninfa e L: larva, número de espécimes que foram submetidos à extração do DNA; (n): número de hospedeiros examinados para coleta de vetores; N*: números de amostras compostas para as análises utilizando Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR); gltA: resultado da PCR, utilizando o primer CS2; ompA: resultado da PCR para o primer 190 Kilodalton.

Tabela 8: Vetores de rickettsias positivos para o gene *gltA*, em áreas de vulnerabilidade do município de Juiz de Fora, estado de Minas Gerais, Brasil; no período de julho de 2013 a junho de 2014.

Código da Amostra	Ambiente/hospedeiro	Vetor	Localidade
547 A	Canino	♀ <i>C. canis</i>	Torreões 1
548 A	Canino	♂ <i>C. canis</i>	Torreões 1
548 E	Canino	♀ <i>C. canis</i>	Torreões 1
549 A	Canino	♂ <i>C. canis</i>	Torreões 1
549 B	Canino	♀ <i>C. canis</i>	Torreões 1
551 A	Canino	♂ <i>C. canis</i>	Paula Lima 1
551 B	Canino	♂ <i>C. felis</i>	Paula Lima 1
551 C	Canino	♀ <i>C. canis</i>	Paula Lima 1
552 A	Canino	♀ <i>C. canis</i>	Igrejinha 1
552 B	Canino	♂ <i>C. canis</i>	Igrejinha 1
5483 B	Capivara	♀ <i>A. dubitatum</i>	Valadares 2
5503	Ambiente	Pool 50 larvas <i>A. cajennense</i>	Igrejinha 2
5515 A	Canino	♂ <i>R. sanguineus</i>	Igrejinha 1
5515 B	Canino	♀ <i>R. sanguineus</i>	Igrejinha 1
5517 B	Canino	♂ <i>R. sanguineus</i>	Igrejinha 1
5518 A	Canino	♂ <i>R. sanguineus</i>	Igrejinha 1

♀: fêmea; ♂: macho. *C.* = *Ctenocephalides*, *A.* = *Amblyomma*, *R.* = *Rhipicephalus*.

Tabela 9: Vetores de rickettsias positivos para o gene *ompA*, coletados em áreas de vulnerabilidade do município Juiz de Fora, estado de Minas Gerais, Brasil; no período de julho de 2013 a junho de 2014.

Código da Amostra	Ambiente/Hospedeiro	Vetor	Localidade
549 A	Canino	♂ <i>C. canis</i>	Torreões 1
550	Canino	♂ <i>C. canis</i>	Torreões 1
551 A	Canino	♂ <i>C. canis</i>	Paula Lima 1
551 B	Canino	♂ <i>C. felis</i>	Paula Lima 1
551 C	Canino	♀ <i>C. canis</i>	Paula Lima 1
551 D	Canino	♀ <i>C. felis</i>	Paula Lima 1
552 A	Canino	♀ <i>C. canis</i>	Igrejinha 1
4906 L	Ambiente	Pool 20 larvas <i>A. cajennense</i>	Igrejinha 1
4906 N	Ambiente	Pool 20 larvas <i>A. cajennense</i>	Igrejinha 1
4909 C	Canino	1 ninfa <i>A. cajennense</i>	Igrejinha 2
4911 A	Ambiente	5 ninfas <i>A. cajennense</i>	Valadares 1
4911 B	Ambiente	5 ninfas <i>A. cajennense</i>	Valadares 1
5517 A	Canino	1 ninfa <i>A. cajennense</i>	Igrejinha 1

♀: fêmea; ♂: macho. *C.* = *Ctenocephalides*, *A.* = *Amblyomma*.

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

Tabela 10: Frequência mínima de vetores infectados com rickettsia (%), segundo o local de coleta, no município de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil; no período de julho de 2013 a junho de 2014.

Localidade	Caetés		Igrejinha		Paula Lima		Torrões		Valadares		Total
	Amb	Amb	Amb	Amb	Amb	Amb	Amb	Amb	Amb	Amb	
<i>C. felis</i>	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	50
<i>C. canis</i>	-	-	50	-	100	-	60	-	-	-	62,5
<i>A. cajennense</i>	0	0	13,27	0,23	0	0	0	0	5,10	0	4,29
<i>A. dubitatum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11,11	11,11
<i>R. sanguineus</i>	-	-	22,22	-	0	-	0	-	-	-	12,12
<i>R. microplus</i>	0	0	-	-	-	0	-	-	-	0	0
<i>D. nitens</i>	-	-	0	-	-	0	-	0	-	-	0

Amb: ambiente.

Foram enviadas para o sequenciamento do fragmento do gene *gltA* 16 amostras diferentes, procedentes de Igrejinha, Paula Lima, Torreões e Valadares, correspondendo a 100% das amostras positivas pela PCR para tal gene. Entretanto, somente 11 amostras obtiveram êxito no sequenciamento.

Já para o fragmento do gene *ompA*, foram submetidas ao sequenciamento 13 amostras, que correspondem a 100% das amostras positivas pela PCR para este gene. Porém, apenas sete amostras apresentaram sucesso nessa etapa.

Sequências do gene *gltA* de rickettsias detectadas em dez amostras de pulgas apresentaram 99% de identidade com *R. felis*; e uma sequência desse gene em carrapato apresentou 97% de identidade com *R. bellii* (Tabela 11).

Enquanto nas sequências obtidas do gene *ompA*, sete amostras detectadas em pulgas apresentaram 99% ou 100% de identidade com *R. felis* (Tabela 12).

Tabela 11: Identificação de rickettsias detectadas, por análise de sequências de nucleotídeos de fragmento do gene *gltA*, em amostras de pulgas e carrapato procedentes de áreas de vulnerabilidade do município Juiz de Fora, estado de Minas Gerais, Brasil.

Amostra	Local / Ambiente	Hosp.	Vetor	Identidade	Amostra depositada Genbank	Nº de acesso
					<i>R. felis</i> <i>GltA</i> gene, partial cds	JQ674484.1
551B	Paula Lima / 1	Canino	♂ <i>C. felis</i>	<i>R. felis</i> (99%)	Uncultured Rickettsia sp. clone 6-OP-2-1 citrate synthase (<i>gltA</i>) gene, partial cds	JN982948.1
					<i>R. felis</i> URRWXCal2, complete genome	CP000053.1
					<i>Rickettsia</i> sp. California 2 citrate synthase (<i>gltA</i>) gene, partial cds	AF210692.1
551C	Paula Lima / 1	Canino	♀ <i>C. canis</i>	<i>R. felis</i> (99%)	<i>R. felis</i> <i>GltA</i> gene, partial cds	JQ674484.1
548E	Torreões / 1	Canino	♀ <i>C. canis</i>		<i>R. felis</i> URRWXCal2, complete genome	CP000053.1
552A	Igrejinha / 1	Canino	♀ <i>C. canis</i>		<i>Rickettsia</i> sp. California 2 citrate synthase (<i>gltA</i>) gene, partial cds	AF210692.1
549A	Torreões / 1	Canino	♂ <i>C. canis</i>			
549B	Torreões / 1	Canino	♀ <i>C. canis</i>			
552B	Igrejinha / 1	Canino	♂ <i>C. canis</i>		Uncultured Rickettsia sp. clone 6-OP-2-1 citrate synthase (<i>gltA</i>) gene, partial cds	JN982948.1
547A	Torreões / 1	Canino	♀ <i>C. canis</i>	<i>R. felis</i> (99%)	<i>R. felis</i> <i>GltA</i> gene, partial cds	JQ674484.1
548A	Torreões / 1	Canino	♂ <i>C. canis</i>		<i>R. felis</i> URRWXCal2, complete genome	CP000053.1
551A	Paula Lima / 1	Canino	♂ <i>C. canis</i>		<i>Rickettsia</i> sp. California 2 citrate synthase (<i>gltA</i>) gene, partial cds	AF210692.1
5483B	Valadares / 2	Capivara	♀ <i>A. dubitatum</i>	<i>R. bellii</i> (97%)	<i>R. bellii</i> clone <i>gltA</i> _Rb_At <i>gltA</i> (<i>gltA</i>) gene, partial cds	EU826511.1

Hops.: hospedeiro; ♀: fêmea; ♂: macho; Nº: número.

Tabela 12: Identificação de rickettsias detectadas, por análise de sequências de nucleotídeos de fragmento do gene *OmpA*, em amostras de pulgas procedentes de áreas de vulnerabilidade do município Juiz de Fora, estado de Minas Gerais, Brasil.

Amostra	Local / Ambiente	Hosp.	Vetor	Identidade	Amostra depositada Genbank	Nº de acesso
549A	Torreões / 1	Canino	♂ <i>C. canis</i>	<i>R. felis</i> (100%)	<i>R. felis</i> strain LSU-Lb outer membrane protein A (<i>ompA</i>) gene, complete cds	HM636635.1
					<i>R. felis</i> outer membrane protein (<i>ompA</i>) mRNA, complete cds	EU012496.1
					<i>R. felis</i> outer membrane protein A (<i>ompA</i>) gene, complete cds	DQ408668.1
					<i>R. felis</i> outer membrane protein A (<i>ompA</i>) mRNA, complete cds	AY727036.1
					<i>R. felis</i> URRWXCal2, complete genome	CP000032.1
					<i>R. felis</i> outer membrane protein A (<i>ompA</i>) gene, complete cds	AF191026.1
550	Torreões / 1	Canino	♂ <i>C. canis</i>	<i>R. felis</i> (99%)	<i>R. felis</i> strain LSU-Lb outer membrane protein A (<i>ompA</i>) gene, complete cds	HM636635.1
551A	Paula Lima / 1	Canino	♂ <i>C. canis</i>		<i>R. felis</i> outer membrane protein (<i>ompA</i>) mRNA, complete cds	EU012496.1
551C	Paula Lima / 1	Canino	♀ <i>C. canis</i>		<i>R. felis</i> outer membrane protein A (<i>ompA</i>) gene, complete cds	AY727036.1
551D	Paula Lima / 1	Canino	♀ <i>C. felis</i>		<i>R. felis</i> outer membrane protein A (<i>ompA</i>) mRNA, complete cds	AF191026.1
					<i>R. felis</i> outer membrane protein A (<i>ompA</i>) gene, complete cds	AF191026.1
551B	Paula Lima / 1	Canino	♂ <i>C. canis</i>		<i>R. felis</i> strain LSU-Lb outer membrane protein A (<i>ompA</i>) gene, complete cds	HM636635.1
552A	Igrejinha / 1	Canino	♀ <i>C. canis</i>	<i>R. felis</i> (99%)	<i>R. felis</i> outer membrane protein (<i>ompA</i>) mRNA, complete cds	EU012496.1
					<i>R. felis</i> outer membrane protein A (<i>ompA</i>) mRNA, complete cds	AY727036.1

Hops.: hospedeiro; ♀: fêmea; ♂: macho; Nº: número.

A análise do alinhamento das sequências de *gltA* (Anexo A) demonstrou elevada identidade entre as sequências de pulgas (LIS 551A, LIS 548A, LIS 547A, LIS 551B, LIS 552A, LIS 551C, LIS 549A, LIS 548E, LIS 549B, e LIS 552B), diferindo apenas em relação a quantidade de pares de bases.

As reconstruções filogenéticas realizadas para o fragmento do gene *gltA*, por Máxima Parcimônia e *Neighbor-Joining*, apresentaram topologias parecidas (Figuras 46 e 47). Onde, as sequências de *R. felis* amplificadas no atual trabalho são agrupadas, com *bootstrap* alto, com a sequência de *R. felis* obtida no *GenBank*. O semelhante acontece com as sequências de *R. bellii*. Onde a sequência dessa rickettsia, obtida no atual estudo, forma um clado com a mesma espécie de rickettsia obtida no *GenBank*.

A diferença entre as análises de máxima parcimônia e *Neighbor-Joining* para o gene *gltA* está na ordem de agrupamento das sequências de *R. felis* identificadas no atual estudo com a *R. felis* analisada do *GenBank*. Bem como, com relação à inserção do clado de *R. bellii* nas duas árvores.

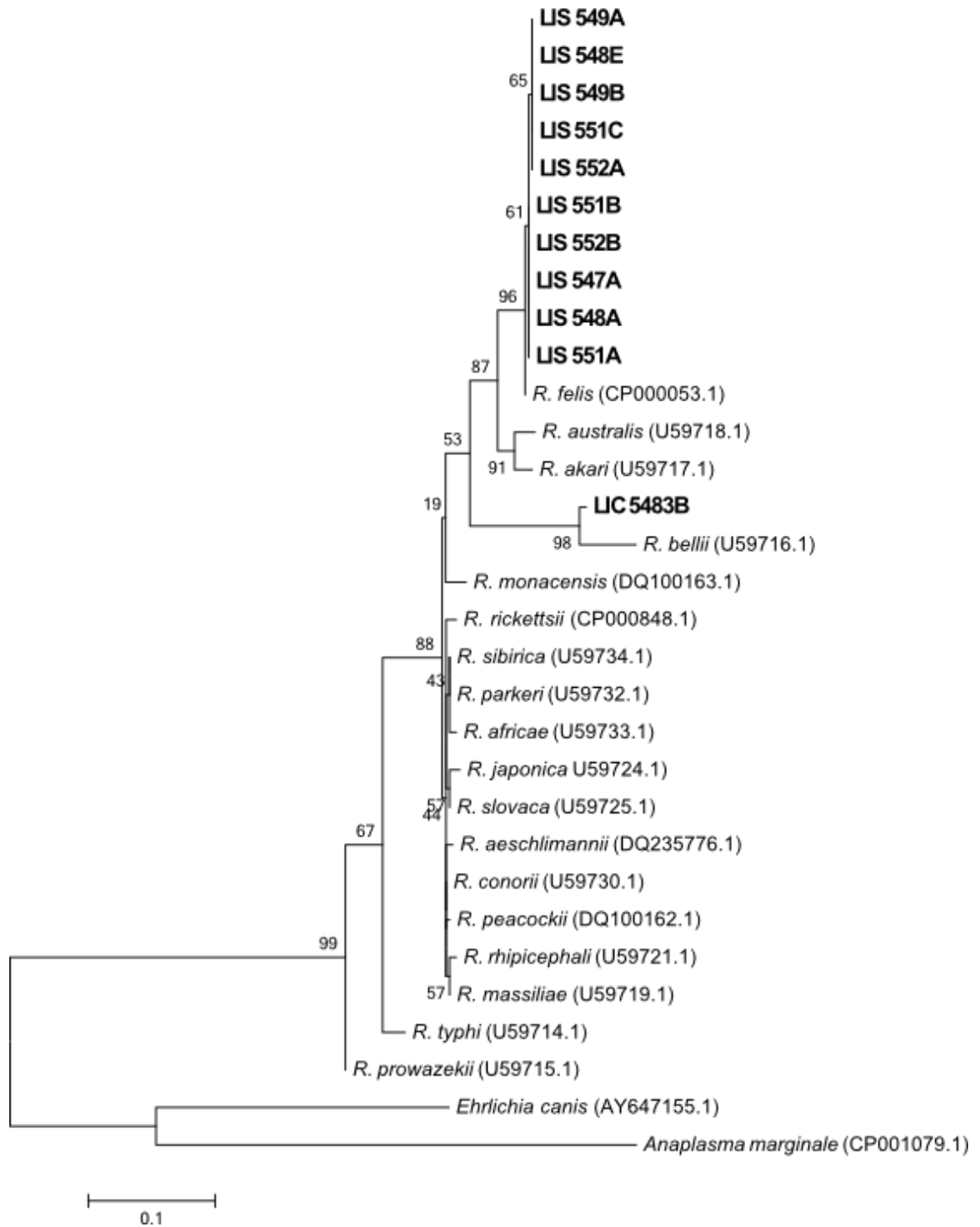


Figura 46: Filodendograma obtido através da comparação das seqüências parciais do gene *gta*, utilizando o método de Máxima Parcimônia.

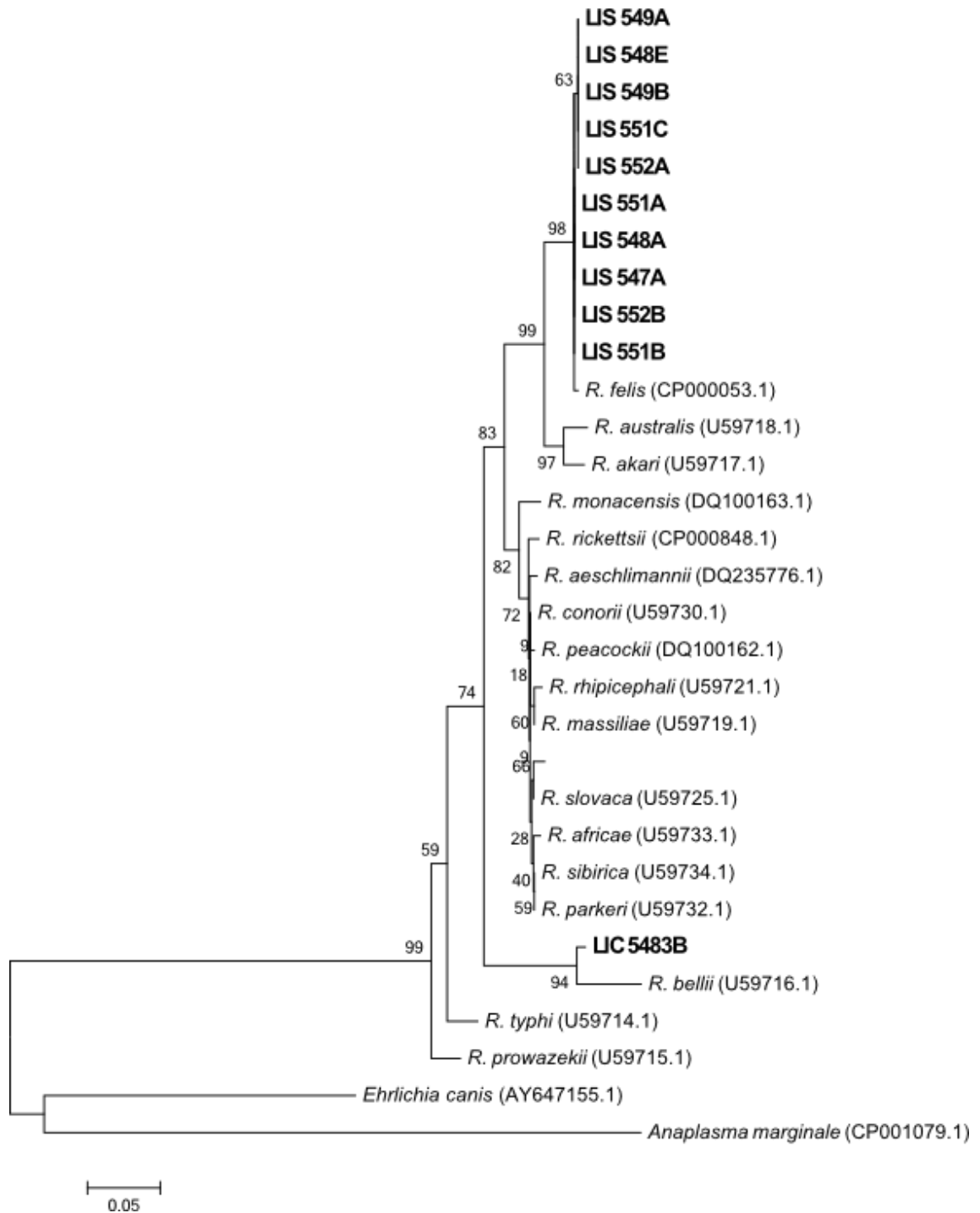


Figura 47: Filodendograma obtido através da comparação das sequências parciais do gene *gItA*, utilizando o método *Neighbor-Joining* e distâncias evolutivas determinadas pelo algoritmo Kimura 2 parâmetros.

O alinhamento das sequências obtidas para o fragmento de gene *ompA* (Anexo B) indicou que as sequências de *R. felis*, amplificadas no atual trabalho, apresentam elevada identidade entre si (LIS 551B, LIS 552A, LIS 551C, LIS 550, LIS 551A, LIS 551D, e LIS 549A), diferindo apenas em relação a quantidade de pares de bases.

As análises realizadas para o fragmento de gene *ompA*, por máxima parcimônia e *Neighbor-Joining*, apresentaram topologias semelhantes (Figuras 48 e 49). Onde, as sequências de *R. felis*, identificadas no atual trabalho, estão no mesmo clado das sequências de *R. felis* analisadas do *GenBank*.

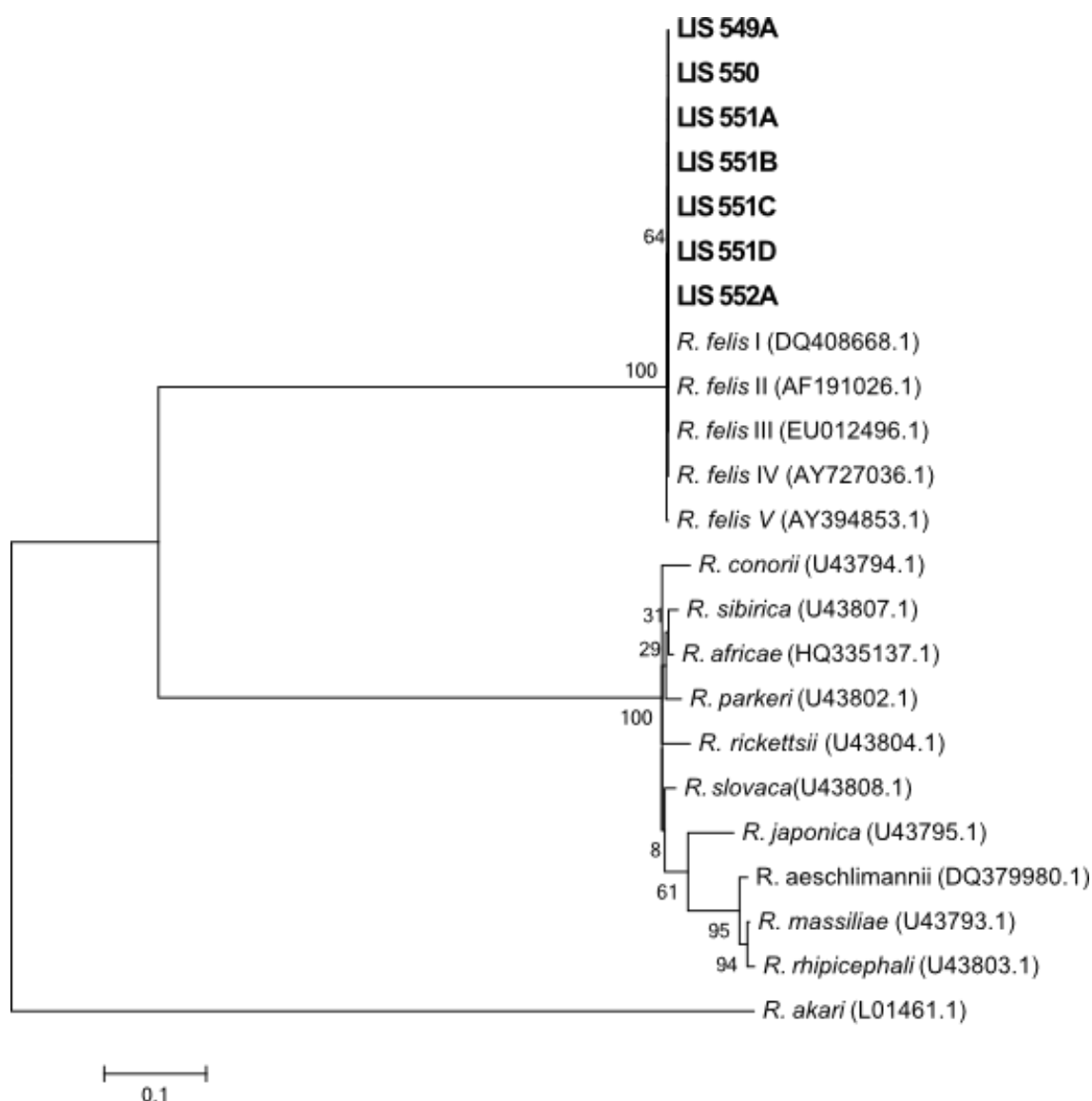


Figura 48: Filodendrograma obtido através da comparação das sequências parciais do gene *ompA*, utilizando o método de Máxima Parcimônia

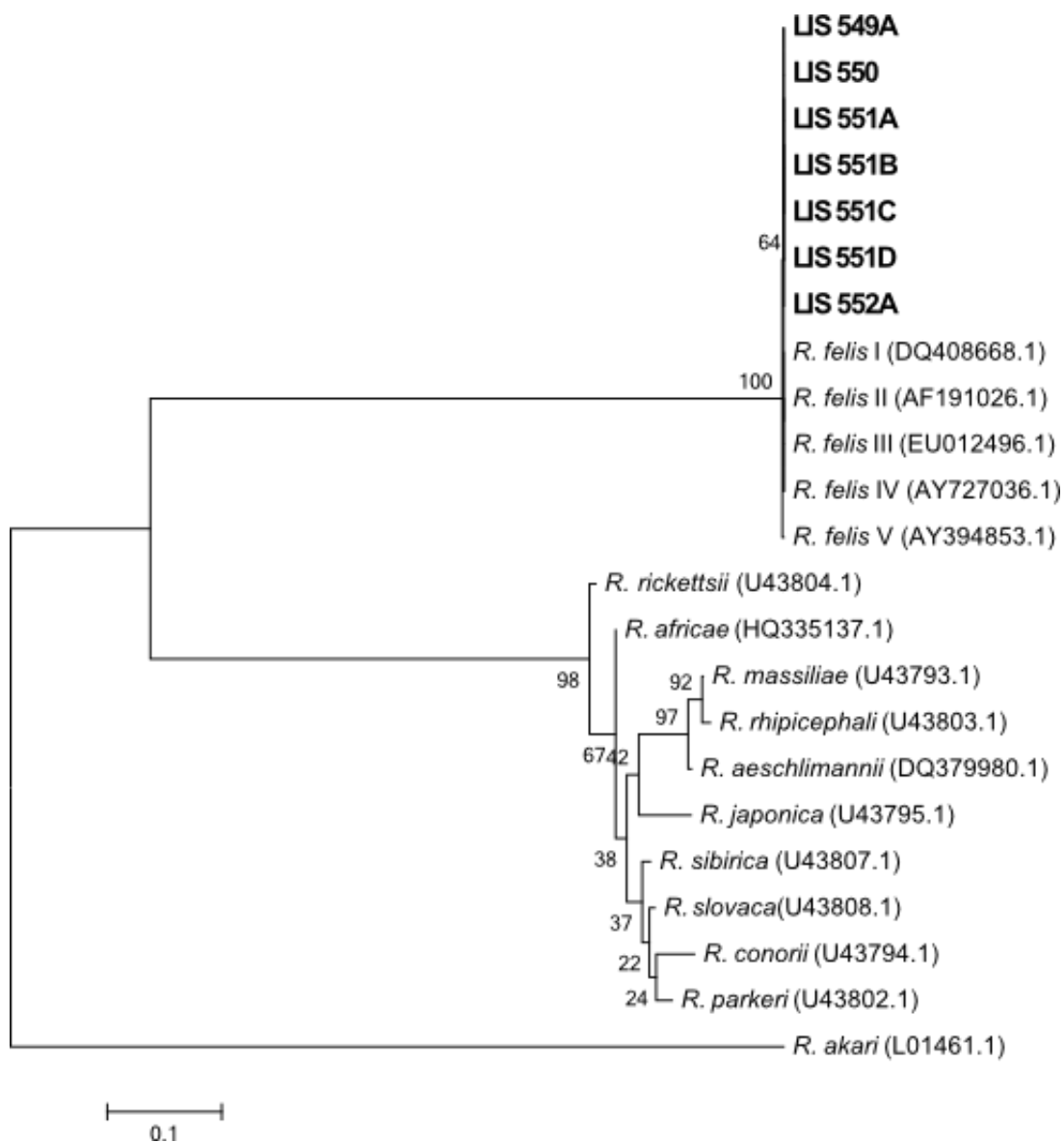


Figura 49: Filodendograma obtido através da comparação das seqüências parciais do gene *ompA*, utilizando o método *Neighbor-Joining* e distâncias evolutivas determinadas pelo algoritmo Kimura 2 parâmetros.

6. Discussão

As localidades onde ocorreram as coletas se encontram próximas a cursos d'água, favorecendo a ocorrência de vetores (Lemos *et al.*, 1997a), com hospedeiros (bovinos, equinos, caninos, felinos e capivaras) e humanos coexistindo no mesmo nicho, sob pressão antrópica e econômica, reunindo condições epidemiológicas para a manutenção do ciclo enzoótico das rickettsias, podendo assim, perdurar como focos silenciosos.

Outro fator de extrema importância reside no fato de que tais localidades circundam áreas onde existem casos confirmados e animais soropositivos, como exposto por Rodrigues *et al.* (2008a); Pacheco *et al.* (2011) e Navarro *et al.* (2014a), neste mesmo município; subsidiando-as a serem consideradas como áreas de maior risco (Figura 50).

Reforçando a condição de vulnerabilidade em que se encontra o município em questão, tem-se localizado em suas adjacências municípios com a presença de vetores (Guedes *et al.*, 2005; Guedes *et al.*, 2011) e casos (Guedes *et al.*, 2005; Monteiro *et al.*, 2006) confirmadamente positivos (Figura 51).

Os resultados deste trabalho mostram que *A. cajennense* foi a espécie predominante das cinco coletadas, com padrão definido de flutuação sazonal, com adultos encontrados em pequeno número ao longo do ano, e com maior número durante o verão, fato também verificado por Serra-Freire (1982) no Rio de Janeiro, Lemos *et al.* (1997) em São Paulo, Oliveira *et al.* (2000) e Guedes e Leite (2008) em Minas Gerais, e Toledo *et al.* (2008) no Paraná; estação em que tanto a temperatura quanto a umidade relativa do ar se encontram mais elevadas, assegurando condições ideais para tal estágio.

Verificou-se que picos populacionais de larvas e ninfas se deram nas coletas de outono e inverno, respectivamente, quando as condições climáticas como temperatura e umidade relativa do ar se apresentam mais baixas, sendo propícia para os mesmos; todavia, as ninfas se mostraram presentes nos quatro períodos de coleta, com maior números de exemplares no inverno e primavera, condição também verificada por Souza *et al.* (2006) em São Paulo e Toledo *et al.* (2008), e diferentemente de Serra-Freire (1982), Lemos *et al.* (1997), Oliveira *et al.* (2000) e em São Paulo por Labruna *et al.* (2002), que encontraram grandes quantidades de estádios imaturos no outono e inverno. Já as larvas se mostraram presentes e em grande quantidade durante todo os quatro períodos de coleta, como nos trabalhos de Souza *et al.* (2006) e Toledo *et al.* (2008).

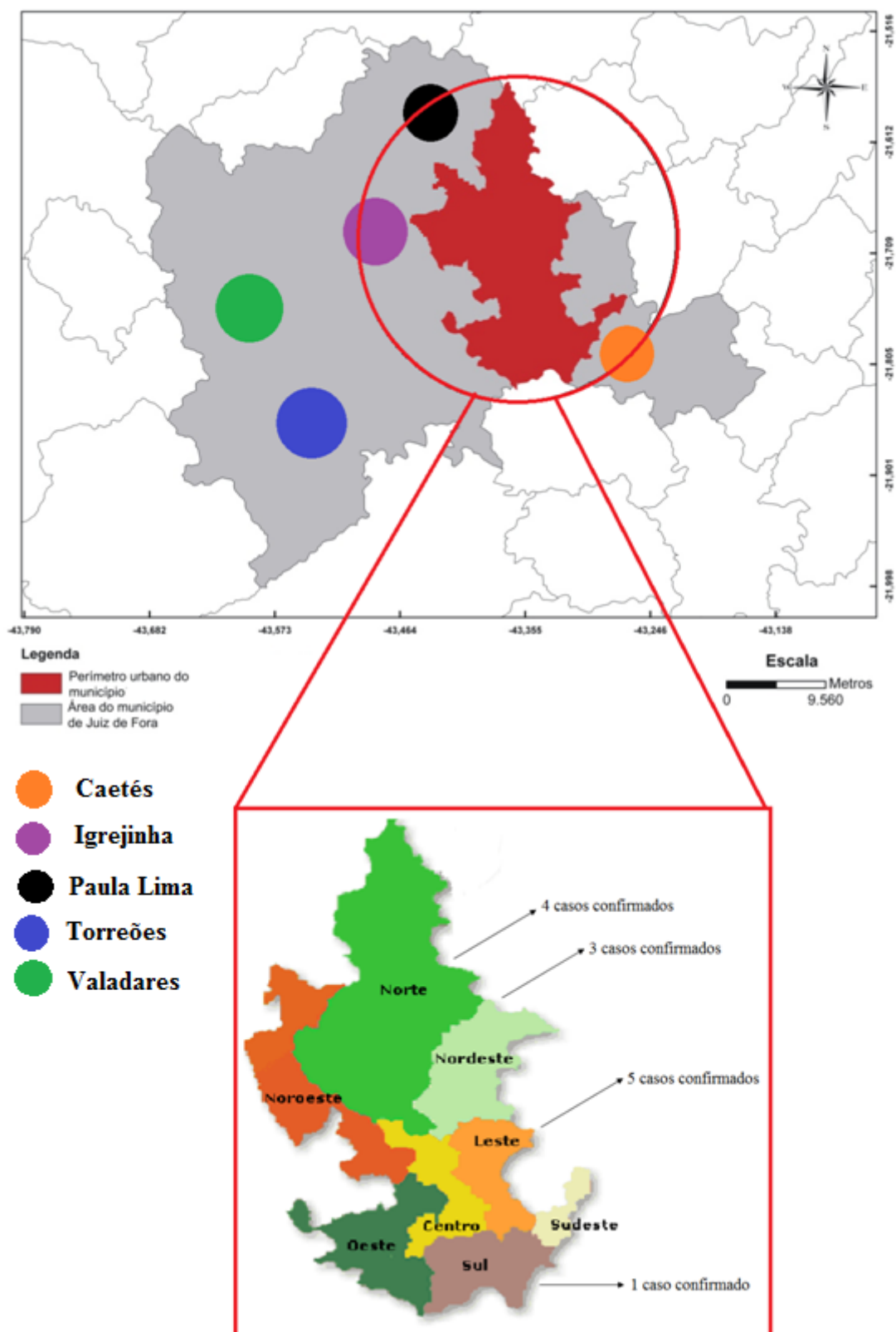


Figura 50: Mapa do município de Juiz de Fora, destacando os locais das coletas que circundam o perímetro urbano, com a indicação dos locais de casos confirmados. (Fonte: Adaptado de Silva, 2009 e Navarro, 2014).

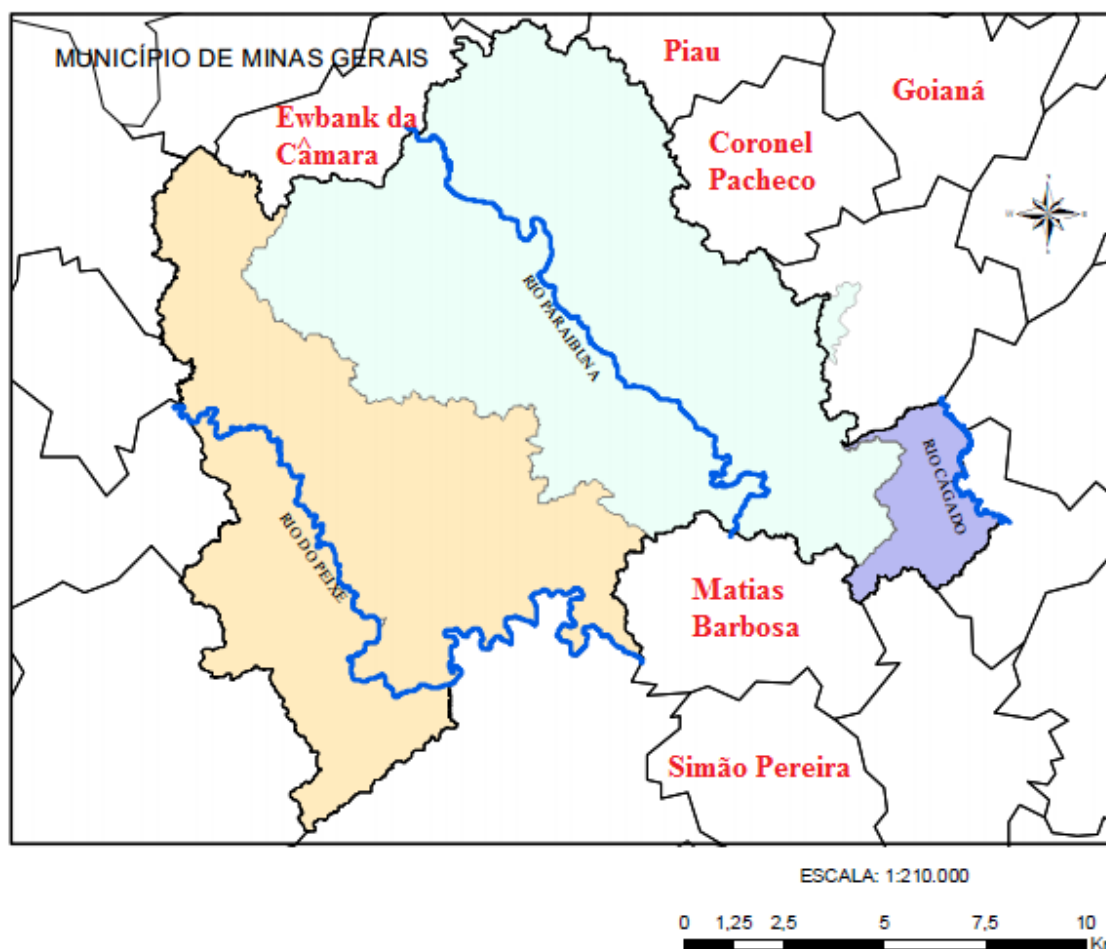


Figura 51: Mapa do município de Juiz de Fora, destacando os municípios adjacentes, os quais detêm casos confirmados de Febre Maculosa. (Fonte: Adaptado do PDDU/JF, 2004 e SINAN, 2015).

Com os recentes progressos de técnicas laboratoriais no estudo das rickettsias, através da utilização de práticas de biologia molecular, possibilitando assim, a realização de ensaios rápidos, altamente específicos e eficientes para detecção e diagnóstico das mesmas; visto que a PCR adjunta ao sequenciamento é, atualmente, o método padrão para a identificação e análise filogenética das diversas espécies de rickettsias.

Os animais nos quais foram capturados artrópodes, são peças importantes na dinâmica do ciclo enzoótico; realidade confirmada por Pacheco *et al.* (2011) e Navarro *et al.* (2014b), que encontraram número elevado de cães e equinos soropositivos para *Rickettsia* spp. no município em questão.

O cálculo da FMVI para os espécimes de *A. cajennense* foi de 4,29%, resultado que contrasta com os de Guedes *et al.* (2005) e Guedes *et al.* (2011), em estudos no município de Coronel Pacheco, a aproximadamente 31km do município de Juiz de Fora, que

encontraram o valor de 1,28% e 0,5%, respectivamente, de *R. rickettsii* na população deste artrópode; e também com Gehrke, (2010) e Moura, (2011) que encontraram 7,15% e 0,41%, respectivamente, em trabalhos realizados no estado do Rio de Janeiro. Quando comparado com os resultados de Sangioni *et al.* (2005), no estado de São Paulo, que não obtiveram DNA rickettsial, o presente estudo também se contrasta.

Já nos estudos realizados no mesmo município do presente trabalho, os valores encontrados também contrastaram, pois Pacheco *et al.* (2011), não encontraram nenhum espécime infectado, enquanto Nunes *et al.* (2014), obtiveram 0,51%. Tal discrepância dos valores encontrados, para o mesmo município, pode ser justificada pela diferença do 'n' amostral entre os estudos, assim como o número de pontos de coleta do presente trabalho terem sido maiores.

Entretanto, Nunes *et al.* (2014), obtiveram taxa de infecção em *R. sanguineus* de 23%, contrastando com o presente trabalho, no qual essa espécie se apresentou positivamente em 12,12%, porém corrobora de Gehrke, (2010) que encontrou 10,73%. Já os trabalhos de Moura, (2011) e no estado do Maranhão, por Silva, (2012), não apresentaram DNA rickettsial para tal espécie.

Embora a taxa de infecção do presente trabalho não seja tão alta quanto à de Nunes *et al.* (2014), o resultado é de extrema importância, pois este ixodídeo é bem adaptada ao convívio humano, e tem-se a hipótese que seu comportamento se altere de acordo com as condições climáticas (Parola *et al.*, 2008), como também antrópicas. Visto que são comumente achados infestando cães, os quais possuem relacionamento estreito com humanos e muitas vezes coabitam a mesma moradia, a presença destes ixodídeos implica um papel de elevada importância no ciclo e na manutenção das rickettsias, do que de fato é.

O fato da maioria dos cães investigados estarem infestados por *R. sanguineus*, e estes apresentarem 12,12% de FMVI, enquanto que Pacheco *et al.* (2011) em seu trabalho encontram 13,1% deste mesmo artrópode infectado por *R. rickettsii*, nos leva a conjecturar a possibilidade da circulação dessa bactéria também nas zonas investigadas. Contudo, a etapa do sequenciamento destes ixodídeos não renderam reprodutibilidade dos resultados.

A FMVI foi de 11,11% para *A. dubitatum*, resultado este que contrasta com os de Guedes *et al.* (2005) e Guedes *et al.*(2011) que não encontraram DNA rickettsial nestes artrópodes; todavia, concorda com estudos realizados no estado de São Paulo por Labruna

et al. (2004a), Horta *et al.* (2007) e Pacheco *et al.* (2009), nos quais grande parte da população deste ixodídeo encontrava-se infectada por *R. bellii*.

Nenhum *R. microplus* rendeu DNA rickettsial, resultado que destoa dos encontrados por Gehrke, (2010) e Moura-Martiniano *et al.* (2014), que encontraram 3,97% e 3%, respectivamente, desta espécie infectada por *Rickettsia* sp. no estado do Rio de Janeiro.

Outra espécie não rendeu DNA rickettsial foi a *D. nitens*, fato esse que concorda com Moura, (2011), porém contrasta com os resultados de Gehrke, (2010) que encontrou 10, 29%.

No tocante aos resultados anteriormente discutidos para as duas últimas espécies, certamente o exposto deve-se ao baixo 'n' amostral encontrado para tais espécies.

Foram recuperadas pulgas das espécies *C. canis* e *C. felis* dos cães residentes nas localidades investigadas, tal como Rodrigues *et al.* (2008b) em estudo em localidades de mesma particularidade, e diferentemente de Rodrigues *et al.* (2001) em pesquisa executada na área urbana de Juiz de Fora. A porcentagem encontrada foi de 62,5% e 50% para *C. canis* e *C. felis*, respectivamente, corroborando com Horta *et al.* (2014) sobre a circulação de *R. felis* no município de Juiz de Fora.

No presente trabalho foram analisadas doze amostras de carrapatos, entre eles, *A. cajennense*, *A. dubitatum* e *R. sanguineus*, que tinham sido previamente positivos para genes rickettsiais na PCR. Destas, apenas uma obteve resultado satisfatório no sequenciamento. O sucesso no sequenciamento das amostras foi baixo, principalmente para o fragmento do gene *ompA*, possivelmente porque algumas amostras positivas apresentaram bandas inespecíficas. Dessa forma, o protocolo da PCR será ajustado para que haja maior sucesso na amplificação dos genes avaliados, e um novo sequenciamento das amostras positivas, das quais não foi possível obter sequências, será realizado.

Cinco amostras positivas para os genes analisados apresentaram 99% e 100% de identidade com *R. felis* (Tabelas 11 e 12). Entretanto, a identidade obtida não caracteriza a espécie encontrada, sendo necessária a análise de genoma completo ou de um maior número de genes. Todavia, é um grande indício da presença da espécie de *Rickettsia* no vetor (Moura-Martiniano, 2014).

Assim sendo, as análises filogenéticas também indicam que possivelmente as pulgas detectadas positivas para rickettsia estavam infectadas com *R. felis* (com 99% de identidade). E o carrapato *A. dubitatum* estava infectado com *R. bellii* (com 97% de

identidade). Já que as sequências dessas rickettsias, obtidas na atual investigação, ficaram no mesmo clado das rickettsias dessas espécies analisadas do *GenBank*.

Enfatizando o encontro pela primeira vez de sequências com 99% e 100% de identidade com *R. felis* em pulgas do gênero *Ctenocephalides*, no presente trabalho, indicam a importância epidemiológica deste achado, pois há relatos de óbitos por esta rickettsiose.

Já para os resultados relacionados aos ixodídeos, o presente trabalho estabelece o primeiro relato de sequência com 97% de identidade com *R. bellii* em *A. dubitatum* na microrregião de Juiz de Fora. Conforme o resultado de Moura, (2011), foi encontrada sequência com 100% de identidade com *R. rickettsii* para este carrapato no Brasil; voltando assim, nossa atenção para este ixodídeo, mesmo porque grande parte dos casos de FMB em áreas endêmicas estão associadas ao aumento populacional das capivaras, que são os principais hospedeiros, bem como o elo entre os ciclos enzoóticos e epidêmico (Nascimento e Schumaker, 2004).

Este aumento, anteriormente citado, também é percebido no município do atual estudo, mostrando a importância destes hospedeiros na dinâmica da FM, pois com o avanço da mancha urbana para áreas de mata, possibilita o contato mais estreito com hospedeiros silvestres, resultando em uma maior probabilidade de infecção humana.

Através dos relatos dos estudos realizados por Guedes *et al.* (2005), Guedes *et al.* (2011), Pacheco *et al.* (2011), Navarro *et al.* (2014a), Navarro *et al.* (2014b) e Nunes *et al.* (2014) na Microrregião de Juiz de Fora, bem como dados da Regional de Saúde de Juiz de Fora (comunicação pessoal), pode-se conjecturar um mapa que traduz a real distribuição das rickettsias (Figura 52).

Entre os números de artrópodes infectados, verificou-se baixas taxas de infecção por *Rickettsia* sp. em ixodídeos em relação aos sifonápteros, contudo, há de se levar em consideração um fator de extrema relevância, o efeito patogênico desse bioagente para os carrapatos, evento não ocorrente nas pulgas, como também o fenômeno da manutenção da rickettsia através da transmissão transovariana, sem necessidade de um reservatório vertebrado, o que pode justificar a alta incidência desses agentes nesses vetores; somando-se ao exposto, tem-se o fato de que todos os sifonápteros foram coletados em hospedeiros vertebrados, enquanto que os ixodídeos foram recuperados tanto desses, quanto livres no ambiente.

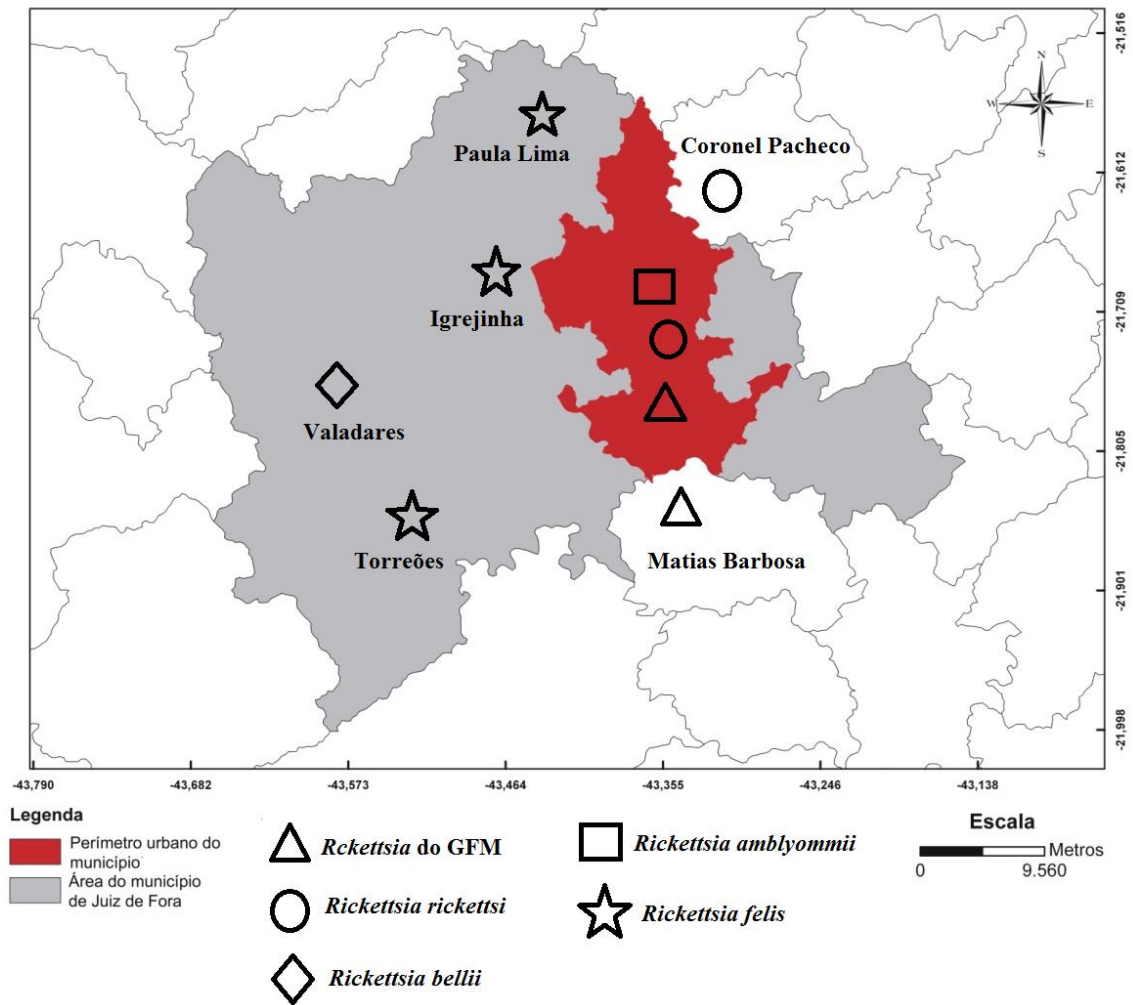


Figura 52: Mapa da distribuição de ocorrência de espécies de rickettsias na Microrregião de Juiz de Fora. (Fonte: Adaptado de Silva, 2009).

7. Considerações Finais

A partir dos resultados do presente trabalho, bem como do exposto por outros autores, faz-se necessária a atenção à população canina, visto que esses possuem papel fundamental na dinâmica epidemiológica das localidades investigadas. Por serem hospedeiros sentinelas e amplificadores para tal zoonose, albergarem grande quantidade de vetores e circularem por grandes extensões, sobretudo os errantes, os cães aumentam as chances de intercâmbio de artrópodes infectados entre animais silvestres para áreas onde antes não se tinham contato com o bioagente, devido à peculiaridade das regiões investigadas, participando intensamente da dinâmica do ciclo enzoótico e epidêmico, bem como na perpetuação do foco de FM, já que coabitam o mesmo nicho que humanos. Fato semelhante ocorre com os equinos, principalmente os de trabalho utilizados pelos carroceiros (Leite *et al.*, 1998; Oliveira, 2004).

É importante salientar que as medidas educacionais que promovem a conscientização da população são, em longo prazo, de maior eficiência, já que o tratamento do animal doente beneficia apenas o próprio, não auxiliando na prevenção de novos casos da doença. A educação efetiva é vital para a saúde pública e promover a responsabilidade de proprietários de animais susceptíveis faz parte deste contexto.

Como os resultados encontrados no presente trabalho já eram esperados – visto que as áreas estudadas estão no entorno de regiões endêmicas com casos confirmados – nossa discussão se volta então para a dinâmica epidemiológica da FM, sendo este o grande foco, já que não sabemos a extensão deste endêmico, e também pelo fato do referido município estar inserido em região problemática, pertencente à bacia do Paraíba do Sul, a qual possui vários focos espalhados, caracterizando assim, tais localidades como peças importantes para tal dinâmica, com possível formação de focos tanto rurais, quanto urbanos, tornando-se áreas de risco de transmissão desta zoonose.

Com a descoberta de novas áreas de circulação de bactérias do gênero *Rickettsia*, faz-se necessário que as autoridades estejam alertas e preparadas para um plausível surto, devido à dificuldade do rápido diagnóstico, aliado ao desconhecimento e desinformação da população em geral acerca da FM, como também às semelhanças diagnósticas com outras doenças; somando-se estes fatos à baixa especificidade do principal vetor, contribui para que um surto se instaure. Sugere-se então, uma adequada capacitação e

preparo das equipes de vigilância epidemiológica, bem como dos profissionais do Sistema Único de Saúde (SUS) para um diagnóstico precoce da doença.

Em virtude disso, torna-se de extrema importância a implementação, por parte dos governos, de programas de saúde pública alertando e conscientizando a população dos riscos que o contato com o carrapato pode vir a acarretar, uma vez que a FM pode ser letal. É, também, de responsabilidade governamental a realização de ações que incentivem o controle do vetor na natureza, seja em âmbito urbano, periurbano ou rural.

Mediante ao exposto, somando-se a complexa cadeia epidemiológica da FM, bem como o desconhecimento da ocorrência da enfermidade nas áreas investigadas, as quais são limítrofes ao segmento urbano endêmico, demonstra que há muito a ser elucidado sobre a real situação da FM, podendo caracterizar essas áreas como sendo, de fato, um problema de saúde pública em ascensão.

8. Conclusão

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- A fauna de ectoparasitos das regiões investigadas é composta *Amblyomma cajennense*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Ctenocephalides canis* e *Ctenocephalides felis* e *Amblyomma dubitatum*) ocorrem em diferentes localidades no entorno da mancha urbana de Juiz de Fora, e podem participar do ciclo de *Rickettsia* na região analisada.

- As áreas de vulnerabilidade do município de Juiz de Fora, Minas Gerais, assinalam para o permanente estado de atenção já que *A. cajennense* é a espécie mais frequente naquelas áreas, com FMVI de 4,29%.

- *R. felis* foi a espécie patogênica, com 99% e 100% de identidade, encontrada nas áreas de vulnerabilidade do município de Juiz de Fora.

- Pela primeira vez há a presença de sequência de 97% de homologia com *R. bellii* em *A. dubitatum* para a Microrregião de Juiz de Fora.

- A princípio Caetés não apresenta risco e FM.

Referências Bibliográficas

Ab' SABER, A. **Os Domínios de Natureza no Brasil**: Potencialidades Paisagísticas. São Paulo: Ateliê Editorial, 2003.

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmissibles communes al hombre y a los animales. (2nded.) Washington: **Organización Panamericana de la Salud**, p.502-26, 1986.

ADAMS, J.R.; SCHMIDTMAN, E.T.; AZAD, A.F. Infection of colonized cat fleas *Ctenocephalides felis* (Bouché) with a *Rickettsia*-like microorganism. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.43, p.400-09, 1990.

AKOV, S. Blood digestion in ticks. In: Obenchain, F. and Galun, R. (ed.), **Physiology of ticks**. Pergamon Press, Oxford, p.197-211, 1982.

ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR- based techniques. **Nucl. Acids. Res.**, v.25, n.22, p. 4692-93, 1997.

AMORIM, M. e SERRA-FREIRE, N.M. Chave dicotômica para a identificação de larvas de algumas espécies do Gênero *Amblyomma* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Entomol. Vect.**, v.6, p.75-90, 1999.

APPERSON, C.S.; ENGBER, B.; NICHOLSON, W.L.; MEAD, D.G.; ENGEL, J.; YABSLEY, M.J.; DAIL, K.; JOHNSON, J.; WATSON, D.W. Tick-Borne Diseases in North Carolina: Is "*Rickettsia amblyommii*" a Possible Cause of Rickettsiosis Reported as Rocky Mountain spotted fever. **Vector-Borne Zoon Dis.**, v.8, n.5, p.597-606, 2008.

ARAGÃO, H.B. Notas sobre ixodidas brasileiros. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, n.3, p.145-95, 1911.

ARAGÃO, H.B. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrophes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.31, n.4, p.759-845, 1936.

ARAGÃO, H.B.; FONSECA, F. Notas de Ixodologia, VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.59, n.2, p.115-29, 1961.

ARAGÃO, H.B.; FONSECA, F. Notas de Ixodologia.: propósito da validade de algumas espécies de gênero *Amblyomma* do continente Americano (Acari: Ixodidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, n.51, p 485-92, 1953.

ARTHUR, D.R. Ticks and disease. **Pergamon Press**, Oxford, p.445, 1962.

ATWOOD, E.L.; LAMB, J.J.T.; SONENHINE, D.E. A contribution to the epidemiology of Rocky Mountain spotted fever in the eastern United State. **Am. J. Trop. Med. and Hyg.**, v.14, p.831-37, 1965.

AZAD, A.F.; RADULOVIC, S.; HIGGINS, J.A.; NODEN, B.H.; TROYER, J.M. Fleaborne Rickettsioses: ecologic considerations. **Emerg. Infect. Dis.**, v.3, n.3, p.319-27, 1997.

AZAD, A.F. and BEARD, C.B. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. **Emerg. Infect. Dis.**, v.4, p.179–86. 1998.

AZAD, A.F.; WEBB, L.; CARL, M.; DASCH, G.A. Detection of Rickettsiae in Arthropod Vectors by DNA Amplification Using the Polymerase Chain Reaction. **Ann NY Acad. Sci.**, v.590, p.557–63. 1990.

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

BALASHOV, Y.S. Bloodsucking ticks (Ixodoidea) -Vectors of diseases of man and animals. **Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America**, v.8, p.160-376, 1972.

BARCI, L.A.G. e NOGUEIRA, A.H.C. Artigo técnico febre maculosa brasileira. **Biológico**, v.67, n.1 e 2, p.23-9, 2005.

BARLETT, P.C. and JUDGE, L.J. The role of epidemiology in public health. **Office International des Epizooties Scientific and Technical Review**, v.16, n.2, p.331-36, 1997.

BARROS-BATTESTI, D.M.; ARZUA, M.; BECHARA, G.H. In: **Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo: Ed. Vox, p.117-19, 2006.

BELL, W.E. and LASCARI, A.D. Rocky Mountain spotted fever, neurological, symptoms in the acute phase. **Neurology**, Cleveland OH, v.20, p.841-47, 1970.

BICHO, C.L. e RIBEIRO, P.B. Chave Pictórica para as principais espécies de siphonaptera de importância médica e veterinária no Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.7, n.1, p.47-51, 1998.

BILLINGS, A.N.; YU, X.J.; TEEL, P.D.; WALKER, D.H. Detection of a spotted fever group Rickettsia in *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in South Texas. **J. Med. Entomol.**, n.35, p.474-78, 1998.

BILLETER, S.A.; BLANTON, H.L.; LITTLE, S.E. *et al.* Detection of “*Rickettsia amblyommii*” in association with a tick bite rash. **Vector-Borne Zoon and Dis.**, v.7, n.4, p.607-10, 2007.

BIRCHARD, S.J.; SHERDING, R.G. **Clínica de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, 1998.

BOUYER, D.H.; STENOS, J.; CROCQUET-VALDES, P.; MORON, C.G.; POPOV, V.L.; ZAVALA-VELAZQUEZ, J.E.; FOIL, L.D.; STOTHARD, D.R.; WALKER, D.H. *Rickettsia felis*: Molecular characterization of a new member of the spotted fever group. **Int. J. Syst. Evolut. Microbiol.**, v.51, p.339-47, 2001.

BRASIL. Lei nº 5.197 de 03 de janeiro de 1967. Dispõe sobre a proteção à fauna e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 05 jan. 1967. Seção 1, p. 177.

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.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>. Acesso em: 23 jan. 2015.

BREITSCHWERDT, E. B.; MONCOL, D. J.; CORBETT, W. T.; MacCORMACK, J. N.; BURGDORFER, W.; LEVY, M. G. Antibodies to spotted fever-group rickettsiae in dogs in North Carolina. **Am. J. Vet. Res.**, v.48, n.10, p.1436-40, 1987.

BROUQUI, P. F.; BACELAR, F.; BARATON, G. BIRTLES, R.J.; BJOERSDORFF, A.; BLANCO, J. R.; CARUSO, G.; CINCO, M.; FOURNIER, P. E.; FRANCAVILLA, E.; MAURIN, M.; OTEO, J. A.; PAROLA, P. PEREZ-EID, C., PETER, O.; POSTIC, D.; RAOUT, D. TELLEZ, A., TSELENTIS, Y., WILSKE, B. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.10, n.12, p.1108-32, 2004.

BURGDORFER, W. Hemolymph test. A technique for detection of rickettsiae in ticks. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.12, p.1010-14, 1970.

BURGDORFER, W. A review of Rocky Mountain spotted fever (tickborne typhus), its agent, and its tick vectors in the United States. **J. Med. Entomol.**, v.12, n.3, p.269-72, 1975.

BURGDORFER, W. Ecological and epidemiological considerations of Rocky Mountain spotted fever and scrubs typhus. In: WALKER, D. H. (ed.). **Biol. of Rickettsial Dis.**, Boca Raton, FL: CRC Press, p.33-50, 1988.

BURGDORFER, W.; and BRINTON, L.P. Mechanisms of transovarial infection of spotted fever *Rickettsiae* in ticks. **Ann. NY Acad. of Sci.**, v.266, p.61-72, 1975.

BURGDORFER, W.; HAYES, S.; THOMAS, L.J.R.; LANCASTER, J.L. A new spotted fever group *Rickettsia* from the lone star tick, *Amblyomma americanum*. In: Burgdorfer, W, Anacker, RL, (eds). *Rickettsiae and Rickettsial Diseases*. New York: Academic Press, p.595-602, 1981.

BURGDORFER, W.; FRIEDHOFF, K.T.; LANCASTER, J.L. Natural history of tick-borne spotted fever in the USA. Susceptibility of small mammals to *virulent Rickettsia rickettsii*. **Bull World Health Organ.** V.35, p.149-53, 1966.

BURGDORFER, W.; NEWHOUSE, V.F.; PICKENS, E.G.; LACKMAND, B. Ecology of Rocky Mountain spotted fever in Western Montana – I. Isolation of *Rickettsia rickettsii* from wild mammals. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, n.76, p.293-301, 1962.

BURKET, C.T.; VANN, C.N.; PINGER, R.R.; CHATOT, C.L.; STEINER, F.E. Minimum infection rate of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) by *Ehrlichia chaffeensis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) in southern Indiana. **J. Med. Entomol.**, v.35, n.5, p.653-59, 1998.

BUTLER, J.F.; HOLSCHER, K.H.; ADEYEYE, O.; GIBBS, E.P.J. Sampling techniques for burrow dwelling ticks in reference to potential African swine fever virus vectors. In: Griffiths, D.A. and Bowman, C.E. (ed.), **Acarology**. VI. Ellis Horwood, Chichester, v.2, p.165-74, 1984.

BUXTON, A. and FRASER, G. The Rickettsias (Chapter 36). Animal Microbiology. **Blackwell Scientific Publication Ltd**, Oxford, v.2, p.359-90, 1977.

CALIC, S.B.; GALVÃO, M.A.M.; CHAMONE, C.B. Inquérito sorológico para febre maculosa em Belo Horizonte, Minas Gerais no ano de 1997. In: **Congr. Soc. Bras. Med. Trop., Manaus**. Anais p.34, 1998.

CAMPBELL, R.W., and DOMROW, R. Rickettsioses in Australia: isolation of *Rickettsia tsutsugamushi* and *R. australis* from naturally infected arthropods. **Rev. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.68, p.397-402, 1974.

CANÇADO, P.H.D. **Carrapatos de Animais Silvestres e Domésticos no Pantanal Sul Mato-grossense (Sub-Região da Nhecolândia): espécies, hospedeiros e infestações em áreas com diferentes manejos**. Tese- Universidade Federal Rural do Estado do Rio de Janeiro. 2008.

CANÇADO, P.H.D.; PIRANDA, E.M.; FACCINI, J.L.H. Armadilha para capturar carrapatos utilizando uma fonte alternativa de CO₂ para o gelo seco. In: **Congr. Bras. Parasitol. Vet., XIV e Simp. Latino-Americano de Rickettsioses, II, Ribeirão Preto, SP**. Anais ... Jaboticabal: CBPV, p.214, 2006.

CARDOSO, L.D. **Deteção e caracterização de *Rickettsias* spp. circulante em foco inativo peri-urbano do município de Caratinga, Minas Gerais**. Dissertação-Universidade Federal de Ouro Preto, Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas, Minas Gerais, Brasil. 2004.

CARDOSO, L.D.; FREITAS, R.N.; MAFRA, C.L.; NEVES, C.V.; FIGUEIRA, F.C.; LABRUNA, M.B.; GENNARI, S.M.; WALKER, D.H. e GALVÃO, M.A.M. Characterization of *Rickettsia* spp. circulating in a silent peri-urban focus for Brazilian spotted fever in Caratinga, Minas Gerais, Brazil. **Cad. Saúde Publ.**, v22, n.3, p.495-501, 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. **Morb. Mort. Week Rep.**, CDC, Atlanta, GA. v.55, n.4, p.36, 2006.

CHOI, Y.J.; JANG, W.J.; RYU, J.S.; LEE, S.H.; PARK, K.H.; PAIK, H.S.; KOH, Y.S.; CHOI, M.S.; KIM, I.S. Spotted fever group and thypus group rickettsioses in humans, South Korea. **Emerg. Infect. Dis.**, v.11, n.2, p.237-44, 2005.

COMER, M.K. Rocky Mountain spotted fever. **Vet. Clin. North America Small Animal Practice**. v.21, n.1, p.27-44, 1991.

CONTRAN, R.S.; KUMAR, V., ROBBINS, S.L.; SHOEN, F.J. **Patologia estrutural e funcional**. 5ªed Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1996.

CORRÊA, S.H.R. and PASSOS, E.C. Wild animals and public health. In: Fowler, M.E.; Cubas, Z.S. **Biology, medicine and surgery of South American wild animals**. Ames: Iowa University Press, p.493-99, 2001.

COSTA, P.S.G.; BRIGATTE, M.E.; ALMEIDA, E.P.; VALLE, L.M.C. Atypical Fulminant *Rickettsia rickettsii* Infection (Brazilian Spotted Fever) Presenting as Septic Shock and Adult Respiratory Distress Syndrome. **T. Braz. J. Infec. Dis.** v.6, n.2, p.91-6, 2002.

COX, H.R. The Spotted Fever Group, In **TM Rivers Viral and rickettsial infections of man** (2nd ed.) JB Lippincott, Philadelphia, p.611-737, 1952.

CUNHA, N.C.; FONSECA, A.H.; REZENDE, J.; ROZENTAL, T.; FAVACHO, A.R.M.; BARREIRA, J.D.; MASSARD, C.L.; LEMOS, E.R.S. First identification of natural infection of *Rickettsia rickettsii* in the *Rhipicephalus sanguineus* tick, in the State of Rio de Janeiro. **Pesq. Vet. Bras.**, v.29, n.2, p.105-08, 2009.

CVE- Centro De Vigilância Epidemiológica, Secretaria De Estado Da Saúde. **Informe técnico de Febre Maculosa Brasileira.** São Paulo, 2002.

DANIELS, T.J. and FISH, D. Spatial distribution and dispersal of unfed larval *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) in southern New York. **Environmental Entomol.**, v.19, n.4, p.1029-33, 1990.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L.A.; BRANDÃO-FILHO, S.P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the Brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.39, n.1, p.64-7, 2006.

DE CICCIO, C. Febre Maculosa: Uma doença que pode levar humanos e animais à morte. Disponível em http://www.saudeanimal.com.br/febre_maculosa_merial.htm. Acessado em 05 de janeiro de 2015.

DEBERALDINI, E.R.; SCARDAZZI, M.C.; ALMEIDA, C.A.; DEL GUERCIO, V.M.; MELLES, H.H.; NOUER, S.A.; DE LIMA, V.L.C. **Febre maculosa: manual de orientação para vigilância epidemiológica.** Campinas, 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. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.30, n.1, 1997.

DEMMA, L.J.; EREMEEVA, M.E.; NICHOLSON, C.D.; TRAEGER, M.S.; BLAU, D.M.; PADDOCK, C.D.; LEVIN, M.L.; DASCH, G.A.; CHEEK, J.E.; SWERDLOW, D.L.; McQUISTON, J.H. An outbreak of Rocky Mountain spotted fever associated with a novel tick vector, *Rhipicephalus sanguineus*, in Arizona, 2004: preliminary report. **Ann. NY Acad. Sci.**, v.1078, p.342-43, 2006.

DIAS, E. and MARTINS A.V. Spotted fever in Brazil. **Am. J. Trop. Med.**, V.19, p.103-08, 1939.

DOS SANTOS, A.P. **Aspectos epidemiológicos de 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).** Tese- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2003.

DUH, D.; PUNDA-POLIC, V.; PETROVEC, M.; TRILAR, T.; BRADARIC, N.; AVSICZUPANA, T. Molecular identification of flea-transmitted *Rickettsia felis*-like bacteria in *Haemaphysalis sulcata* ticks collected from domestic animals in southern Croatia. In: **Inter. Conf. Rickettsiae And Rickettsial Dis., Logroño, Espanha.** Anais... res. p.23, 2005.

DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.; DASCH, G.A.; PALMER, G.H.; RAY, S.C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F.R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.51, n.6, p.2145-65, 2001.

ELCHOS, B.N. and GODDARD, J. Implications of presumptive fatal Rocky Mountain spotted fever in two dogs and their owner. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v.223, p.1450-52, 2003.

ELISBERG, B.L. AND BOZEMAN, F.M. The rickettsiae. In EH Lennet, Diagnostic Procedure, **Am. Publ. Health Assoc.** p.1061-1108, 1979.

ESTRADA-PEÑA, A. and JONGEJAN, F. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. **Exp. Appl. Acarol.**, v.23, p.685-715, 1999.

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

EREMEEVA, M.; DASCH, G.A. *Rickettsiae*. In: Lederberg, **J. Encyclopedia Microbiol.**, New York. (2nd) ed. Academic Press. v.4, p.140-80, 2000.

EREMEEVA, M., YU, X.; RAOULT, D. Differentiation among spotted fever Group Rickettsiae Species by Analysis of Restriction Fragment Length Polymorphism of PCR-Amplified DNA. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, n3, p.803-10. 1994.

EVANS, D.E.; MARTINS, J.R.; GUGLIELMONE, A.A. A review of the ticks (Acari, Ixodida) of Brazil, their hosts and geographic distribution. 1. The State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.95, n.4, p.453-70, 2000.

FALCÃO, E.C. "Henrique da Rocha Lima e a Descoberta da *Rickettsia prowazekii*". **Rev. Inst. Med. Trop. SP**, v.8, n.2, p.52-9, 1966.

FALCO, R.C. and FISH, D. Horizontal movement of adult *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) attracted to CO2 baited traps. **J. Med. Entomol.**, v.28, n.5, p.726-29, 1991.

FELSENSTEIN, J. Confidence Limits on Phylogenies: Na Approach Using the Bootstrap. **Evolution** [The bootstrap first applied to phylogenies], v.39, p.783-91, 1985.

FENG, W.C., MURRAY, E.J., ROSENBERG, G.E. Natural infection of dogs on cape cod with *Rickettsia rickettsii*. **J. Clin. Microbiol.**, v.10, p.322-25, 1979.

FONSECA, L.M.G. e MARTINS, A.V. Febre Maculosa: Revisão de literatura – Artigo de revisão. **Saúde & Amb. Rev.**, v.2, n.1, p.01-20, 2007.

FORTES F.S.; BIONDO A.W.; MOLENTO M.B. Febre maculosa brasileira em cães. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v.32, n.1, p.339-54, 2011.

FOSCARINI-NETO, P. **O distrito de Sarandira: mudanças e permanências na paisagem**. 200p. Dissertação- Faculdade de Arquitetura e Urbanismo da Universidade de São Paulo, 2008.

FOURNIER, P.E.; and RAOULT, D. Mediterranean spotted fever and other tick-borne rickettsioses. In: Goodman, J.L.; Denis, D.T.; Sonenshine, D.E. (ed.). **Tick-Borne Dis. Hum.** Asm Press, Washington, DC. P.418, 2005.

FREITAS, M.C.D.O. **Deteção de Rickettsias do Grupo Febre Maculosa em cães e equinos em São José Dos Pinhais, Paraná**. Dissertação- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

FRIEDHOFF, K.T. Interaction between parasite and tick vector. **Inter. J. Parasitol.**, v.20, n.4, p.525-35, 1990.

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

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

GALVÃO, M.A.M.; CALIC, S.B.; CHAMONE, C.B.; MAFRA, C.L.; FILHO, G.C.; OLANO, J.P.; WALKER, D.H. Spotted fever rickettsioses in Coronel Fabriciano, Minas Gerais State. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.36, n.4, p.479-81, 2003.

GALVÃO, M.A.M.; CARDOSO, L.D.; MAFRA, C.L.; CALIC, S.B.; WALKER, D.H. Revisiting Brazilian spotted fever focus of Caratinga, Minas Gerais State, Brazil. **Ann. NY Acad. Sci.**, v.1078, p.255-56, 2006.

GALVÃO, M.A.M.; LAMOUNIER, J.A.; BONOMO, E.; TROPIA, M.S.; REZENDE, E.G.; CALIC, S.B.; CHAMONE, C.B.; MACHADO, M.C.; OTONI, M.E.; LEITE, R.C.; CARAM, C.; MAFRA, C.L.; WALKER, D.H. Rickettsioses emergentes e reemergentes numa região endêmica do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Cad. Saúde Públ.**, Rio de Janeiro, p.1593-97, nov/dez, 2002.

GALVÃO, M.A.; MAFRA, C.; CHAMONE, C.B.; CALIC, S.B.; ZAVALA-VELZQUEZ, J.E.; WALKER, D.H. Clinical and laboratorial evidence of *Rickettsia felis* infections in Latin America. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.37, n3, p.238-40. 2004.

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

GALVÃO, M.A.M.; SILVA, L.J.; NASCIMENTO, E.M.M.; CALIC, S.B.; SOUSA, R.; BACELLAR, F. Riquetsioses no Brasil e Portugal: ocorrência, distribuição e diagnóstico. **Rev. Saúde Públ.** v.39, n.5, p.850-6, 2005.

GASSER, A.M.; BIRKENHEUER, A.J.; BREITSCHWERDT, E.B. Canine Rocky Mountain spotted fever: a retrospective study of 30 cases. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v.37, n.1, p.41-8, 2001.

GAZÊTA, G.S.; CAVALCANTE, R.C.; NASCIMENTO, F.C.; SILVEIRA, J.G.; FURTADO, F.H.S.; AMORIM, M.; VIZZONI, V.; PEREIRA, J.M.; OLIVEIRA, S.V.; SANTOS, F.B.; MOREIRA, L.M.C.; FERREIRA, E.M.; SOARES, C.A.G.; SERRA-FREIRE, N.M. Aspectos epidemiológicos da febre maculosa brasileira na região do Maciço de Baturité, estado do Ceará. III Simpósio Estadual de Doenças Transmitidas por Carrapatos. **Boletim Epidemiológico Paulista** (Online) v.10, n.117. São Paulo, set. 2013.

GERHKE, F.S. **Detecção e caracterização molecular de riquetsias em humanos, potenciais vetores e animais domésticos da Região Sudeste do Brasil.** 100p. Tese- Instituto de Ciência Biomédica da Universidade de São Paulo, Brasil, 2010.

GEHRKE, F. S.; GAZETA, G. S.; SOUZA, E. R.; RIBEIRO, A.; MARRELLI, M. T.; SCHUMAKER, T. T. S. *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia felis* and *Rickettsia* sp TwKM03 infecting *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis* collected from dogs in a Brazilian Spotted Fever focus in the state of Rio de Janeiro/Brazil. **Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.15, n.2, p.267-68, 2009.

GILLESPIE, J.J.; BEIER, M.S.; RAHMAN, M.S.; AMMERMAN, N.C.; SHALLOM, J.M.; PURKAYASTHA, A.; SOBRAL, B.S.; AZAD, A.F. Plasmids and rickettsial evolution: insight from *Rickettsia felis*. **PLos. One**, v.2, n.3, p.266, 2007.

GIMENEZ, D.F. Staining Rickettsiae in Yolk-Sac Cultures. **Stain Technol.**, v.39, p.135-40, 1964.

GOMES, L.S. Thypho exanthematico de São Paulo. **Brasil-Médico** v.17, p.919-21. 1933.

GONÇALVES, A.J.R.; LOPES, P.F.A.; MELO, J.C.P.; PEREIRA, A.A.; PINTO, A.M.M.; LAZERA, M.S.; SOUZA, M.L.S.; TEIXEIRA, C.R.V.; OLIVEIRA, J.C.; DUARTE, F. Riquetsioses: a propósito de quatro casos diagnosticados no Rio de Janeiro de febre maculosa brasileira. **Folha Médica**. v.82, n.2, p.127-34, 1981.

GRAVES, S.; STENOS, J. *Rickettsia honei* - A spotted fever group rickettsia on three continents. **Ann. NY Acad. Sci.**, v.990, p.62-6. 2003.

GREENE, C.E. Rocky Mountain spotted fever. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.191, p.666-71, 1987.

GREENE, C.E.; AMANDA MARKS, M.; LAPPIN, M.R. Comparison of latex agglutination, indirect immunofluorescent antibody, and enzyme immunoassay methods for serodiagnosis of Rocky Mountain spotted fever in dogs. **Am. J. Vet. Res.**, v.54, n.1, p.20-8, 1993.

GREENE, C.E. and BREITSCHWERDT, E.B. Rocky Mountain spotted fever and Q fever. In: **Infec. Dis. Dog and Cat**, Greene, C.E. (ed.), p.419-33. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1990.

GREENE, C.E. and BREITSCHWERDT, E.B. Rocky Mountain spotted fever, murine typhus like disease, rickettsial pox, typhus and Q fever. In: **Infec. Dis. Dogs and Cats**. (3nd ed.) Canadá: Sauders Elsevier, cap. 29, p.232-43, 2006.

GRINDEM, C.B.; BREITSCHWERDT, E.B.; PERKINS, P.C.; CULLINS, L.D.; THOMAS, T.J.; HEGARTY, B.C. Platelet-associated immunoglobulin (antiplatelet antibody) in canine Rocky Mountain spotted fever and ehrlichiosis. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v.35, p.56-61, 1999.

GUEDES, E. e LEITE, R.C. Dinâmica sazonal de estádios de vida livre de *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae) numa área endêmica para febre maculosa, na região de Coronel Pacheco, Minas Gerais. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.17, supl. 1, p.78-82. 2008.

GUEDES, E.; LEITE, R.C.; PACHECO, R.C.; SILVEIRA, I.; LABRUNA, M.B. *Rickettsia* infecting *Amblyomma* ticks in Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Jaboticabal, v.20, n.4, p.308-11, 2011.

GUEDES, E.; LEITE, R.C.; PRATA, M.C. A.; PACHECO, R.C.; WALKER, D.H.; LABRUNA, M.B. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.100, p.841-45, 2005.

GUGLIELMONE, A.A.; BEATI, L.; BARROS-BATTESTI, D.M.; LABRUNA, M.B.; NAVA, S.; VENZAL, J.M.; MANGOLD, A.J.; SZABO, M.P.J.; MARTINS, J.R.; GONZALEZ-ACUNA, D.; ESTRADA-PENA, A. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Exp. Appl. Acarol.**, v.40, n.2, p.83-100, 2006.

HACKSTADT, T.; MESSER, R.; CIEPLAK, W.; PEACOK, M.G. Evidence for proteolytic cleavage of the 120kilodalton outer membrane protein of Rickettsiae: Identification of an avirulent mutant deficient in processing. **Infect. Immun.**, v.60, n.1, p.159-65, 1992.

HALLACK, K.A., CUNHA, R.M.C., ROLAND, R.K. Ocorrência de casos de febre maculosa na zona da mata mineira. Abstract 232. **Congr. Bras. Infect.**, Anais IX, Recife, 1996.

HARDEN, V.A. Rocky Mountain spotted fever. Baltimore: **Johns Hopkins University Press**, p. 8, 1990.

HATTWICK, M.A.W.; PETERS, A.H.; GREGG, M.B.; HANSON, B. Surveillance os Rocky Mountain spotted fever. **J. Amer. Med. Assoc**, Chicago, v.225, n.11, p.1338-43, 1973.

HAYES, S.F.; BURGDORFER, W. Reactivation of *Rickettsia rickettsii* in *Dermacentor andersoni* ticks: an ultrastructural analysis. **Infect. Immun.**, v.37, p.779-85. 1982.

HAYS, P.L. Rocky Mountain spotted fever in children in Kansas: the diagnostic value of an IgM-specific immunofluorescence assay. **J. Infect. Dis.**, v.151, p.369-70. 1985.

HELLMICK, C.G.; BERNARD, K.W.; D'ANGELO, L.J. Rocky Mountain spotted fever: clinical, laboratory, and epidemiological features of 262 cases. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.150, p.480-88, 1984.

HIGGINS, J.A.; RADULOVIC, S.; SCHIEFER, M.E.; AZAD, A.F. *Rickettsia felis*: a new specie of pathogenic *Rickettsia* isolated from cat fleas. **J. Clin. Microbiol.** v.34, n.3, p.671-74, 1996.

HOOGSTRAAL, H. Ticks in relation to human diseases caused by *Rickettsia* species. **Ann. Rev. Entomol.**, v.12, p.377-420, 1967.

HORTA, M.C.; LABRUNA, M.B.; PINTER, A.; LINARDI, P.M.; SCHUMAKER, T.T.S. *Rickettsia* infection in five areas of the state of São Paulo. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.102, n. 7, p. 793–801, 2007.

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 Zoon Dis.**, v.9, n.1, p.109-18, 2009.

HORTA, M.C.; OGRZEWALSKA, M.; AZEVEDO, M.C.; COSTA, F.B.; FERREIRA, F. e LABRUNA, M.B. *Ctenocephalides felis felis* from Five Geographic Regions of Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 91, n.1, p. 96–100, 2014.

HORTA M.C.; SCOTT F.B.; CORREIA T.R.; FERNANDES J.I.; RICHTZENHAIN L.J.; LABRUNA M.B. *Rickettsia felis* infection in cat fleas *Ctenocephalides felis felis*. **Braz. J. Microbiol**, v.41, n.3, p. 813-18, 2010.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Minas Gerais - Juiz de Fora. Cidades. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/xtras/perfil.php?lang=&codmun=313670&search=minas-gerais|juiz-de-fora> (acessado em 11 Janeiro 2015).

INOKUMA, H., OHNO, K., ONISHI, T., RAOULT, D., BROUQUI, P. Detection of ehrlichial infection by PCR in dogs from Yamaguchi and Okinawa Prefectures. Japan. **J. Vet. Med. Sci.** 63, 815-17. 2001.

ISHIKURA, M.; ANDO, S.; SHINAGAWA, Y.; MATSUURA, K.; HASEGAWA, S.; NAKAYAMA, T.; FUJITA, H.; WATANABE, M. Phylogenetic analysis of spotted fever group Rickettsiae based on *gltA*, 17-kDa, and *rOmpA* genes Amplified by nested PCR from ticks in Japan. **Microbiol. Immun.**, v.47, n.11, p.823-32, 2003.

JOHNSON, J.E and KADULL, P.J. Rocky Mountain spotted fever acquired in the laboratory. N Hazard Groupe ng **J. Med.**, V.277, p.842-47, 1967.

KATZ M.; DESPOMMIER, D.D.; GWADZ R.W. The Arthropods. The Arachnids. **Parasitic Dis.**, (2nd ed.), p.241-49, 1994.

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

KELLY, D.J.; OSTERMAN, J.V., STEPHENSON, E.H. Rocky Mountain spotted fever in areas of high and low prevalence. Survey for canine antibodies to spotted fever rickettsiae. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v.43, n.8, p.1429-31, 1982.

KENNY, M.J; BIRTLES, R.J.; DAY, M.J.; SHAW, S.E. *Rickettsia felis* in the United Kingdom. **Emerg. Infect. Dis.**, v.9, p.1023-24, 2003.

KENYON, R.H. and PEDERSEN, Jr., C.E. Preparation of vaccines of Rocky Mountain spotted fever from *Rickettsiae* propagated in cell culture. **J. Infect. Dis.**, v.52, p.125-46, 1982.

KIDD, L.; MAGGI, R.; DINIZ, P.P.; HEGARTY, B.; TUCKER, M.; BREITSCHWERDT, E. Evaluation of conventional and real-time PCR assays for detection and differentiation of spotted fever group *Rickettsia* in dog blood. **Vet. Microbiol.**, v.129, p.294–303. 2008.

KOCH, C.L. Systematische Übersicht über die Ordnung der Zecken. **Arch Naturgesch**, v.10, p.217-39, 1844.

KRAWCZAK, F.S. **Avaliação da dinâmica da infecção por *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica, agente etiológico de uma nova riquetsiose brasileira, em carrapatos *Amblyomma ovale* Koch, 1844 naturalmente infectados.** Dissertação- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2012.

LA SCOLA, B. and RAOULT, D. Laboratory diagnosis of Riquetsioses: current approaches to diagnosis of old and new Riquetsial diseases. **J. Clin. Microbiol.**, v.35, n.11, p.2715-27, 1997.

LABRUNA, M.B. Biologia-ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). In: XIII Congres. Bras. Parasitol. Vet., e Simp. Latino-Americanos de Rickettsioses, Ouro Preto, Minas Gerais, 2004. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.13, n.1, p.123-24, 2004.

LABRUNA, M.B. Epidemiologia da febre maculosa no Brasil e nas Américas. In: **Simpósio Brasileiro de Acarologia, Viçosa**. I. Anais... p.63-72, 2006.

LABRUNA, M.B. Ecology of *Rickettsia* in South America. Rickettsiology and Rickettsial Diseases-Fifth International Conference: **Ann. NY Acad. Sci.**, p.11, 2009.

LABRUNA, M.B.; KAMAKURA, O.; MORAES-FILHO, J.; HORTA, M.C.; PACHECO, R.C. Rocky Mountain spotted fever in dogs, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v.15, n.3, p.458-60, 2009.

LABRUNA, M.B.; KASAI, N.; FERREIRA, F.; FACCINI, J.L.H.; GENNARI, S.M. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) **J. Amer. Med. Assoc** horses in the state of São Paulo, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.105, p.65-77, 2002.

LABRUNA, M.B. e MACHADO, R.Z. Agentes transmitidos por carrapatos na região Neotropical. In: Barros-Battesti, D.M.; Arzua, M.; Bechara, G.H. (Org.). **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: um guia ilustrado para a identificação de espécies**. 1ª ed. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, p. 155-63, 2006.

LABRUNA, M.B.; MCBRIDE, J.W.; BOUYER, D.H.; CAMARGO, L.M.A.; CAMARGO, E.P.; WALKER D.H. Molecular evidence for a spotted fever group *Rickettsia* species in the tick *Amblyomma longirostre* in Brazil. **J. Med. Entomol.**, v.41, n.3, p.533-37, 2004b.

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

LABRUNA, M.B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M.C.; BOUYER, D.H.; MCBRIDE, J.W.; PINTER, A.; POPOV, V.; GENNARY, S.M.; WALKER, D.H. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the State of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. **J. Clin. Microbiol.**, v.42, n.1, p.90-8, 2004a.

LANE, R.S.; STUBBS H.A. Host-seeking behavior of adult *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) as determined by flagging vegetation. **J. Med. Entomol.**, v.27, n.3, p.282-87, 1990.

LEITE, R.C.; OLIVEIRA, P.R.; LOPES, C.M.L.; *et al.* A febre que vem do carrapato. *Amblyomma cajennense*, uma proposta de controle estratégico. **Vetores & Pragas**, Belo Horizonte, v.2, n.1, p.22-5. 1998.

LEMOS, E.R.S. **Aspectos epidemiológicos da riquetsiose do grupo da febre maculosa em uma área endêmica do estado de Minas Gerais, Brasil**. 164p. Dissertação- Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1991.

LEMOS, E.R.S. **Febre Maculosa Brasileira em uma área endêmica no município de Pedreira, São Paulo, Brasil**. 124p. Tese- Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1996.

LEMOS E.R.S. Diseases in Brazil. **Virus Rev. Res.**, v.7, p.7-16, 2002.

LEMOS, E.R.S. Rickettsioses. In: COURA, J.R., (1ª ed.). **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., p.1598-1609, 2005.

LEMOS, E R.S.; ALVARENGA, F.B.; CINTRA, M.L.; RAMOS, M.C.; PADDOCK, C.D.; FEREBEE, T.L. Spotted fever in Brazil: a seroepidemiological study and description of clinical cases in an endemic area in the State of São Paulo. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.65, n. 4, p.329-34. 2001.

LEMOS, E.R.S.; ALVARENGA, F.B.F.; CINTRA, M.L.; RAMOS, M.C.; PADDOCK, C.D.; FEREBEE, T.L.; ZAKI, S.R.; FERREIRA, F.C.C.; RAVAGNANI, R.C.; MACHADO, R.D.; GUIMARÃES, M.A.A.M.; COURA, J.F. Spotted fever in Brazil: a seroepidemiological study and description of clinical cases in an endemic area the state of São Paulo. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.65, n.4, p.329-34, 1996a.

LEMOS, E.R.S.; MACHADO, R.D.; COURA, J.R. Rocky Mountain spotted fever in an endemic área in Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.89, n.4, p.497-501, 1994.

LEMOS, E.R.S.; MACHADO, R.D.; COURA, J.R.; GUIMARÃES, M.A.A.; SERRA-FREIRE, N. M.; AMORIM, M.; GAZETA, G.S. Epidemiological aspects of the brazilian spotted fever: seasonal activity, of ticks collected in an endemic area in São Paulo, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.30, n.3, p.181-85, 1997b.

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 área of spotted fever in state of Minas Gerais, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.92, n.4, p.477-81, 1997a.

LEMOS, E.R.S.; MELLES, H.H.B.; COLOMBO, S.; MACHADO, R.D.; COURA, J.R.; GUIMARÃES, M.A.A.; SANSEVERINO, S.R.; MOURA, A. Primary isolation of spotted fever group *Rickettsiae* from *Amblyomma cooperi* collected from *Hydrochaeris hydrochaeris* in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.91, n.3, p.273-75, 1996b.

LEMOS, E.R.S.; ROZENTAL, T; VILLELA, C.L. Brazilian spotted fever: description of a fatal clinical case in the State of Rio de Janeiro. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.35, p.523-5, 2002.

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

LEMOS-MONTEIRO J. O “Typho exantemático” de São Paulo e suas relações com a febre maculosa das Montanhas Rochosas, à luz das provas de imunidade cruzada. **Mem. Inst. Butantã**, v.8, p.209-20, 1933b.

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

LEMOS-MONTEIRO, J.; FONSECA, F.; PRADO, A. Typho exantemático de São Paulo. Pesquisa do vírus em alguns artrópodos sob condições naturais. **Mem. Inst. Butantã**, v.16, n.8, p.170-72, 1932.

LOFTIS, A.D.; REEVES, W. K; SZUMLAS, D.E; ABBASSY, M.M.; HELMY, I.M.; MORIARITY, J.R. Surveillance of Egyptian fleas for agents of public health significance: *Anaplasma*, *Bartonella*, *Coxiella*, *Ehrlichia*, *Rickettsia*, and *Yersinia pestis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.75, p.41-8, 2006.

LOVING, S.M.; SMITH, A.B.; DISALVO, A.F.; BURGDORFER, W. Distribution and prevalence of spotted fever group *Rickettsiae* in ticks from South Carolina, with epidemiological survey of persons bitten by infected ticks. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.27, n.6 p.1255-60, 1978.

MACALUSO, K.R.; SONESHINE, D.E.; CERAUL, S.M. Rickettsial infection in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) inhibits transovarial transmission of a second *Rickettsia*. **J. Med. Entomol.**, v.39, n.6, p.809-13, 2002.

McDADE, J.E. and NEWHOUSE, V.F. Natural history of *Rickettsia rickettsii*. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 40, p. 287-309, 1986.

MAGALHÃES, O. Contribuição ao conhecimento das doenças do grupo do tifo exantemático. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, n.6, 1952.

MAGALHÃES, O.; ROCHA, A. Contribuição para o conhecimento do tifo exantemático neotrópico no Brasil **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.40, n.1, p.1-8, 1944.

MANCINI, D.A.P.; NASCIMENTO, E.M.M.; TAVARES, V.R.; SOARES, M.A. A ocorrência de riquetsioses do grupo *Rickettsia rickettsii*. **Rev. Saúde Públ.**, v.17, p.493-99, 1983.

MARRERO, M. and RAOULT, D. Centrifugation-shell vial technique for rapid detection of Mediterranean spotted fever *Rickettsia* in blood culture. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.40, p.197-9, 1989.

MÁRQUEZ, F.J.; MUNIAIN, M.A.; PÉREZ, J.M.; PACHÓN, J. Presence of *Rickettsia felis* in the cat flea form southwestern Europe. **Emerg. Infect. Dis.**, v.8, p.89-91, 2002.

MARTINS T.F.; ONOFRIO, V.C.; BARROS-BATTESTI, D.M.; LABRUNA, M.B. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescriptions and identification key. **Ticks and Tick-borne Diseases**. v.1 p.75-99, 2010.

MELLES, H.H.B.; COLOMBO, S.; LEMOS, E.R.S. Isolamento de *Rickettsia* em cultura de células vero. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.32, p.469-73, 1999.

MELLES, H.H.B.; COLOMBO, S.; SILVA, M.V. Febre maculosa: isolamento e *Rickettsia* em amostra de biópsia de pele. **Rev. Inst. Med. Trop. SP.**, v.34, n.1, p.37-41, 1992.

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

MONTEIRO, C.M.O; RODRIGUES, A.F.S.F.; CLEMENTE, M.A. Aspectos epidemiológicos dos casos de febre maculosa no município de Juiz de Fora, Minas Gerais. In: **XIV Congr. Bras. de Parasitol. Vet.; II Simp. Latino-Americano de Rickettsioses**. São Paulo, São Paulo, p.154-56, 2006.

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

MOREIRA, J.A.; MAGALHÃES, O. Thypho exanthematico em Minas Gerais. **Brasil Médico**, v.44, p.465-70, 1935.

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

MOURA, N.O. **Detecção e Caracterização Molecular de Riquetsias em Potenciais Vetores Procedentes de Focos Ativos de Febre Maculosa do Estado do Rio de Janeiro.** 78p. Dissertação. Universidade de São Paulo, 2011.

MOURA-MARTINIANO, N.O.; MACHADO-FERREIRA, E.; CARDOSO, K.M.; GEHRKE, F.S.; AMORIM, M.; FOGACA, A.C.; SOARES, C.A.G.; GAZÊTA, G.S.; SCHUMAKER, T.T.S. *Rickettsia* and Vector Biodiversity of Spotted Fever Focus, Atlantic Rain Forest Biome, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v.20, p.498-500, 2014.

NACIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. BLAST Assembled Ref Seq Genomes. Nucleotide Blast. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 23 jan. 2015.

NASCIMENTO, E.M.M. e SCHUMAKER, T.T.S. Isolamento e identificação de rickettsias no Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.13, p.193-196, 2004.

NAVA, S.; BEATI, L.; LABRUNA, M.B.; CÁCERES, A.G.; MANGOLD, A.J.; GUGLIELMONE, A.A. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinori* n. sp. and resurrection of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844 ad *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Dis.**, 2014.

NAVA, S.; ELSHENAW, Y.; EREMEEVA, M.E.; SUMNER, J.W.; MASTROPAOLO, M.; PADDOCK, C.D. *Rickettsia parkeri* in Argentina. **Emerg. Infect. Dis.**, v.14, p.1894-97, 2008.

NAVARRO, D.L.; NUNES, E.C. GUEDES, E.; AMORIM, M.; DAEMON, E.; DURÉ, A.Í.L.; DURÃES, L.S.; GAZÊTA, G.S. Inquérito sorológico de cães e equinos para FMB em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. **Anais do XVIII Cong. Bras. de Parasitol. Vet.** Gramado, Rio Grande do Sul, Brasil. 2014a.

NAVARRO, D.L.; NUNES, E.C.; GUEDES, E.; AMORIM, M.; DAEMON, E.; DURÉ, A.Í.L.; DURÃES, L.S. e GAZÊTA, G. S. Pesquisa de Riquetsias em cães e equinos na região do Médio Paraibuna, Minas Gerais, Brasil. **Anais do XVIII Cong. Bras. de Parasitol. Vet.** Gramado, Rio Grande do Sul, Brasil. 2014b.

NELSON, R.W. e CONTO, C.G. **Fundamentos de Medicina Interna de Pequenos Animais.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

NEWHOUSE, M.L.; BERRY, G. Patterns of mortality in asbestos factory workers in London. **Ann. NY Acad. Sci.**, Health Hazard, v.330, n.1, p.53-60, 1979.

NIEBYLSKI, M.L.; PEACOCK, M.G.; SCHWAN, T.G. Lethal effect of *Rickettsia rickettsii* on its tick vector (*Dermacentor andersoni*). **Appl. Environm. Microbiol.**, v.65, n.2, p.773-78, 1999.

NICE, C.S. The dissemination of human infectious diseases by birds. **Rev. Med. Microbiol.**, v.5, n.3, p.191-98, 1994.

NUNES, E.C.; NAVARRO, D.L.; GUEDES, E.; GAZÊTA, G.S.; DAEMON, E. Análise da circulação de potenciais vetores de Riquetsias em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. **Anais do XVIII Cong. Bras. de Parasitol. Vet.** Gramado, Rio Grande do Sul, Brasil. 2014.

OLIVEIRA, P.R. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae): avaliação de técnicas para o estudo de dinâmica populacional e biotecnologia. Dissertação- Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 1998.

OLIVEIRA, P.R. Biologia e controle de *Amblyomma cajennense*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Ouro Preto, v.23, supl.1, p.118-22, 2004.

OLIVEIRA, P.R.; BORGES, L.M.F.; LOPES, C.M.L.; LEITE, R.C. Population dynamics of free-living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari:Ixodidae) on pastures of Pedro Leopoldo, Minas Gerais State, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.92, n.4, p. 295-301, 2000.

OLIVEIRA, R.P.; GALVÃO, M.A.M.; MAFRA, C.L.; CHAMONE, C.B.; CALIC, S.B.; SILVA, S.U.; WALKER, D.H. *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides* spp. fleas, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v.8, n.3, p.317-19, 2002.

OLIVEIRA, K.A.; OLIVEIRA, L.S.; DIAS, C.C.A.; SILVA, JR. A.; ALMEIDA, M.R.; ALMADA, G.; BOUYER, D.H.; GALVÃO; M.A.M. e MAFRA, C.L. Molecular identification of *Rickettsia felis* in ticks and fleas from an endemic area for Brazilian Spotted Fever. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** v.103, n.2, p.191-94, 2008.

OLIVER, JR J. H. Induction of oogenesis and ovoposition in ticks. **Morf. Physiol. Behav. Biol. Ticks.** p.233-79, 1984.

OLSON, J.G. and MCDADE, J.E. *Rickettsia* and *Coxiella*. In: Murray P. R. **Man. Clin. Microbiol.**, 6ªed. Washington: Asm Press, p.678-84, 1994.

ONOFRIO, V.C., LABRUNA, M.B.; PINTER, A.; GIACOMIN, F.G.; BARROS-BATTESTI, D.M. Comentários e chaves para as espécies do gênero *Amblyomma*, p.53-113. In: Barros-Battesti, D.M.; Arzua, M.; Bechara, G.H. **Carrapatos de importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo: Vox/ICTTD-3Butantan, 2006.

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde. Organização Mundial da Saúde. Consulta de especialistas OPAS/OMS sobre rickettsioses nas Américas - Relatório Final. Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil, 18 - 19 de setembro de 2004. Disponível em: <http://bvs.panaftosa.org.br/textoc/Reuniao-rickett-port-rev.pdf> (acessado em 20 Setembro 2014).

PACHECO, R.C.; HORTA, M.C.; PINTER, A.; MORAES-FILHO, J.; MARTINS, T.F.; NARDI, M.S.; SOUZA, S.S.A.L.; SOUZA, C.E.; SZABÓ, M.P.J.; RICHTZENHAIN, L.J.; LABRUNA, M.B. Pesquisa de *Rickettsia* spp. em carrapatos *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* no Estado de São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 42, n. 3, p. 351-353, 2009.

PACHECO, R.C.; MORAES-FILHO, J.; GUEDES, E.; SILVEIRA, I.; RICHTZENHAIN, L.J.; LEITE, R.C.; LABRUNA, M.B. Rickettsial infections of dogs, horses and ticks in Juiz de Fora, southeastern Brazil, and isolation of *Rickettsia rickettsii* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **Med. Vet. Entomol.**, v.25, p.148-55, 2011.

PACHECO, R.C.; ROSA, S.; RICHTZENHAIN, L.; SZABÓ, M.P.J.; LABRUNA, M.B. Isolation of *Rickettsia bellii* from *Amblyomma ovale* and *Amblyomma incisum* ticks from Southern Brazil. **Rev. MVZ Córdoba**, v.13, p.1273-1279, 2008.

PACHECO, R.C.; VENZAL, J.M.; RICHTZENHAIN, L.J.; LABRUNA, M.B. *Rickettsia parkeri* in Uruguay. **Emerg. Infect. Dis.**, v.12, p.1804-05, 2006.

PADDOCK, C.D.; BRENNER, O.; VAID, C.; BOYD, D.B.; BERG, J.M.; JOSEPH, R.J.; ZAKI, S.R.; CHILDS, J.E. Short report: concurrent Rocky Mountain spotted fever in a dog and its owner. **Am J. Trop. Med. Hyg.**, v.66, n.2, p.197-99, 2002.

PADDOCK, C.D.; SUMMER, J.W.; COMER, J.A. et al. *Rickettsia parkeri*: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. **Clin. Infect. Dis.**, v.38, p.805-11, 2004.

PALMAS, C.; BORTOLETTI, G.; CONCHEDDA, M.; CONTINI, C.; GABRIELE, F.; ECCA, A.R. Study on immunobiology in ectoparasites of public health interest: *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasitologia** v.43, p.29-35, 2001.

PAROLA, P.; LABRUNA, M. B.; RAOULT, D. Tick-Borne Rickettsioses in America: Unanswered Questions and Emerging Diseases. **Cur Infec Dis Rep**, v.11, p.40-50, 2009.

PAROLA, P.; MILLER, R.S.; McDANIEL, P.; TELFORD, S.R. 3rd: ROLAIN, J.M.; WONGSRICHANALAI, C; RAOULT, D. Emerging rickettsioses of the Thai-Myanmar border. **Emer. Infect. Dis.**, v.9, n.5, p.592-95. 2003.

PAROLA, P.; PADDOCK, C.D.; RAOULT, D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. **Clin. Microbiol. Rev.**, n.18, p.719-56, 2005.

PAROLA, P.; SOCOLOVSCHI, C.; JEANJEAN, L.; BITAM, I.; FOURNIER, P.E.; SOTTO, A.; LABE, P.; RAOULT, D. Warmer weather linked to tick attack and emergence of severe rickettsioses. **PLoS. Negl. Trop. Dis.**, v.2, n.11, p. 338, 2008.

PASCALE, H. Rickettsiosis in São Paulo. Contribuição ao estudo da epidemiologia da febre maculosa e do tifo murino. In: **First Inter American Congress of Medicine, Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro, p. 5-37, 1946.

PDDU/JF- Plano Diretor de Desenvolvimento Urbano, Prefeitura Municipal de Juiz de Fora, 2004.

PEGRAM, R.G.; CLIFFORD, C.M.; WALKER, J.B.; KEIRANS, J.E. Clarification of the *Rhipicephalus sanguineus* group (Acari, Ixodoidea, Ixodidae). II. *R. sanguineus* (Latreille, 1806) and related species. **System. Parasitol.**, Dordrecht, v.10, p.27-44, 1987.

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.** 100p. Dissertação- Universidade Federal De Ouro Preto, Minas Gerais, 2006.

PEREIRA, M.; LABRUNA, M B. Febre Maculosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. **Rev. Clín. Vet.**, São Paulo, v.12, p.19-23, 1998.

PEREZ, C.A.; ALMEIDA, A. F.; ALMEIDA, A.; CARVALHO, V. H. B.; BALESTRIN, D. C.; GUIMARÃES, M.S.; COSTA, J.C.; RAMOS, L.A.; ARRUDA-SANTOS, A.D.; MÁXIMO-ESPÍNDOLA, C.P.; BARROS-BATTESTI, E.D. Carrapatos do gênero *Amblyomma spp.* e suas relações com os hospedeiros em área endêmica para Febre Maculosa de São Paulo. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, n.17, p.210-17, 2008.

PÉREZ-ARELLANO, J.L.; FENOLLAR, F.; ANGEL-MORENO, A.; BOLAÑOS, M.; HERNÁNDEZ, M.; SANTANA, E.; HEMMERSBACH-MILLER, M.; MARTIN, A.M.; RAOULT, D. Human *Rickettsia felis* infection, Canary Islands, Spain. **Emerg. Infect. Dis.**, v.11, n.2, p.1961-64, 2005.

PEREZ-OSORIO, C.E.; ZAVALA-VELAZQUEZ, J. E.; ARIASLEON, J. J.; ZAVALA-CASTRO, J.E. *Rickettsia felis* as emergent global threat for humans. **Emerg. Infect. Dis.**, v.14, n.7, p.1019-22, 2008.

PHILLIP, R.N.; CASPER, E.A.; BURGDORFER, W.; GERLOFF, R.K.; HUGHES, L.E.; BELL, E.J. Serologic typing of rickettsiae of the spotted fever group by microimmunofluorescence. **J. Clin. Biol.**, v.121, n.5, p.1961-68, 1978.

PHILLIP, R.N.; LANE, R.S.; CASPER, E.A Serotypes of tick-borne spotted fever group rickettsiae from Western California. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.30, p.722-27, 1981.

PINTER, A.; DIAS, R. A.; GENNARI, S. M.; LABRUNA, M. B. Study of the seasonal dynamics, life cycle, and host specificity of *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae). **J. Med. Entomol.**, v.41, n.3, p.324-32, 2004.

PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia belli* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Ann. NY Acad. Sci.**, v.1078, p.523-29, 2006.

PINTO, G.R.M. **Contagem de fezes como índice de abundância de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*).** 52p. Dissertação- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

PIRANDA, E.M.; FACCINI, J.L.; PINTER, A.; SAITO, T.B.; PACHECO, R.C.; HAGIWARA, M.K.; LABRUNA, M.B. Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical and laboratory findings. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.107, n.7, p.696-701, 2008.

PIZA, J.T. Considerações epidemiológicas e clínicas sobre o Tifo Exantemático de São Paulo. In: *Tifo Exantemático de São Paulo* (Piza, J.T.; Meyer, J.R.; e Salles-Gomes, L. org.), São Paulo: **Soc. Impres. Paulista**, p.11-119, 1932.

PIZA, J.T.; MEYER, J.R.; GOMES, L.S. Typho Exanthematico de São Paulo. São Paulo: **Soc. Impres. Paulista**; p.11-119, 1932.

PRICE, W.H. The Epidemiology of Rocky Mountain spotted fever: studies of the biological survival mechanisms of *Rickettsia rickettsii*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, n.60, p.292-319, 1954.

PUNG OJ, DURDEN LA, BANKS CW, JONES DN. Ectoparasites of opossums and raccoons in Southeastern Georgia. **J. Med. Entomol.**, v.31, p.15–19, 1994.

RAOULT, D.; FOURNIER, P.E.; ABOUD, P.; CARON, F. First documented human *Rickettsia aeschlimannii* infection. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, n. 7, p. 748-49, 2002.

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

RAOULT, D. and PAROLA, P. Rickettsial diseases. New York, London: CRC Press, 2007.

RAOULT, D.; PAROLA, P.; PADDOCK, C. D. Tick-bourne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. **Am. Soc. Microbiol.**, v.18, n.4, p.719-56, 2005.

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

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

REGNERY, R.L.; SPRUILL, C.L.; PLIKAYTIS, B.D. Genotypic identification of *Rickettsiae* and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. **J. Bacteriol.**, v.173, p.1576-89, 1991.

REHÁČEK, J. *Rickettsia slovacca*, the organism and its ecology. **Acta. Sci. Nat. Acad. Bohemoslov Brno**, v.18, p.1-50. 1984.

REHÁČEK, J. Ecological relationship between ticks and *Rickettsiae*. **Eur. J. Epidemiol.**, v.5, n.4, p.407-13, 1989.

REHÁČEK, J. *Rickettsiae* and their ecology in the Alpine region. **Acta. Virol.**, v.37, p. 290-301, 1993.

REHÁČEK, J. and TARASEVICH I.V. Ecological questions concerning *Rickettsiae*. **Eur. J. Epidemiol.**, v.7, p. 229–36, 1991.

REHÁČEK, J. and URVOLGYI, J. Towards more standardized methods in ecological studies of *Rickettsiae* in relation to their vectors and vertebrate hosts. **VII Inter. Congress Infect. Parasitic Dis.**, n.1, p.1-8, 1978.

REHÁČEK, J.; VOSTA, J.; TARASEVIC, I.V.; BREZINA, R.; JABLONSKAJA, V.A.; PLOTNIKOVA, L.F.; FETISOVA, N.F.; HANÁK, P.; Rickettsioses studies. 3. Natural foci of rickettsioses in south Bohemia. **Bull. Wld. Hlth. Org.**, v.55, p.455-61, 1977.

REHÁČEK, J.; ZUPANCICOVÁ, M.; Ác, P.; BREZINA, R.; ÚRVÖLGYI, J.; KOVÁKOVÁ, E.; TARASEVIC, I.V.; JABLONKAJA, V.A.; POSPÍŠIL, R.; BALOHOVÁ, D. Rickettsioses studies. 2. Natural foci of rickettsioses in east Slovakia. **Bull. Wld. Hlth. Org.**, v.53, p.31-38, 1976.

RICHTER, J.; FOURNIER, P.E.; PETRIDOU, J.; HÄUSSINGER, D.; RAOULT, D. *Rickettsia felis* infection acquired in Europe and documented by polymerase chain reaction. **Emerg. Infect. Dis.**, v.8, n.2, p. 207-08, 2002.

RODRIGUES, A.F.S.F.; DAEMON, E.; D'AGOSTO, M. Investigação sobre alguns ectoparasitos em cães de rua no município de Juiz de Fora, Minas Gerais. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.10, n.1, p.13-19, 2001.

RODRIGUES, D.F.; DAEMON, E.; RODRIGUES, A.F.S.F. Caracterização da população de ectoparasitos em cães de núcleos de expansão urbana de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, V.17, P.185-88, 2008b.

RODRIGUES, A.F.S.F.; MONTEIRO, C.M.O.; CLEMENTE, M.A. Estudo epidemiológico da Febre Maculosa em Juiz de Fora, Minas Gerais. **Rev. Est. Cient.**, v.5, p.1-9, 2008a.

ROUX, V.; FOURNIER, P.E. ; RAOULT, D. Differentiation of spotted fever group rickettsiae by sequencing and analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA of the gene encoding the protein *rOmpA*. **J. Clin. Microbiol.** v.34, p.2058–65, 1996.

ROUX, V. and RAOULT, D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein *rOmpB*. **Internat. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.50, p.1449-55, 2000.

ROUX, V.; RYDKINA, E.; EREMEEVA, M.; RAOULT, D. Citrate Synthase Gene Comparison, a New Tool for Phylogenetic analysis, and its application for the Rickettsiae. **Intern. J. Syst. Bacteriol.**, v.47, n.2, p.252-61, 1997.

ROZENTAL, T. **Circulação de Rickettsia do grupo da febre maculosa no município de Barra do Piraí, Rio de Janeiro.** 90p. Dissertação- Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2003.

ROZENTAL, T., BUSTAMANTE, M.C., AMORIN, M., SERRA-FREIRE, N.M.; LEMOS, E.R.S. Evidence of spotted fever group Rickettsiae in state of Rio de Janeiro, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v.44, n.3, p.155-58, 2002.

SAITO, T. B.; CUNHA-FILHO, N. A.; PACHECO, R. C. Canine infection by Rickettsiae and Ehrlichiae in southern Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v.79, p.102-08, 2008.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. (3nded.) **NY: Cold Spring Harbor Lab. Press.** 2001.

SANGIONI, L.A.; HORTA, M. C.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. M.; GALVÃO, M. A. M.; SCHUMAKER, T. T. S.; FERREIRA, F.; VIDOTTO, O.; LABRUNA,

M. B. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. **Emerg. Infect. Dis.**, v.11, n.2, p.265-70, 2005.

SCHRIEFER, M.E; and AZAD, A.F. Changing ecology of Rocky Mountain spotted fever. In: Sonenshine, D.E.; Mather, T.N.; eds. *Ecological Dynamics of Tick-Borne Zoonoses*. Oxford: **Oxford University Press**, p.314-26, 1994.

SCHRIEFER, M.E.; SACCI, J.B. JR.; DUMLER, J.S.; BULLEN, M.G.; AZAD, A.F. Identification of a novel rickettsial infection in a patient diagnosed with murine typhus. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, n.4, p.949-54, 1994.

SCHWAN, T.G. Ticks and *Borrelia*: model systems for investigating pathogen-arthropod interactions. **Infect. Agents Dis.** v.5, n.3, p.167-81, 1996.

SEKEYOVÁ, Z.; FOURNIER, P.E.; REHÁČEK, J.; RAOULT, D. Characterization of a new spotted fever group *Rickettsia* detected in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) collected in Slovakia. **J. Med. Entomol.**, v.37, n.4, p.707-13, 2000.

SERRA-FREIRE, N.M.S. Epidemiologia de *Amblyomma cajennense*: ocorrência estacional e comportamento dos estádios não parasitários em pastagens do estado do Rio de Janeiro. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v. 5, n. 2, p. 187-93. 1982.

SERRA-FREIRE, N.M. Acari: Os carrapatos. In: Rey, L. (ed.). **Parasitologia**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.650-56, 1991.

SEXTON, D.J.; BURGDORFER, W.; THOMAS, L.; NORMENT, B.R. Rocky Mountain spotted fever in Mississippi: survey for spotted fever antibodies in dogs and for spotted fever group rickettsiae in dog ticks. **Am. J. Epidemiol.**, v.103, p.192-97, 1976.

SEXTON, D.J.; GALLISHIA, H.A.; MCRAE, J.R.; KATE, T.R. Possible needle associated Rocky Mountain spotted fever. **N. Engl. J. Med.**, v.292, p.645, 1975.

SEXTON, D.J.; MUNIZ, M.; COREY, G.R.; BREITSCHWERDT, E.B.; HEGARTY, B.C.; DUMLER, S.; WALKER, D.H.; PEÇANHA, P.M.; DIETZE, R. Brazilian spotted fever in Espírito Santo, Brazil: description of a focus of infection in a new endemic region. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.49, n.2, p.222-26, 1993.

SHPYNOV, S.; FOURNIER, P.E.; RUDAKOV, N.; RAOULT, D. "*Candidatus Rickettsia tarasevichiae*" in *Ixodes persulcatus* ticks collected in Russia. **Ann. NY Acad. Sci.**, v.990, p.162-72, 2003.

SILVA, L.J., Organização do espaço e doença. In: **Textos de Apoio. Epidemiologia I** (Carvalho, J.R. org.), Rio de Janeiro: Programa de Educação Continuada/Escola Nacional de Saúde Pública/Abrasco, p.159-85, 1985.

SILVA, C.V. **A utilização da vegetação urbana na amenização do desconforto ambiental**. 60p. Monografia- Universidade Federal de Juiz de Fora Instituto de Ciências Humanas Curso de Geografia, 2010.

SILVA, A.B. **Estudo Soro-Epidemiológico e Molecular da Infecção por *Rickettsia* spp. Em Cães de Ambiente Urbano e Rural na Mesorregião do Oeste Maranhense, Microrregião de Imperatriz, Brasil.** 76p. Dissertação- Universidade Estadual Do Maranhão, Centro De Ciências Agrárias, Mestrado Em Ciência Animal, 2012.

SILVA e GALVÃO, Epidemiologia das riquetsioses do gênero *Rickettsia* no Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.13, supl.1, 2004.

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

SILVEIRA, I.; PACHECO, R.C.; SZABÓ, M.P.J. et al. *Rickettsia parkeri* in Brasil. **Emerg. Infect. Dis.**, v.13, p.1111-13, 2007.

SILVERMAN, D.J.; SANTUCCI, L.A.; MEYERS, N.; SEKEYOVÁ, Z. Penetration of host cells by *Rickettsia rickettsii* appears to be mediated by a phospholipase of rickettsial origin. **Infect. Immun.**, v.60, p.2733-40, 1992.

SLOSS, M.W.; ZAJAC, A.M.; RUSSEL, L.K. **Parasitol. Clín. Vet.** 6ªed. São Paulo, Ed. Manole, 1999.

SMITH, J.E. and DUNN, A.M. Transovarial transmission. **Parasitol. Today.** v.7, n.6, p.146-48, 1991.

SMITH, R.C.; GORDON, J.C.; GORDON, S.W.; PHIPLIP, R.N. Rocky Mountain spotted fever in an urban canine population. **J. Amer. Med. Assoc.**, Chicago, v.183, n.12, p.1451-53, 1983.

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

SONENSHINE, D.E., PETERS, A.H.; LEVY, G.F. Rocky Mountain spotted fever in relation to vegetation in the eastern United States, 1951-1971. **Am. J. Epidemiol.** v.56, p.59-69, 1972.

SOUZA, A.P. **Variação Populacional dos Principais ixodídeos Parasitas de Bovinos e Equinos em Diferentes Condições de Manejo, nos municípios de Paracambi e Itaguaí no estado do Rio de Janeiro.** 103p. Tese- Doutorado em Parasitologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 1990.

SOUZA, C.E.; CALLE, S.B.; CAMARGO, M.C. G.O. O papel da *Capivara Hydrochaeris hydrochaeris* na cadeia Epidemiológica da Febre Maculosa Brasileira. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Ouro Preto, v. 23, supl.1, p.203-04, 2004.

SOUZA, C.E., SOUZA, S.S.L., LIMA, V.L.C., CALIC, S.B., CAMARGO, M.C.G.O., SAVANI, E.S.M.M., D'AURIA, S.R.N., LINHARES, A.X. & YOSHINARI, N.H. Serological identification of *Rickettsia* spp from the Spotted Fever group in capybaras in the region of Campinas - SP - Brazil. **Ciência Rural**, v. 38, n. 6, p. 1694-99, 2008.

SOUZA, S.S.A.L.; SOUZA, C.E.; NETO, E.J.R.; PRADO, A.P. Dinâmica sazonal de carrapatos (Acari: Ixodidae) na mata ciliar de uma área endêmica para febre maculosa na região de Campinas, São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v.36, n.3, P.887-91, 2006.

SQUIRE, F.A. Entomological problems in Bolívia. **Pans.**, v.18, p.249-68, 1972.

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

SUCEN-Superintendência de Controle de Endemias-SP. Febre Maculosa: informações para profissionais da saúde. Disponível em: <http://www.sucen.sp.gov.br> (acessado em 20 Setembro 2014).

SVS- Secretaria de Vigilância em Saúde. Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional. **Ministério da Saúde**, Brasil. 2001.

SVS- Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância Epidemiológica Nacional da Febre Maculosa Brasileira e Outras Rickettsioses. **Ministério da Saúde**, Brasil. 2011.

SVS- Secretaria de Vigilância em Saúde. Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional. **Ministério da Saúde**, Brasil. 2014.

SZABÓ, M.P.J.; CUNHA, T.M.; PINTER, A.; VICENTINI, F. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. **Exp. Appl. Acarol.**, v.25, p.909-16, 2001.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. **MEGA5**: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molec. Biol. Evol.**, v.28, n.10, p.2731-39, 2011.

THOMPSON, J.; HIGGINS, D.; GIBSON, T.; CLUSTAL, W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucl. Acids. Res.**, v.22, p.4673-90, 1994.

TIRIBA, A.C. Geografia médica das riquetsioses. In: Lacaz, C.S.; Baruzzi, R.G.; Siqueira, Jr. W. (eds). **Introdução à geografia médica do Brasil**. São Paulo: Edgard Blücher/Edusp; p. 388-97, 1972.

TIRIBA, A.C.; GODOY, C.V.; BRITO, T.; FORDÃO, F.M.; PENNA, D.O.; SOUZA, A.R. Febre maculosa em São Paulo. Resultados terapêuticos em alguns casos com laurilsulfato de tetraciclina. **Rev. Inst Med. Tropical SP.**, v.10, n.4, p.256-61, 1968.

TIRIBA, A.C.; MONTEIRO, E.V.L. Rickettsioses, In Doenças Infecciosas e Parasitárias, 7ª edição, Veronessi, R. (editor), p. 212-32, 1982.

TOLEDO, R.S.; TAMEKUNI, K.; HAYDU, V.B.; VIDOTTO, O. Dinâmica sazonal de carrapatos do gênero *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) em um parque urbano da cidade de Londrina, Paraná. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.17, supl.1, p.50-54. 2008.

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

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

TRAVASSOS, J., VALLEJO-FREIRE A. Criação artificial de *Amblyomma* para preparo vacina contra febre maculosa **Mem. Inst. Butantã**, v.18, p.145-235, 1944-1945.

TSAI, Y.S.; WU, Y.H.; KAO, P.T.; LIN, Y.C. African tick bite fever. **J. Formosan. Med. Assoc.** v.107n.1, p.73-76, 2008.

TURNER, R.C.; CHAPLINSKI, T.J.; ADAMS, H.G. Rocky Mountain spotted fever presenting as thrombotic thrombocytopenic purpura. **Am. J. Med.**, v.81, p.153-7, 1986.

TYERYAR, F.J.J., WEISS, E.; MILLAR, D.B., BOZEMAN, F.M.; ORMSBEE, R.A. DNA base composition of Rickettsiae. **Science**, v.180, p.415-17, 1973.

VALBUENA, G.; WALKER, D.H. The Endothelium as a Target for Infections. **Ann. Rev. Pathol. Mechan. Dis.**, v.1, p.171-98, 2006.

VENZAL, J.M.; PORTILLO, A.; ESTRADA-PEÑA, A.; CASTRO, O.; CABRERA, P.A.; OTEO, J.A. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma triste* from Uruguay. **Emerg. Infect. Dis.**, v.10, p.1493-95, 2004.

VERONESI, R. e FOCACCIA, R. **Tratamento de infectologia**. São Paulo: Atheneu, 1996.

VIEIRA, A.M.L.; SOUZA, C.E; LABRUNA, M.B.; MAYO, R.C; SOUZA, S.S.A.L; CAMARGO_NEVES, V.L.F. **Man. Vig. Acarol**. Estado de São Paulo. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 2004.

VIANNA, M.C.B. **Pesquisa de infecção por riquetsias do grupo da febre maculosa em humanos, cães, equídeos e em adultos de carrapatos *Amblyomma cajennense* em uma área endêmica do estado de Minas Gerais**. 67p. Dissertação- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo. 2002.

VITALE, G.; MANSUETO, S.; ROLAIN, J.M.; RAOULT, D. *Rickettsia massiliae* Human Isolation. **Emerg. Infect. Dis.**, v.12, p.174-75, 2006.

VRANJAC, A. Varicela, difteria e febre maculosa: aspectos epidemiológicos no Estado de São Paulo. **Rev. Saúde Púb.**, São Paulo, v.37, n.6, p.817-20, 2003.

WALKER, D.H. Pathology and pathogenesis of the vasculotropic rickettsioses, in: **Biology of Rickettsial Dis.**, Volume I (D.H. Walker, ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, p.115-38, 1988.

WALKER, D.H. Rickettsioses of the spotted fever group around the world. **J. Dermatol.**, v.16, p.69-177, 1989.

WALKER, D. and BOUYER, D.H. Rickettsia. In: Murray, P.R.; Baron, E.J.; Jorgensen, J.H.; Tenover, M.C.; Tenover, R.H. (eds.) **Man. Clin. Microbiol.** Washington: ASM Press, p.1005-14, 2003.

WALKER, D.H. and DASCH, G.A. Classification and identification of *Chlamydia*, *Rickettsia*, and related bacteria. In: Murray, P.R. **Man. Clin. Microbiol.** ASM Press. Washington. 6^a ed., p.665-68, 1994.

WALKER, D.H.; FIRTH, W.T.; EDGELL, C.J.S. Human endothelial cell culture plaques induced by *Rickettsia rickettsii*. **Infect. Immu.**, v.37, n.1, p.301-06, 1982.

WALKER, D.H.; MATTERN, W.D: Rickettsial vasculitis. **Am. Heart J.**, v.100, p.896-906, 1980.

WEBB, L.; CARL, M.; MALLOY, D.C.; DASCH, G.A.; AZAD, A.F. Detection of murine typhus infection in fleas by using the polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v.28, p.530-34, 1990.

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

WEISS, E. and MOULDER, J.W. Order I. Rickettsiales, Gieszczkiewick 1939, 25AL. N.R. Krieg (Ed.), **Bergey's Man. Syst. Bacteriol.** The Williams and Wilkins Co., Baltimore: v.1, p.687-727, 1984.

WEISS, E.; NELSON, W.N.; DASCH, G.A. Biochemistry of Rickettsiae: recent advances. **Acta. Virol.**, n.31, p.711-17, 1987.

WEISS, E.; STRAUSS B. The life and career of Howard Taylor Ricketts. **Rev. Infect. Dis.**, v.13, p.1241-42, 1991.

WELLS, G.A.; WOODWARD, T.E.; FISET, P.; HORNICK, R.B. Rocky Mountain spotted fever caused by blood transfusion. **J. Amer. Med. Assoc.** v.239, p.2763-65, 1978.

WEYER, F. Progresses in ecology and epidemiology of rickettsiosis. A review. **Acta Trop.**, Basel, v.35, p.5-21, 1978.

WHO. World Health Organization. Laboratory diagnosis of Rickettsial diseases. **World Health Organization.** v.66, p.283-420, 1988.

WHO. World Health Organization. The vector-borne human infections of Europe: their distribution and burden in public health. **World Health Organization**, Geneva, 2004.

WILSON, L.B. and CHOWNING, W.M. **Jour. Infect. Dis.**, v.1, p.31, 1904.

WILSON, J.G.; KINGER, D.R.; SAUER, J.R.; HAIR, J.A. Chemo-attraction in the lone star tick (Acarina: Ixodidae). I. Response of different developmental stages to carbon dioxide administered via traps. **J. Med. Entomol.**, v.9, n.3, p.245-52, 1972.

WOLBACH, S.B. Studies on Rousky Mountain spotted fever. **J. Med. Res.**, v.41, n.1, 1919.

YU, X.J. and WALKER, D.H. The Order Rickettsiales. *In*: Dworkin, M. (ed.) **The Prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiology community**. 3rd ed. New York: Springer-Verlag, 2003. Disponível no site: <<http://link.springer.ny.com/link/service/books/10125>> Acesso em 22 de nov de 2014.

ZAKY, M.H. Selected tick-borne infections. A review of Lyme disease, Rocky Mountain spotted fever, and babesiosis. **NY. State J. Med.**, New York, v.89, n.6, p. 320-35, 1989.

ZAVALA-CASTRO, J. E.; ZAVALA-VELÁZQUEZ, J. E.; WALKER, D. H.; RUIZ ARCILA, E. E.; LAVIADA-MOLINA, H.; OLANO, J. P.; RUIZ-SOSA, J. A.; SMALL, M. A.; DZUL-ROSADO, K. R. Fatal human infection with *Rickettsia rickettsii*, Yucatán, México. **Emerg. Infect. Dis.**, v.12, n.4, p.672-74, 2006.

ZNAZEN, A.; ROLAIN, J.M.; HAMMAMI, A.; JEMAA, M.B.; RAOULT, D. *Rickettsia felis* infection, Tunisia. **Emerg. Infect. Dis.**, v.12, n.1, p.138-40, 2006.

LIC
5483B T A A T G A T T T T A C T A A A A A G G T T G C T C A T C A T G C G T T A G T T A A T G A A A G A T T A C A T T A T T T [300]

LIS
551A A T T T C A A A C A T T T T G T A G C T C T T C T C A T C C T A T G G C T A T T A T G C T T G C G G C C G T T G G T T C [360]
LIS 548A A T T T C A A A C A T T T T G T A G C T C T T C T C A T C C T A T G G C T A T T A T G C T T G C G G C C G T T G G T T C [360]
LIS 547A A T T T C A A A C A T T T T G T A G C T C T T C T C A T C C T A T G G C T A T T A T G C T T G C G G C C G T T G G T T C [360]
LIS 551B A T T T C A A A C A T T T T G T A G C T C T T C T C A T C C T A T G G C T A T T A T G C T T G C G G C C G T T G G T T C [360]
LIS 552A A T T T C A A A C A T T T T G T A G C T C T T C T C A T C C T A T G G C T A T T A T G C T T G C G G C C G T T G G T T C [360]
LIS 551C A T T T C A A A C A T T T T G T A G C T C T T C T C A T C C T A T G G C T A T T A T G C T T G C G G C C G T T G G T T C [360]
LIS 549A A T T T C A A A C A T T T T G T A G C T C T T C T C A T C C T A T G G C T A T T A T G C T T G C G G C C G T T G G T T C [360]

LIS 548E A T T T C A A A C A T T T T G T A G C T C T T C T C A T C C T A T G G C T A T T A T G C T T G C G G C C G T T G G T T C [360]
LIS 549B A T T T C A A A C A T T T T G T A G C T C T T C T C A T C C T A T G G C T A T T A T G C T T G C G G C C G T T G G T T C [360]
LIS 552B A T T T C A A A C A T T T T G T A G C T C T T C T C A T C C T A T G G C T A T T A T G C T T G C G G C C G T T G G T T C [360]
LIC 5483B A T T C C A A A C G T T T T G T A G C T C T T C G C A T C C T A T G G C T A T T A T G C T T G C G G C G G T T G G T T C [360]

LIS
551A T C T T T C G G C A T T T T A T C C T G A T T T A T T G A A T T - - - - - [403]
LIS 548A T C T T T C G G C A T T T T A T C C T G A T T T A T T G A A T - - - - - [403]
LIS 547A T C T T T C G G C A T T T T A T C C T G A T T T A T T G A A T T - - - - - [403]
LIS 551B T C T T T C G G C A T T T T A T C C T G A T T T A T T G A A T T - - - - - [403]
LIS 552A T C T T T C G G C A T T T T A T C C T G A T T T A T T G A A T T - - - - - [403]
LIS 551C T C T T T C G G C A T T T T A T C C T G A T T T A T T G A A T - - - - - [403]
LIS 549A T C T T T C G G C A T T T T A T C C T G A T T T A T T G A A T T - - - - - [403]

LIS 548E T C T T T C G G C A T T T T A T C C T G A T T T A T T G A A T T - - - - - [403]
LIS 549B T C T T T C G G C A T T T T A T C C T G A T T T A T T G A A T T T T A A G G A A G C A [403]
LIS 552B T C T T T C G G C A T T T T A T C C T G A T T T A T T G A A T T T T A A G G A A G C A [403]
LIC 5483B T C T T T C T G C A T T T T A T C C T G A T T T A T T G A A T T - - - - - [403]

LIS
551D A A G A A C C G T A A C T G C T G A T G G T G C A G A G C T T G C A G C C G G A A C A A A T A T A G G T C C T G G A G C] [180

LIS
549A A A G A A C C G T A A C T G C T G A T G G T G C A G A G C T T G C A G C C G G A A C A A A T A T A G G T C C T G G A G C] [180

LIS
551B C G G T G C T T T T G T A G C G G G T T C T A C T T T A C A A T A T A C C G G T G C T T T T A C G G T T A C T G A T G C] [240

LIS
552A C G G T G C T T T T G T A G C G G G T T C T A C T T T A C A A T A T A C C G G T G C T T T T A C G G T T A C T G A T G C] [240

LIS
551C C G G T G C T T T T G T A G C G G G T T C T A C T T T A C A A T A T A C C G G T G C T T T T A C G G T T A C T G A T G C] [240

LIS
550 C G G T G C T T T T G T A G C G G G T T C T A C T T T A C A A T A T A C C G G T G C T T T T A C G G T T A C T G A T G C] [240

LIS
551A C G G T G C T T T T G T A G C G G G T T C T A C T T T A C A A T A T A C C G G T G C T T T T A C G G T T A C T G A T G C] [240

LIS
551D C G G T G C T T T T G T A G C G G G T T C T A C T T T A C A A T A T A C C G G T G C T T T T A C G G T T A C T G A T G C] [240

LIS
549A C G G T G C T T T T G T A G C G G G T T C T A C T T T A C A A T A T A C C G G T G C T T T T A C G G T T A C T G A T G C] [240

LIS
551B T G A C G T A A G T G T T C G T G C A T T A G A T T T A A A T A A T T T T G C A G C A G G T C T T T T T T C A G T A A C] [300

LIS
552A T G A C G T A A G T G T T C G T G C A T T A G A T T T A A A T A A T T T T G C A G C A G G T C T T T T T T C A G T A A C] [300

LIS
551C T G A C G T A A G T G T T C G T G C A T T A G A T T T A A A T A A T T T T G C A G C A G G T C T T T T T T C A G T A A C] [300

LIS
550 T G A C G T A A G T G T T C G T G C A T T A G A T T T A A A T A A T T T T G C A G C A G G T C T T T T T T C A G T A A C] [300

LIS
551A T G A C G T A A G T G T T C G T G C A T T A G A T T T A A A T A A T T T T G C A G C A G G T C T T T T T T C A G T A A C] [300

LIS
551D T G A C G T A A G T G T T C G T G C A T T A G A T T T A A A T A A T T T T G C A G C A G G T C T T T T T T C A G T A A C] [300

LIS
549A T G A C G T A A G T G T T C G T G C A T T A G A T T T A A A T A A T T T T G C A G C A G G T C T T T T T T C A G T A A C] [300

LIS
551B T G G T G A T A T T T C A T T A G G T T C A G T G G T A G A T A C G G G A G G A G C T A A T A A A C T T G C A G T T A A] [360

LIS
552A T G G T G A T A T T T C A T T A G G T T C A G T G G T A G A T A C G G G A G G A G C T A A T A A A C T T G C A G T T A A] [360

LIS
 551C T G G T G A T A T T T C A T T A G G T T C A G T G G T A G A T A C G G G A G G A G C T A A T A A A C T T G C A G T T A A [360
]

LIS
 550 T G G T G A T A T T T C A T T A G G T T C A G T G G T A G A T A C G G G A G G A G C T A A T A A A C T T G C A G T T A A [360
]

LIS
 551A T G G T G A T A T T T C A T T A G G T T C A G T G G T A G A T A C G G G A G G A G C T A A T A A A C T T G C A G T T A A [360
]

LIS
 551D T G G T G A T A T T T C A T T A G G T T C A G T G G T A G A T A C G G G A G G A G C T A A T A A A C T T G C A G T T A A [360
]

LIS
 549A T G G T G A T A T T T C A T T A G G T T C A G T G G T A G A T A C G G G A G G A G C T A A T A A A C T T G C A G T T A A [360
]

LIS
 551B T A T T G A T G A T G G T T T A A C C T T A A C T T T A A C A G G T A C C G G T A C T G C A G C C T A C G G T G C A A A [420
]

LIS
 552A T A T T G A T G A T G G T T T A A C C T T A A C T T T A A C A G G T A C C G G T A C T G C A G C C T A C G G T G C A A A [420
]

LIS
 551C T A T T G A T G A T G G T T T A A C C T T A A C T T T A A C A G G T A C C G G T A C T G C A G C C T A C G G T G C A A A [420
]

LIS
 550 T A T T G A T G A T G G T T T A A C C T T A A C T T T A A C A G G T A C C G G T A C T G C A G C C T A C G G T G C A A A [420
]

LIS
 551A T A T T G A T G A T G G T T T A A C C T T A A C T T T A A C A G G T A C C G G T A C T G C A G C C T A C G G T G C A A A [420
]

LIS
 551D T A T T G A T G A T G G T T T A A C C T T A A C T T T A A C A G G T A C C G G T A C T G C A G C C T A C G G T G C A A A [420
]

LIS
 549A T A T T G A T G A T G G T T T A A C C T T A A C T T T A A C A G G T A C C G G T A C T G C A G C C T A C G G T G C A A A [420
]

LIS
 551B T C C T G C G T T G T T A T T C C A A G G T G G A C A A G C T G C T G C T A A T A A T A C A T A T A C T G C T T T A G G [480
]

LIS
 552A T C C T G C G T T G T T A T T C C A A G G T G G A C A A G C T G C T G C T A A T A A T A C A T A T A C T G C T T T A G G [480
]

LIS
 551C T C C T G C G T T G T T A T T C C A A G G T G G A C A A G C T G C T G C T A A T A A T A C A T A T A C T G C T T T A G G [480
]

LIS
 550 T C C T G C G T T G T T A T T C C A A G G T G G A C A A G C T G C T G C T A A T A A T A C A T A T A C T G C T T T A G G [480
]

LIS
 551A T C C T G C G T T G T T A T T C C A A G G T G G A C A A G C T G C T G C T A A T A A T A C A T A T A C T G C T T T A G G [480
]

LIS
 551D T C C T G C G T T G T T A T T C C A A G G T G G A C A A G C T G C T G C T A A T A A T A C A T A T A C T G C T T T A G G [480
]

LIS
 549A T C C T G C G T T G T T A T T C C A A G G T G G A C A A G C T G C T G C T A A T A A T A C A T A T A C T G C T T T A G G [480
]

LIS 551B T A A T A T A A C T C T A G G T G G A G C G A A T G C C G G T T T G A C T A T T G C T T C A G A T C C A G A T G T A T T [540]

LIS 552A T A A T A T A A C T C T A G G T G G A G C G A A T G C C G G T T T G A A T A T T G C T T C A G A T C C A G A T G T A T T [540]

LIS 551C T A A T A T A A C T C T A G G T G G A G C G A A T G C C G G T T T G A C T A T T G C T T C A G A T C C A G A T G T A T T [540]

LIS 550 T A A T A T A A C T C T A G G T G G A G C G A A T G C C G G T T T G A C T A T T G C T T C A G A T C C A G A T G T A T T [540]

LIS 551A T A A T A T A A C T C T A G G T G G A G C G A A T G C C G G T T T G A C T A T T G C T T C A G A T C C A G A T G T A T T [540]

LIS 551D T A A T A T A A C T C T A G G T G G A G C G A A T G C C G G T T T G A C T A T T G C T T C A G A T C C A G A T G T A T T [540]

LIS 549A T A A T A T A A C T C T A G G T G G A G C G A A T G C C G G T T T G A C T A T T G C T T C A G A T C C A G A T G T A T T [540]

LIS 551B A G G A C C A A T A A C G C T T G C A G G A A A T A T A G A T G G A G G A G G T A T A A T A A C T G A C A A T A C A G A [600]

LIS 552A A G G A C C A A T A A C G C T T G C A G G A A A T A T A G A T G G A G G A G G T A T A A T A A C T G A C A A T A C A G A [600]

LIS 551C A G G A C C A A T A A C G C T T G C A G G A A A T A T A G A T G G A G G A G G T A T A A T A A C T G A C A A T A C A G A [600]

LIS 550 A G G A C C A A T A A C G C T T G C A G G A A A T A T A G A T G G A G G A G G T A T A A T A A C T G A C A A T A C A G A [600]

LIS 551A A G G A C C A A T A A C G C T T G C A G G A A A T A T A G A T G G A G G A G G T A T A A T A A C T G A C A A T A C A G A [600]

LIS 551D A G G A C C A A T A A C G C T T G C A G G A A A T A T A G A T G G A G G A G G T A T A A T A A C T G A C A A T A C A G A [600]

LIS 549A A G G A C C A A T A A C G C T T G C A G G A A A T A T A G A T G G A G G A G G T A T A A T A A C T G A C A A T A C A G A [600]

LIS 551B T G C T G C C A T T - - - - - [660]

LIS 552A T G C T G C C A T T A A C G G - - - - - [660]

LIS 551C T G C T G C C A T T A A C G G A - - - - - [660]

LIS 550 T G C T G C C A T - - - - - [660]

LIS
551A T G C T G C C - - - - - [660
]]

LIS
551D T G C T G C C A T T - - - - - [660
]]

LIS
549A T G C T G C C A T T A A C G G A A C A A A T A G A T G C T G C C A T T A A C G G A A C A G A T G C T G C C A T T A A C G [660
]]

LIS
551B - - - - - [665]
LIS
552A - - - - - [665]
LIS
551C - - - - - [665]
LIS
550 - - - - - [665]
LIS
551A - - - - - [665]
LIS
551D - - - - - [665]
LIS
549A G A A C A [665]

