

KAREN MEDEIROS CARDOSO

**DETECÇÃO DE RIQUÉTSIAS DO GRUPO FEBRE MACULOSA EM
CÃES E ECTOPARASITAS DE MUNICÍPIOS DO
ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

Dissertação apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Profa. Dra. Teresinha Tizu Sato Schumaker

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2013

RESUMO

CARDOSO, K. M. **Detecção de riquetsias do Grupo Febre Maculosa em cães e ectoparasitas de municípios do estado do Rio de Janeiro.** 2013. 75 f. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Riquetsioses são zoonoses com manifestações epidêmicas, variando segundo características de ecótopo, atividade humana e bio-ecologia de vetores. A maioria dos casos de Febre Maculosa Brasileira (FMB) ocorrem na região sudeste do país. O estado do Rio de Janeiro (RJ) apresenta várias unidades de conservação do bioma Mata Atlântica, propiciando o contato humano com a natureza e favorecendo surtos epidêmicos de zoonoses. Neste estado, vários casos fatais vêm sendo registrados e estudos epidemiológicos em seus diferentes ecótopos se fazem necessários. O objetivo deste projeto foi avaliar o *status* epidemiológico de riquetsias Grupo Febre Maculosa (GFM) em cães e ectoparasitas de seis municípios do estado do Rio de Janeiro. Para tanto, buscou-se: a) pesquisar anticorpos IgG contra riquetsias GFM em soros caninos utilizando Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI); b) detectar riquetsias nestes soros e em ectoparasitas utilizando PCR e PCR quantitativo, procedendo seu diagnóstico molecular através de análise de sequências nucleotídicas, e, c) analisar a funcionalidade dos iniciadores VNTRB para a região VNTR de *Rickettsia rickettsii* para detecção e genotipagem de amostras de origem brasileira. Foram coletados soros de 172 cães dos municípios Mangaratiba, Arraial do Cabo, Paraíba do Sul, Japeri, Queimados e Rio de Janeiro, dos quais 117 (68%) foram positivos na RIFI. Nos soros de quatro animais (2,32%) foi detectado gene riquetsial (*gltA*). Os 358 ectoparasitos (carrapatos e pulgas) coletados no município de Petrópolis, foram organizados em 262 amostras e, em 16 (6,10%) delas houve amplificação do gene investigado. Na análise das sequências, os fragmentos apresentaram entre 99% e 100% de identidade com *Rickettsia felis* ou *R. rickettsii* com sequências disponibilizadas no GenBank. Constatou-se sorologia positiva em cães de todos os municípios investigados. Em Japeri, Arraial do Cabo e Paraíba do Sul constituiu-se a primeira notificação. Demonstrou-se pela primeira vez *Rickettsia* sp. no soro de cães oriundos de quatro bairros investigados, dos municípios do Rio de Janeiro e Japeri, indicando a importância destes animais na cadeia epidemiológica de riquetsias na região Metropolitana do Rio de Janeiro. Diagnosticou-se *Rickettsia felis* em *Ctenocephalides felis* e *R. rickettsii* em *Amblyomma cajennense* indicando o envolvimento deste carrapato no surto com casos fatais ocorrido no município de Petrópolis. Pôde-se amplificar a região VNTR pesquisada em diferentes amostras de *R. rickettsii*, o mesmo não se verificando em amostras de *R. felis*, *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia rhipicephali* ou *Rickettsia bellii*, sugerindo espécie-especificidade dos iniciadores utilizados. O estudo aponta também a limitação do uso dos iniciadores (VNTRB) para a região VNTR na diferenciação genotípica das cepas de *R. rickettsii* analisadas. Os resultados confirmam a presença de riquetsias patogênicas em área de Floresta Tropical, indicando a importância de um sistema de vigilância de ambiente que detecte vetores e efetue medidas de controle, prevenindo os casos fatais nesta área de turismo ecológico internacional.

Palavras-chave: Febre Maculosa. *Rickettsia rickettsii*. Cães. Carrapatos. VNTR.

ABSTRACT

CARDOSO, K. M. **Detection of Spotted Fever Group Rickettsiae in dogs and ectoparasites of Rio de Janeiro State municipalities.** 2013. 75 p. Masters thesis (Biology of Host-Pathogen Interactions) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Rickettsial diseases are zoonoses with epidemic manifestations, that vary according to characteristics of breeding sites, human activity and bio-ecology of vectors. Most cases of Brazilian Spotted Fever (BSF) occur in the southeastern region of the country. The state of Rio de Janeiro (RJ) has several protected areas of the Mata Atlantica biome, providing human contact with nature and increasing the risks of zoonoses outbreaks. In this state, several fatal cases have been reported and epidemiological studies in their different ecotopes are needed. The objective of this project was to evaluate the epidemiological status of Rickettsia Spotted Fever Group (RSFG) in dogs and ectoparasites from six municipalities in the state of Rio de Janeiro. For that it was done: a) research of rickettsiae SFG IgG antibodies in dog serum using Indirect Immunofluorescence Assay (IFA), b) detection of rickettsiae in these sera and in ectoparasites using PCR and quantitative PCR, and its molecular diagnostic through nucleotide sequences analysis, and c) functionality analysis of the VNTRB initiators for the VNTR region of *Rickettsia rickettsii* for detection and genotyping Brazilian origin samples. It was collected sera from 172 dogs from Mangaratiba, Arraial do Cabo, Paraíba do Sul, Japeri, Queimados, and Rio de Janeiro municipalities, of which 117 (68%) were positive by IFA. In the sera of four animals (2.32%) it was detected rickettsial gene (*gltA*). The 358 ectoparasites (ticks and fleas) collected in Petrópolis, were organized in 262 samples, and in 16 (6.10%) of them there was amplification of the investigated gene. Sequence analysis showed fragments presenting between 99% and 100% identity with *Rickettsia felis* or *R. rickettsii* with GenBank available sequences. Positive serology was found in dogs of all municipalities surveyed, being the first notification of this infection in Japeri, Arraial do Cabo, and Paraíba do Sul. It was demonstrated for the first time *Rickettsia sp.* in serum from dogs of four districts surveyed, from the municipalities of Rio de Janeiro and Japeri, indicating the importance of these animals in the epidemiological chain of rickettsiae in the metropolitan region of Rio de Janeiro. *Rickettsia felis* was diagnosed in *Ctenocephalides felis felis* and *R. rickettsii* in *Amblyomma cajennense* indicating the involvement of this tick in the outbreak with fatal cases occurred in Petrópolis. It was possible to amplify the VNTR region investigated in different samples of *R. rickettsii*, the same was not possible with samples of *R. felis*, *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia rhipicephali* or *Rickettsia bellii*, suggesting primers species-specificity. The study also points out the limitation of the use of VNTRB primers for the VNTR region in genotypic differentiation of the *R. rickettsii* strains analyzed. The results confirm the presence of pathogenic rickettsia in Tropical Forest area, indicating the importance of a surveillance system that detects vectors to perform control measures and prevent fatal cases in this area of international ecological tourism.

Keywords: Spotted fever. *Rickettsia rickettsii*. Dogs. Ticks. VNTR.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Rickettsia* é composto por pequenas bactérias intracelulares obrigatórias (FOURNIER; RAOULT, 2007), gram negativas, pleomórficas, podendo localizar-se no citoplasma e/ou núcleo da célula hospedeira, dependendo da espécie em questão (EREMEEVA; DASCH, 2000). Tais bactérias pertencem à ordem *Rickettsiales*, família *Rickettsiaceae*, cuja taxonomia, na última década, está em constante reorganização, devido aos avanços das técnicas utilizadas para seu estudo e pela elucidação do ciclo enzoótico de alguns de seus membros (PAROLA; DAVOUST; RAOULT, 2005).

As riquetsioses, causadas por organismos do gênero *Rickettsia*, estão presentes em todos os continentes em focos endêmicos, podendo emergir em intervalos esporádicos de forma epidêmica na população humana (AZAD; BEARD, 1998). Em 1907, Dr. Howard Taylor Ricketts isolou o agente etiológico de uma riquetsiose, a Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (FMMR), a partir de carrapatos, estabelecendo então o papel destes na transmissão da doença (RICKETTS, 1909). Hoje, além dos hospedeiros vertebrados, sabe-se que estão presentes no ciclo enzoótico do gênero *Rickettsia* vários artrópodes que podem atuar tanto como vetores quanto como reservatórios (PAROLA; RAOULT, 2001; SIMSER et al., 2001).

Os organismos do gênero *Rickettsia* estão divididos, com base em critérios fenotípicos e genotípicos, nos grupos: Ancestral (GA), Tifo (GT) e Febre Maculosa (GFM). O GA inclui *Rickettsia bellii* e *Rickettsia canadensis* consideradas de patogenicidade desconhecida. O GT tem sua importância relacionada ao tifo epidêmico (causado pela *Rickettsia prowazekii*, vetorada ao homem por piolho) e o tifo murino (causado pela *Rickettsia typhi*, transmitida por pulgas) (RAOULT; ROUX, 1997; ROUX et al., 1997; ROUX; RAOULT; 2000; STOTHARD; CLARK; FUERST, 1994).

Atualmente, mais de 30 espécies de *Rickettsia* são reconhecidas dentro do GFM, tendo sido encontradas ao redor do mundo. Destas, ao menos 16 são consideradas como patogênicas: *Rickettsia aeschlimannii*, *Rickettsia africae* (Febre Africana da Picada do Carrapato), *Rickettsia akari* (Riquetsiose Variceliforme), *Rickettsia australis* (Febre de Queensland), *Rickettsia conorii*, (Febre Maculosa Mediterrânea ou Febre Botonosa), *Rickettsia felis* (Riquetsiose Felis), *Rickettsia heilongjiangensis* (Febre Maculosa do Extremo Oriente), *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia honei* (Riquetsiose da Ilha de Flinders), *Rickettsia japonica* (Febre Maculosa Oriental), *Rickettsia marmioni*, *Rickettsia massilae*, *Rickettsia parkeri*, (Febre Maculosa Ganglionar) (PADDOCK et al., 2004), *Rickettsia rickettsii* (Febre

Maculosa das Montanhas Rochosas), *Rickettsia sibirica* (Riquetsiose do Norte da Ásia ou Tifo siberiano) e *Rickettsia slovaca* (Linfadenopatia do carrapato ou TIBOLA). As espécies *R. akari* e *R. felis* são transmitidas, respectivamente, por pequenos ácaros e pulgas. As demais são vetoradas por carrapatos (PAROLA; DAVOUST; RAOULT, 2005). Nas riquetsioses GFM, os sintomas mais frequentes são: cefaléia, febre aguda e mal estar generalizado. Manifestações cutâneas podem ou não ocorrer. Este quadro é comum à várias outras doenças como dengue, gripe, hepatite viral, leptospirose, salmonelose e malária sendo recomendado o diagnóstico diferencial (BRASIL, 2010).

Enquanto isoladas apenas de artrópodes, as riquetsias são consideradas não patogênicas para o ser humano. Ao serem detectadas causando doença, são incluídas no GFM de riquetsias patogênicas, como ocorreu com *R. parkeri*, só recentemente responsabilizada pela febre maculosa ganglionar (PADDOCK et al., 2004). Alguns autores acreditam que todas as espécies de riquetsia podem ter potencial patogênico, desde que o artrópode reservatório seja capaz de picar humanos (SCOLA; RAOULT, 1997). No caso do carrapato, uma vez infectado, pode carrear o patógeno durante toda vida e manter a circulação do mesmo na natureza através de transmissão transovariana e transtadial (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2006). Desta forma, os carrapatos constituem-se como vetores e também reservatórios naturais do agente, mantendo e transmitindo a bactéria para os vertebrados (PAROLA; RAOULT, 2001; SIMSER et al., 2001).

Em determinadas áreas podem coexistir vetores e reservatórios de riquetsias GFM, patogênicas ou de patogenicidade desconhecida, o que torna muito importante mapear a presença de riquetsias de interesse para saúde pública, tanto em artrópodes quanto em hospedeiros vertebrados (CHEN et al., 1998).

No Brasil, a enfermidade causada pela *R. rickettsii*, transmitida por carrapatos do gênero *Amblyomma*, é conhecida desde o século XX, como Febre Maculosa Brasileira, sendo similar à Febre Maculosa das Montanhas Rochosas dos Estados Unidos (DIAS; MARTINS, 1939). As manifestações cutâneas frequentemente observadas na infecção, estão associadas à vasculite causada pela multiplicação do agente no tecido endotelial. Pode ser fatal se não diagnosticada precocemente e tratada adequadamente. A riquetsiose felis, pouco frequente nas diferentes partes do mundo onde foi descrita, é causada por *R. felis* e transmitida por pulga, também está relatada no país (BROUQUI et al., 2004; PAROLA; DAVOUST; RAOULT, 2005; RAOULT; ROUX, 1997). Nos últimos 10 anos, casos mais brandos de Febre Maculosa associados com uma maior frequência de adenomegalia e ausência de óbito têm sido identificados em Santa Catarina e também nos estados do Paraná e Rio Grande do Sul

(LE MOS, 2012). Recentemente, um estudo identificou indícios de uma nova riquetsiose do GFM causada por uma nova riquetsia, relacionada à *Rickettsia parkerii*, *R. africae* e *R. sibirica*, em São Paulo (SPOLIDORIO, 2010).

Em diferentes estados do Brasil, animais domésticos e silvestres (cães, equinos, capivaras, roedores e morcegos, entre outros), procedentes de áreas endêmicas de FMB, apresentam sorologia positiva para riquetsias (DIAS; MARTINS, 1939; MORAES-FILHO et al., 2009a; PACHECO et al., 2007; PINTER et al., 2008; SPOLIDORIO et al., 2010; VIANNA et al., 2008). Com base em inquéritos soro-epidemiológicos, admite-se que estes animais possam constituir sentinelas para FMB. Genes riquetsiais (*gltA* e *ompA*) foram detectados em soro de cães e equinos infectados, salientando a importância destes animais com relação ao ciclo peridomiciliar da doença (GEHRKE, 2010).

Nas últimas décadas, a Febre Maculosa foi relatada em todos estados da região Sudeste do Brasil (GALVÃO et al., 2005; LEMOS; ROZENTAL; VILLELA, 2002; MELLES; COLOMBO; LEMOS, 1999; SEXTON et al., 1993), utilizando métodos imunológicos. No entanto, a confirmação molecular das espécies de riquetsias infectando humanos foi realizada apenas recentemente. Dois pacientes com quadro clínico compatível com FMB foram a óbito e posteriormente diagnosticou-se, por métodos sorológicos e moleculares, *R. felis* presente no organismo do paciente (GALVÃO et al., 2004). Esta riquetsia está registrada em pulgas de vários estados (HORTA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008). Já *R. rickettsii* foi identificada em dois pacientes humanos do Rio de Janeiro (LAMAS et al., 2008; ROZENTAL et al., 2006) e em cerca de 20 outros no estado de São Paulo (GEHRKE, 2010; NASCIMENTO, 2003). O advento das técnicas moleculares permitiu um significativo avanço na descoberta de novas riquetsias e riquetsioses, assim como para o entendimento sobre relações artrópode-patógeno. Mais recentemente, ferramentas moleculares têm sido utilizadas para caracterização de cepas detectadas em humanos, animais e potenciais vetores, visando o esclarecimento sobre a circulação de uma riquetsia entre os elementos da cadeia epidemiológica.

Em vários estados do Brasil, riquetsias do GFM têm sido diagnosticadas em várias espécies de carrapatos com base na análise de genes riquetsiais (HORTA et al., 2006; LABRUNA et al., 2004a; OLIVEIRA et al., 2008). Em *Amblyomma cajennense* (carrapato primário de cavalos), considerado o principal vetor de FMB, o diagnóstico molecular específico de *R. rickettsii* foi possível somente em alguns exemplares coletados em Minas Gerais (CARDOSO et al., 2006; GUEDES et al., 2005) e, mais recentemente, nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro (GEHRKE, 2010; MOURA, 2012). Também pôde ser

diagnosticada em alguns exemplares de *Amblyomma aureolatum* (carrapato primário de cães) coletados em Mogi das Cruzes (PINTER; LABRUNA, 2006). A prevalência da riquetsiose entre humanos no Estado do Rio de Janeiro é inferior àquela verificada no estado de São Paulo. Entretanto, neste último estado, a despeito dos numerosos estudos realizados, a riquetsia foi diagnosticada em apenas alguns exemplares de carrapatos. As diferenças epidemiológicas verificadas sugerem a possibilidade de ocorrência de diferentes cepas de *R. rickettsii* circulando entre potenciais vetores e reservatórios nas diferentes regiões fisiogeográficas do país.

No estado do Rio de Janeiro, tem sido realizados estudos soropidemiológicos de animais domésticos associados à epidemiologia molecular em alguns municípios. *Rickettsia rickettsii* foi identificada em humanos, várias espécies de carrapatos, pulgas e em alguns cães e equinos de alguns municípios (GEHRKE, 2010; LAMAS et al., 2008; MOURA, 2012; ROZENTAL et al., 2006). A frequência de artrópodes infectados pela riquetsia foi superior àquelas observadas em outros estados. *R. felis*, causadora da riquetsiose felis, também foi diagnosticada nos artrópodes. Além do *Amblyomma cajennense*, considerado principal carrapato transmissor da FMB, pôde-se observar, pela primeira vez, várias espécies de carrapatos parasitas específicos de bovinos, equinos e cães, e usualmente não antropofílicos, carregando *R. rickettsii* (GEHRKE, 2010). Em uma das regiões estudadas, com o grande número de óbitos associados a FM, após ensaio de imunofluorescência indireta (RIFI), um espécime de *Rhipicephalus sanguineus*, carrapato adaptado a condições urbanas, foi constatado albergando riquetsia GFM (ROZENTAL et al., 2002). Posteriormente, estudos moleculares (CUNHA et al., 2009; GEHRKE et al., 2009; MOURA, 2012) diagnosticaram *R. rickettsii* em carrapatos desta espécie, sugerindo uma considerável chance de participação ativa desta espécie no ciclo da riquetsiose em áreas peridomicílio e domicílios carregada pelos cães. Nos EUA já foi confirmado como vetor de Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (DEMMA et al., 2005). Os cães destacam-se como fonte de infecção para os carrapatos e têm sido considerados como amplificadores e sentinelas de riquetsia (LABRUNA, 2006; SANGIONI, 2003), assumindo papel importante para o estabelecimento de prevalências geográficas de FM em uma região.

No Rio de Janeiro, a FMB é descrita desde a década de 40, sem, no entanto, confirmação vetorial da maioria dos casos. Os estudos moleculares recentes têm contribuído para estabelecer o status do gênero *Rickettsia* na região. No Rio de Janeiro, durante os anos de 2007 a 2012, foram registrados no SINAN (Sistema Nacional de Agravos de Notificação) o total de 135 casos humanos suspeitos de FMB, dos quais 54 foram confirmados (BRASIL,

2012). Dados dos registros oficiais da Secretaria Estadual de Saúde do estado do Rio de Janeiro descrevem a maior parte dos registros ocorridos na região metropolitana do Rio. Quanto ao desenvolvimento dos casos no Estado do Rio de Janeiro, 25 evoluíram para óbito, o que representa 46,3% do total de casos confirmados. Em áreas de foco ativo deste estado, em estudos sobre potenciais vetores de FM utilizando técnicas moleculares, foi diagnosticado *R. rickettsii* em *Boophilus microplus*, *Ctenocephalides felis*, *Anocentor nitens*, *A. cajennense*, *A. aureolatum* (GEHRKE, 2010), em *C.canis* (MOURA, 2012) e em *R. sanguineus* em municípios do interior do estado (CUNHA et al., 2009; GEHRKE et al., 2009). O diagnóstico de *R. rickettsii* em algumas espécies de artrópodes constituem confirmações inéditas, carecendo maiores estudos para esclarecimento sobre o valor epidemiológico dos encontros registrados.

Atualmente o diagnóstico laboratorial das doenças riquetsiais é baseado nas técnicas de isolamento, detecção imunológica e análise genética (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2004). O ensaio por RIFI é a metodologia preconizada pela Organização Mundial da Saúde para o diagnóstico de *Rickettsia*. Recomenda-se, quando possível, o isolamento em cultura de células e/ou imuno-histoquímica, possibilitando o diagnóstico das riquetsias no nível de GFM (PADDOCK et al., 1999). A análise genética para o diagnóstico específico baseia-se na amplificação de fragmentos de genes do DNA de *Rickettsia*, extraído de material biológico de vertebrado e artrópode vetor, pelo uso da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e comparação da sequência de fragmentos de genes amplificados. Fournier e Raoult (2009) afirmam que a comparação das organizações filogenéticas obtidas a partir do estudo de vários genes (principalmente *gltA*, *ompA* e *ompB*) fornece bases para que seja estabelecida uma taxonomia confiável das bactérias incluídas no gênero *Rickettsia*.

Recentes estudos moleculares dos agentes riquetsiais tem se voltado para uso de sequências intergênicas de genes comumente amplificados por PCR no diagnóstico desses agentes. Tais estudos baseiam-se, entre outros aspectos, na análise de fragmentos de alta repetição do gene, além de variações que indicam inserções ou deleções num determinado locus, podendo caracterizar novas cepas de uma mesma espécie.

O Número Variável de Repetições Sequenciais (VNTR) consiste em repetições numéricas que podem frequentemente variar quanto ao número de cópias. Desta maneira, mostram polimorfismos de comprimento entre os indivíduos. A amplificação é obtida a partir de regiões flanqueadoras bem conservadas (VITORINO, 2005).

Em 2004, Fournier e colaboradores, com o objetivo de desenvolver uma ferramenta de genotipagem para determinar possíveis cepas de *R. conorii*, encontraram repetições altamente conservadas nos espaços intergênicos pesquisados. Tais repetições estavam presentes apenas no locus estudado. Os autores reiteram que a variabilidade interindividual de comprimento num locus único é designada por VNTRs. O trabalho demonstrou que os espaços intergênicos variáveis são os mais adequados para estudos de genotipagem.

Eremeeva e colaboradores (2006) e Wikswo e colaboradores (2007), analisaram a sequência de nucleotídeos em repetição, do genoma de riquétsias extraído de amostras de carrapatos e humanos de diferentes regiões dos EUA (Arizona, Califórnia). As regiões de VNTR foram selecionadas por tamanho e localização, e comparadas com uma sequência previamente conhecida, *R. rickettsii* cepa Bitterroot, originária de Montana. Diferentes cepas de *R. rickettsii* puderam ser caracterizadas entre as espécies de carrapatos analisadas, relacionadas à distribuição geográfica e infecção humana. A caracterização de cepas poderá possibilitar estudos epidemiológicos que monitorem a mudança das populações microbianas no decorrer do tempo (FOURNIER et al., 2004). Segundo Eremeeva e Dasch (2009), a virulência de uma cepa para os hospedeiros vertebrados pode estar relacionada com a variabilidade genéticas, sendo identificada através de marcadores genéticos, tal qual mostraram estes estudos prévios. No Brasil, nenhum estudo foi desenvolvido utilizando marcadores de microsatélite para *R. rickettsii*.

1.1 Objetivos

O objetivo geral deste projeto foi avaliar o status epidemiológico de riquétsias do GFM em cães e ectoparasitas de municípios do estado do Rio de Janeiro, com base em métodos sorológicos e/ou moleculares. Para alcançá-lo, buscamos especificamente:

- a) pesquisar a presença de anticorpos contra estes organismos em cães;
- b) investigar a presença de genes riquetsiais nas amostras de soro de cães e em ectoparasitas procedendo seu diagnóstico molecular específico e;
- c) Analisar a funcionalidade dos iniciadores VNTRB para a região VNTR (Número Variável de Repetições Sequenciais) de *R. rickettsii* para detecção e genotipagem de amostras de origem brasileira.

5 CONCLUSÃO

Sob as condições desenvolvidas no presente trabalho, as investigações sorológicas e moleculares realizadas com amostras biológicas procedentes de áreas sem casos, com casos suspeitos ou confirmados de Febre Maculosa, do estado do Rio de Janeiro, possibilitaram:

- detectar, pela primeira vez, anticorpos IgG contra riquetsias Grupo Febre Maculosa nos soros de cães procedentes dos municípios Rio de Janeiro, Japeri, Arraial do Cabo e Paraíba do Sul, estado do Rio de Janeiro;
- demonstrar pela primeira vez *Rickettsia* sp. no soro de cães oriundos dos bairros da Gávea, Ilha do Governador e Vargem Grande (município do Rio de Janeiro) e Engenheiro Pedreira (município Japeri) indicando a importância destes animais na cadeia epidemiológica de riquetsias na região Metropolitana do Rio de Janeiro;
- diagnosticar sequências com 99 e 100% de identidade com *Rickettsia rickettsii* em *Amblyomma cajennense* e, ainda, sequências com 99 e 100% de identidade com *Rickettsia felis* em pulgas *Ctenocephalides felis*, coletadas no município de Petrópolis/RJ;
- amplificar a região VNTR pesquisada em diferentes amostras de *Rickettsia rickettsii*, o mesmo não se verificando em amostras de *R. felis*, *R. parkeri*, *R. rhipicephali* (GFM) ou *R. bellii* (GA), sugerindo espécie-especificidade dos iniciadores (VNTRB) utilizados;
- apontar a limitação do uso dos iniciadores (VNTRB) para a região VNTR na diferenciação genotípica de cepas de *R. rickettsii* presentemente analisadas, oriundas de diferentes regiões geográficas.

REFERÊNCIAS*

- ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt extraction of high genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic. Acid. Res.**, v. 25, n. 22, p. 4692-4693, 1997.
- ANGELAKIS, E.; RICHET, H.; ROLAIN, J-M.; LA SCOLA, B.; RAOULT, D. Comparison of Real-Time Quantitative PCR and Culture for the Diagnosis of Emerging Rickettsioses. **Plos. Negl. Trop. Dis.**, v. 6, n. 3, 2012.
- ARAGÃO, H. B.; FONSECA, F. Notas de Ixodologia: propósito da validade de algumas espécies do gênero *Amblyomma* do continente Americano (Acari:Ixodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 51, p. 485-492, 1953.
- AZAD, A. F.; BEARD, C. B. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. **Emer. Infect. Dis.**, v. 4, n. 2, p. 179-186, 1998.
- AZAD, A. F.; RADULOVIC, S.; HIGGINS, J. A.; NODEN, B. H.; TROYER, J. M. Flea-borne rickettsioses: ecologic considerations. **Emerg. Infect. Dis.**, v.3, n.3, p. 319-327. 1997.
- 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. N. Y. Acad.**, v. 590, p. 557-563, 1990.
- BRASIL. Ministério Da Saúde. **Febre Maculosa**. Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN. 2010. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php>>. Acesso em: 12 fev. 2013.
- BROUQUI, P.; BACELLAR, F.; BARANTON, G.; BIRTLES, R. J.; BJOERSDORFF, A.; BLANCO, J. R.; CARUSO, G.; CINCO, M.; FOURNIER, P. E.; FRANCAVILLA, E.; JENSENIUS, M.; KAZAR, J.; LAFERL, H.; LAKOS, A.; LOTRIC-FURLAN, S.; MAURIN, M.; OTEO, J. A.; PAROLA, P.; PEREZ-EID, C.; PETER, O.; POSTIC, D.; RAOULT, D.; TELLEZ, A.; TSELENTIS, Y.; WILSKÉ, B. Guideline for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 10, n. 12, p. 1108-1132, 2004.
- BURGDORFER, W. Ecological and epidemiological considerations of Rock Mountains spotted fever and scrub typhus. In: WALKER, D. H. **Biology of rickettsial diseases**, Boca Raton: Editora CRC, p. 33-50. 1988.
- CARDOSO, L. D.; FREITAS, R. N.; MAFRA, C. L.; NEVES, C. V. B.; FIGUEIRA, F. C. B.; LABRUNA, M. B.; GENNARI, S. M.; WALKER, D. H.; GALVÃO, M. A. M. Caracterização de *Rickettsia* spp. circulante em foco silencioso de febre maculosa brasileira no Município de Caratinga, Minas Gerais, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 22, n. 3, p. 495-501, 2006.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

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

CHEN, L. F.; SEXTON, D. J. What's new in Rocky Mountain spotted fever? **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 22, p. 415-32, 2008.

CHOI, Y. J.; LEE, S. H.; PARK, K. H.; KOH, Y. S.; LEE, K. H.; BAIK, H. S.; CHOI, M. S.; KIM, I. S.; JANG, W. J. Evaluation of polymerase chain reaction-based diagnosis of spotted fever group rickettsiosis in human serum samples. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 12, p. 759-76, 2005.

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

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. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 105-108, 2009.

DEAN, F. B.; HOSONO, S.; FANG, L.; WU, X.; FARUGI, A. F.; BRAY-WARD, P.; SUN, Z.; ZONG, Q.; DU, Y.; DU, J.; DRISCOLL, M.; SONG, W.; KINGSMORE, S. F.; EGHOLM, M.; LASKEN, R. S. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 99, p. 5261-5266, 2002.

DEMMA, L. J.; TRAEGER, M. S.; NICHOLSON, W. L.; PADDOCK, C. D.; BLAU, D. M.; EREMEEVA, M. E.; DASCH, G. A.; LEVIN, M. L.; SINGLETON, J. JR.; ZAKI, S. R.; CHEEK, J. E.; SWERDOLOW, D. L.; McQUISTON, J. H. Rock Mountain Spotted Fever from Arizona an Unexpected Tick Vector in Arizona. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n.6, p. 587-594, 2005.

DIAS, E.; MARTINS, A. V. Spotted fever in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 19, n. 2, p. 103-108, 1939. Disponível no site: <<http://www.sucen.sp.gov.br>>

EREMEEVA, M. E.; BOSSERMAN, E.; ZAMBRANO, M.; DEMMA, L.; DASCH, G. A. Molecular typing of novel *Rickettsia rickettsii* isolates from Arizona. **Ann. N. Y. Acad.**, v. 1078, p. 573-577, 2006.

EREMEEVA, M. E.; DASCH, G. A. Rickettsiae. In. LEDERBERG, J. **Encyclopedia of microbiology**, New York: Academic Press, v. 4, p. 140-180, 2000.

ESTRIPEAUT, D.; ARAMBURÚ, M. G.; SAÉZ-LLORENZ, X.; THOMPSON, H.A.; DASH, G. A.; PADDOCK, C.D.; ZAKI, S.; EREMEEVA, M. E. Rocky Mountain Spotted Fever, Panamá. **Emerging Infectious Diseases**. v. 13, n. 11, p. 1763-1765, 2007.

FOURNIER, P. E.; RAOULT, D. Bacteriology, taxonomy and phylogeny of *Rickettsia*. In RAOULT, D.; PAROLA, P. **Rickettsial Diseases**. New York, London. Editora Informa Health Care, cap. 1, p. 1-13, 2009.

FOURNIER, P. E.; ZHU, Y.; OGATA, H.; RAOULT, D. Use of highly variable intergenic spacer sequences for multispacer typing of *Rickettsia conorii* strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 5757–5766, 2004.

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 Pública**, v. 39, p. 850-856, 2005.

GALVÃO, M. A.; MAFRA, C.; CHAMONE, C. B.; CALIC, S. B.; ZAVALA-VELAZQUEZ, J. E.; WALKER, D. H. Clinical and laboratorial evidence of *Rickettsia felis* infections in Latin America. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 3, p. 238-240, 2004. Suppl. 37.

GAZÊTA, G. S.; SOUZA, E. R.; ABOUD-DUTRA, A. E.; AMORIM, M.; BARBOSA, P. R.; ALMEIDA, A. B.; GOMES, V.; GEHRKE, F. S.; MARRELLI, M. T.; SCHUMAKER, T. T. S. Potential vectors and hosts of *Rickettsia* spp: epidemiological studies in the Vale do Paraíba, state of Rio de Janeiro/Brazil. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 15, n. 2, p. 269-270, 2009.

GEHRKE, F. S. **Detecção e caracterização molecular de riquetsias em humanos, potenciais vetores e animais domésticos da região sudeste do Brasil.** 2010. 100 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 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. 267-268, 2009.

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, n. 8, p. 841-845, 2005.

HALL, T. A. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp** n.41p. 95-98 1999.

HORTA, M. C.; CHIEBAO, D. P.; DE SOUZA, D. B.; FERREIRA, F.; PINHEIRO, S. R.; LABRUNA, M. B.; SCHUMAKER, T. T. Prevalence of *Rickettsia felis* in the Fleas *Ctenocephalides felis felis* and *Ctenocephalides canis* from Two Indian Villages in São Paulo Municipality, Brazil. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1078, p. 361–363, 2006.

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

LABRUNA, M. B. Ecology of *Rickettsia* in South America. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 11, p. 156-66, 2009.

LABRUNA, M. B. Epidemiologia da Febre Maculosa no Brasil e nas Américas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ACAROLOGIA, 1., 2006, Viçosa, MG. **Livro de resumos...** Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2006. p. 63-78.

LABRUNA, M. B.; HORTA, M. C.; AGUIAR, D. M. CAVALCANTE, G. T.; PINTER, A.; GENNARI, S. M.; CAMARGO, L. M. A. Prevalence of *Rickettsia* infection in dogs from the urban and rural areas of Monte Negro municipality, western Amazon, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.7, p.249-255, 2007.

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, p. 533-537, 2004a.

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M. C.; BOUYER, D. H.; MCBRIDE, J. W.; PINTER, A.; POPOV, V.; GENNARI, S. M.; WALKER, D. H. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 90-98, 2004b.

LAMAS, C.; FAVACHO, A.; ROZENTAL, T.; BÓIA, M. N.; KIRSTEN, A. H.; GUTERRES, A.; BARREIRA, J.; LEMOS, E. R. S. Characterization of *Rickettsia rickettsii* in a case of fatal Brazilian spotted fever in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 2, p. 149-151, 2008. Suppl. 12.

LEITNER, M.; YITZHAKI, S.; RZOTKIEWICZ, S.; KEYSARI, A.; Polymerase chain reaction-based diagnosis of Mediterranean spotted fever in serum and tissue samples. **Am. J. Trop. Med.**, v. 67, p. 166–169, 2002.

LEMOS, E. R. S. Rickettsioses: breves considerações **Boletim Sierj.** n. 41, p. 3-4, 2012.

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. 523-25, 2002. Suppl. 5.

MELLES, B. H. H.; COLOMBO, S.; LEMOS, E. R. S. Isolamento de *Rickettsia* em cultura de células. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 32, p. 69-73, 1999.

MORAES-FILHO, J.; HORTA, M. C.; PACHECO, R. C.; MAEDA, M. M.; GALANO, A.; OLIVEIRA, M. L.; YAI, L. E. O.; LABRUNA, M. B. Pesquisa de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii* em equinos do Centro de Controle de Zoonoses do município de São Paulo (CCZ/SP). **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 46, n. 2, 2009a.

MORAES-FILHO, J.; PINTER, A.; PACHECO, R. C.; GUTMANN, T. B.; BARBOSA, S. O.; GONZÁLEZ, 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 Zoonotic Diseases**, v. 9, p. 73-78, 2009b.

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.** 2012. 78 f. Mestrado (Dissertação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

NACIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **BLAST Assembled RefSeq Genomes.** Nucleotide Blast. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 15 mar. 2013.

NASCIMENTO, E. M. M. **Isolamento e detecção molecular de riquetsias do Grupo Febre Maculosa, a partir de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) e espécimes biológicos humanos, provenientes de áreas endêmicas do Estado de São Paulo.** 2003. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2003.

NASCIMENTO, E. M. M.; COLOMBO, S.; NAGASSE-SUGAHARA, T.K.; ANGERAMI, R. N.; RESENDE, M. R; DA SILVA, L. J.; KATZ, G.; DOS SANTOS, F. C. Evaluation of PCR-based assay in human serum samples for diagnosis of fatal cases of spotted fever group rickettsiosis. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 15, p. 232-234, 2009.

NIEBYLSKI, M. L.; PEACOCK, M. G.; SCHWAN, T. G. Lethal effect of *Rickettsia rickettsii* on its tick vector (*Dermacentor andersoni*). **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, n. 2, p. 773–778. 1999.

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.; MAFRA, C. L. Molecular identification of *Rickettsia felis* in ticks and flea from an endemic area for brazilian spotted fever. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 2, p. 191-194, 2008.

OLIVEIRA, P. R. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae): Avaliação de técnicas para o estudo de dinâmica populacional e biotecnologia. 1998. 91 f. Doutorado (Tese) . Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (Brasil), 1998.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE (OPAS/OMS). **Consulta de especialistas sobre rickettsioses nas Américas.** Ouro Preto, MG, Brasil. 2004. 52 p.

PACHECO, R. C.; HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; ATALIBA, A. C.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from São Paulo, Brazil: serological evidence for infection by *Rickettsia bellii* and *Rickettsia parkeri*. **Biomedica**, n. 27, p.364-71, 2007.

PADDOCK, C. D.; GREER, P. W.; FEREBEE, T. L.; SINGLETON, J. J.R.; MCKECHNIE, D. B.; TREADWELL, T. A.; KREBS, J. W.; CLARKE, M. J.; HOLMAN, R. C.; OLSON, J. G.; CHILDS, J. E.; ZAKI, S. R. Hidden mortality attributable to Rocky Mountain spotted fever: immunohistochemical detection of fatal, serologically unconfirmed disease. **J. Infect. Dis.**, v. 179, p. 1469-1476, 1999. Suppl. 6.

- PADDOCK, C. D.; SUMNER, J. W.; COMER, J. A.; ZAKI, S. R.; GOLSMITH, C. S.; GODDARD, J.; MCLELLAN, S. L. F.; TAMMINGA, C. L.; OHL, C. A. *Rickettsia parkeri*: A newly reconized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. **Clin. Infect. Dis.**, v. 38, n. 6, p. 805-811, 2004.
- PAROLA, P.; DAVOUST, B.; RAOULT, D. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. **Vet. Res.**, v. 36, n. 3, p. 469-492, 2005.
- PAROLA, P.; RAOULT, D. Tick and tickborne bacterial diseases in humans: an infectious threat. **Clin. Inf. Dis.**, v. 32, p. 897-928, 2001.
- PINTER, A.; HORTA, M. C.; PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M. B. Serosurvey of *Rickettsia* spp. in dogs and humans from an endemic area for Brazilian spotted fever in the State of São Paulo. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 2, p. 247-252, 2008.
- PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1078, p. 523-529, 2006.
- PIRANDA, E. M.; FACCINI, J. L. H.; PINTER, A.; PACHECO, P.; CANÇADO, P. H. D.; LABRUNA, M. B. Experimental Infection of *Rhipicephalus sanguineus* tick with the bacterium *Rickettsia rickettsii* use experimentally infected Dogs. **Vector Borne and Zoonotic Diseases.**, v. 11, n.1, p. 29-36, 2011.
- RAOULT, D.; ROUX, V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 10, n. 4, p. 694-719, 1997.
- REGNERY, R. L.; SPRUILL, C. L.; PLIKAYTIS, B. D. Genotypic identification of *Rickettsiae* and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two Rickettsial genes. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 1576-1589, 1991.
- RICKETTS, H. T. Some aspects of Rocky Mountain Spotted Fever as shown by recent investigations. **Med. Rec.**, v. 76, p. 843-855, 1909.
- ROUX, V.; RAOULT, D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (OmpB). **Internat. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 50, p. 1449-1455, 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. 252-261, 1997.
- ROZENTAL, T.; BUSTAMANTE, M. C.; AMORIM, M.; SERRA-FREIRE, N. M.; LEMOS, E.R. Evidence of spotted fever group rickettsiae in state of Rio de Janeiro, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 44, n. 3, p. 155-158. 2002.

ROZENTAL, T.; EREMEEVA, M. E; PADDOCK, C. D.; ZAKI, S. R.; DASCH, G. A.; LEMOS, E. R. S. Fatal case of Brazilian spotted fever confirmed by immunohistochemical staining and sequencing methods on fixed tissues. **Ann. N. Y. Acad.**, 2006, v. 1078, p. 257-259. [4th International Conference on *Rickettsiae* and Rickettsial Diseases; 2005; Logroño].

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANGIONI, L. A. **Pesquisa de infecção por riquetsias do grupo da Febre Maculosa em humanos, cães, eqüídeos e em adultos de *Amblyomma cajennense*, em região endêmica e não endêmica do estado de São Paulo**. 2003. 86 f Doutorado (Tese em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

SERRA-FREIRE, N. M.; SENA, L. M. M.; BORSOI, A. B. P. Parasitismo Humano por Carrapatos na Mata Atlântica, Rio de Janeiro, Brasil. **EntomoBrasilis**, v. 4, n. 2, p. 67-72, 2011.

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

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

SILVEIRA, I.; PACHECO, R. C.; SZABÓ, M. P.; RAMOS, H. G.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia parkeri* in Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v.13, n.7, p.1111 – 1113, 2007.

SIMSER, J. A.; PALMER, A. T.; MUNDERLOH, U. G.; KURTTI, T. J. Isolation of a spotted fever group *Rickettsia*, *Rickettsia peacockii*, in a Rocky Mountain wood Tick, *Dermacentor andersoni*, cell line. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 546-552, 2001.

SOUZA, E. R.; GAZÊTA, G. S.; BARBOSA, P. R. A.; GONÇALVES, P. C.; NASCIMENTO, E. M.; SCHUMAKER, T. T. S. Detecção de riquetsias e erlíquias através de PCR em animais domésticos do Município de Valença / RJ. In: **XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia**, 2005, Porto Alegre – RS, Brasil. Revista de Patologia Tropical, v. 34.

SOUZA, M. S. B. **Aspectos epidemiológicos de potenciais vetores de riquetsias na região Metropolitana do estado do Rio de Janeiro**. Monografia Especialização (Entomologia Médica) – Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, 2009.

SPOLIDORIO, M. G. et al. Survey for tick-borne zoonoses in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil. **Am. J. Med. Trop. Hyg.**, v. 83, n. 1, p. 201-206, 2010.

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. Acesso em 18 de janeiro 2013.

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. 2731-2739. 2011.

VIANNA, M. C.; HORTA, M. C.; SANGIONI, L. A.; CORTEZ, A.; SOARES, R. M.; MAFRA, C. L.; GALVÃO, M. A.; LABRUNA, M. B.; GENNARI, S. M.; Rickettsial spotted fever in capoeirão village, Itabira, Minas Gerais, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.** v. 50, n. 5, p. 297-301, 2008.

VITORINO, L.; CHELO, I. M.; BACELLAR, F.; ZE-ZE; L.; Rickettsiae phylogeny: a multigenic approach. **Microbiology Sgm**, n. 153, p. 160-168, 2007.

WEDINCAMP, J. JR; 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.

WIKSWO, M. E.; HU, R.; METZEGGER, M. E.; EREMEEVA, M. E. Detection of *Rickettsia rickettsii* and *Bartonella henselae* in *Rhipicephalus sanguineus* from California. **J. Med. Entomol.**, v. 44, p. 158-162, 2007.