

Caracterização de *Rickettsia* spp. circulante em foco silencioso de febre maculosa brasileira no Município de Caratinga, Minas Gerais, Brasil

Characterization of *Rickettsia* spp. circulating in a silent peri-urban focus for Brazilian spotted fever in Caratinga, Minas Gerais, Brazil

Luciane Daniele Cardoso ¹
 Renata Nascimento Freitas ¹
 Cláudio Lísias Mafra ²
 Cristiane Vilas Boas Neves ¹
 Fátima Cristina Bacellar Figueira ³
 Marcelo Bahia Labruna ⁴
 Solange M. Gennari ⁴
 David Hughes Walker ⁵
 Márcio Antônio Moreira Galvão ¹

Abstract

The present study was intended to characterize Rickettsia spp. circulating in arthropod vectors in Caratinga, Minas Gerais, Brazil, by PCR and to investigate the presence of antibodies against the spotted fever Rickettsiae group (SFRG) in dogs and horses. 2,610 arthropods were collected and taxonomically identified. DNA samples obtained from these vectors were submitted to PCR and cycle-sequenced. Ctenocephalides and Amblyomma cajennense showed sequences presenting 100.0% homology with R. felis. A sequence obtained from Rhipicephalus sanguineus showed 99.0% homology with R. felis, and a sequence from A. cajennense showed 97.0% homology with R. honei and R. rickettsii. Canine (73) and equine (18) serum samples were tested by indirect fluorescent antibody (IFA) using R. rickettsii antigen. Only three of the equine sera tested (17.0%) had positive antibody titers. Molecular detection of rickettsiae species potentially pathogenic to humans in arthropod vectors and the presence of seroreactivity to SFRG in horses show the risk of transmission of rickettsiosis in this area and the need to maintain continuous epidemiological surveillance for rickettsial diseases.

Rickettsia; Rickettsia Infectious; Spotted Fever; Arthropod Vectors

Introdução

As riquetsias patogênicas constituem um grupo de microrganismos com características de bactérias gram-negativas, intracelulares obrigatórias responsáveis por várias doenças conhecidas como riquetsioses, que são transmitidas ao homem por meio da picada de artrópodes hematófagos, tais como carrapato, pulga e piolho ^{1,2}. Casos humanos de infecção por bactérias do gênero *Rickettsia* têm sido descritos em vários países da América do Sul nos últimos vinte anos.

O Brasil apresenta histórico de doença riquetsial desde a década de 20, sendo a febre maculosa brasileira a mais severa das riquetsioses descritas, ocorrendo principalmente no Sudeste do país. 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 ³.

A introdução de técnicas da biologia molecular na investigação de doenças riquetsiais tem assumido grande importância na detecção de várias espécies do gênero *Rickettsia* em vetores, humanos e animais, permitindo a caracterização de espécies já conhecidas como a *R. rickettsii* e outras recentemente reconhecidas como a *R. felis*. Em 2002, casos humanos de riquetsiose causada por *R. felis* foram descritos

¹ Escola de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brasil.

² Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil.

³ Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Águas de Moura, Portugal.

⁴ Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

⁵ University of Texas Medical Branch, Galveston, U.S.A.

Correspondência

M. A. M. Galvão
 Escola de Nutrição,
 Universidade Federal
 de Ouro Preto,
 Campus Universitário,
 Morro do Cruzeiro,
 Ouro Preto, MG
 35400-000, Brasil.
 magalvao@uai.com.br

no Estado de Minas Gerais, sendo este agente detectado por reação em cadeia da polimerase (PCR) em pulgas do gênero *Ctenocephalides* 4.

Em 1992 foi registrada através da Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais (SES-MG), a existência de um foco peri-urbano de riquetsioses expressivo em termos de ocorrência de casos, no Município de Caratinga, localizado no Vale do Rio Doce 3. 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 febre maculosa como causadora dos óbitos foi baseada em critérios clínico-epidemiológicos e laboratoriais.

Motivado pelas características do foco mencionado, Galvão 3 estudou o comportamento da febre maculosa brasileira no Município de Caratinga, e por meio de inquérito sorológico registrou uma soro-prevalência de 2% em humanos, 25% em cães e 53% em eqüinos, utilizando a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) realizada com antígeno específico de *R. rickettsii*. Desde então e até os dias atuais, apenas um caso novo de febre maculosa brasileira foi registrado naquele município, logo no primeiro ano após o surto. Deste modo, como contribuição para um melhor conhecimento do ciclo natural das riquetsias, o presente trabalho pretendeu reavaliar o foco peri-urbano de Caratinga, aparentemente silencioso, por meio da investigação de infecção por bactérias do gênero *Rickettsia* na população de artrópodes vetores encontrados em animais vivendo nos domicílios e peri-domicílio. Para tanto, foi utilizada a sorologia por RIFI e a PCR com o objetivo de melhor conhecer a dinâmica da infecção dos vetores e hospedeiros por riquetsias na referida área, e estimar o risco ao qual está submetida sua população, contribuindo, dessa forma, para o conhecimento da epidemiologia das riquetsioses.

Métodos

A coleta de vetores (pulgas e carrapatos) foi realizada em cães, gatos, eqüinos e em pastagens do bairro da Cadeia, área peri-urbana do Município de Caratinga, Minas Gerais, por uma equipe devidamente treinada do escritório da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) em Caratinga, em parceria com a equipe executora deste projeto. Os ectoparasitos em fase parasitária e de vida livre foram coletados no período de maio de 2002 a abril de 2003. Os carrapatos e pulgas em fase parasitária foram coletados pela busca na superfície do corpo dos animais presentes no domicílio e peri-domicílio. A co-

leta foi feita manualmente e os artrópodes foram acondicionados em recipiente apropriado segundo o local e animal de origem. Carrapatos de vida livre foram coletados usando-se a técnica de arrasto de flanela e acondicionados da mesma forma.

Os artrópodes foram identificados taxonomicamente utilizando-se a chave dicotômica e pictórica descrita por Aragão & Fonseca 5 para carrapatos adultos e critérios morfológicos para identificação das pulgas 6, agrupados de acordo com estágio evolutivo e animal de origem em lotes contendo 1 a 8 indivíduos por lote e submetidos à extração de DNA pelo método do fenol/clorofórmio, conforme descrito anteriormente 7.

O DNA extraído foi amplificado por meio da PCR, usando-se uma reação *dúplex* contendo dois pares de iniciadores gênero específicos, um que amplifica uma seqüência do gene da proteína citrato sintase (*gltA*) e outro que amplifica uma seqüência do gene da proteína interna de membrana, 17KDa (*17KDa omp*), ambas gênero específica 8,9,10. De maneira a otimizar as análises por PCR, cada reação foi realizada com um *pool* contendo 50ng de seis diferentes amostras de DNA. Assim, cada tubo de reação continha 300ng de DNA, tampão Tris-HCl 20mM pH 8,4, KCl 50mM, MgCl₂ 1,5mM, 20 pmoles de cada iniciador e 1,25 unidade de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, Estados Unidos) em um volume final de 50mL. A mistura de reação foi submetida à desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos de anelamento a 55°C por 3 minutos, extensão a 72°C por 2 minutos, desnaturação a 95°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 7 minutos. A cada experimento foi adicionado um tubo contendo DNA obtido de células Vero infectadas experimentalmente com *R. parkeri* (controle positivo) e um tubo contendo todos os reagentes exceto DNA (controle negativo). Os produtos amplificados foram visualizados em gel de poliacrilamida 8% corado pela prata 11. Os produtos (5µL) que não apresentaram amplificação nesta reação foram submetidos a uma reamplificação na qual foi utilizado um par de iniciadores internos para o gene 17kDa (*full nested* PCR). As condições da segunda reação foram semelhantes à primeira, sendo que a temperatura de anelamento foi diminuída para 50°C. A seqüência dos iniciadores utilizados e o tamanho dos produtos amplificados estão apresentados na Tabela 1. Os produtos de PCR que apresentaram resultado positivo foram clonados no vetor pCR® 2.1-TOPO do *kit TOPO TA Cloning®* da Invitrogen, purificados utilizando-se o *kit Wizard® Plus SV*

Tabela 1

Seqüência dos iniciadores e tamanho dos produtos amplificados nas reações de PCR.

Iniciador	Gene	Seqüência nucleotídica (5' _3')	Tamanho do produto amplificado
Cs877p Cs1258n	gltA	GGGGGCCTGCTCACGGCGG ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA	381 pb
17KDa 1 17KDa 2	17 KDa omp	GCTCTTGCAACTTCTATGTT CATTGTTGTCAGGTTGGCG	434 pb
N 17kDa 1 N 17kDa 2	17 KDa omp (nested)	CATTACTTGTTCTCAATTCGGT GTTTTATTAGTGGTTACGTAA	232 pb

Minipreps DNA Purification System da Promega e ambas as fitas foram seqüenciadas com o iniciador universal usando o *kit* de seqüenciamento ABI PRISM *BigDye III Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* da Applied Biosystems em um seqüenciador automático de DNA (ABI PRISM). As seqüências obtidas de ambas as fitas foram alinhadas utilizando-se o programa *ClustalW* (disponível no endereço eletrônico: <http://www.workbench.sdsc.edu>), editadas usando-se o programa Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) e submetidas à pesquisa de homologia com outras seqüências depositadas no *GenBank*, utilizando-se o programa BLASTn¹².

Amostras de 10ml de sangue foram coletadas por meio de venocentese da cefálica em cães ou da jugular em eqüinos presentes no domicílio e peri-domicílio do bairro da Cadeia, e identificados de acordo com o animal de origem e proprietário. Foram coletados 91 soros de animais, sendo 73 amostras provenientes de cães e 18 de eqüinos. O soro foi obtido por meio de centrifugação das amostras a 3.000rpm por 10 minutos e congelados em tubos de polipropileno a -20°C, até o momento da análise. Alíquotas de soro diluídas em tampão fosfato (PBS pH 7,2) foram depositadas sobre lâminas contendo antígeno específico de *R. rickettsii* e incubadas a 37°C. A cada lâmina foi adicionado o conjugado *Fluorine H* (BIOLAB) anticão e anticavalos, marcados com isotiocianato de fluoresceína. Os soros foram testados na diluição 1:64, sendo este o ponto de corte utilizado¹³.

Resultados

Foram coletados um total de 2.610 ectoparasitos, dentre eles, 2.241 carrapatos (85,5%) e 379 pulgas (14,5%). Os carrapatos foram encontrados nos três estádios de desenvolvimento (larvas, ninfas e adultos), sendo que as formas adultas (1.535 indivíduos) compuseram 68% do total. Na identificação taxonômica dos carrapatos adultos foram reconhecidas as espécies *Amblyomma cajennense* (73%), *Rhipicephalus sanguineus* (23%) e *Anocentor nitens* (4%) parasitando eqüinos e cães. As pulgas foram identificadas como pertencentes ao gênero *Ctenocephalides* e foram encontradas parasitando cães e gatos.

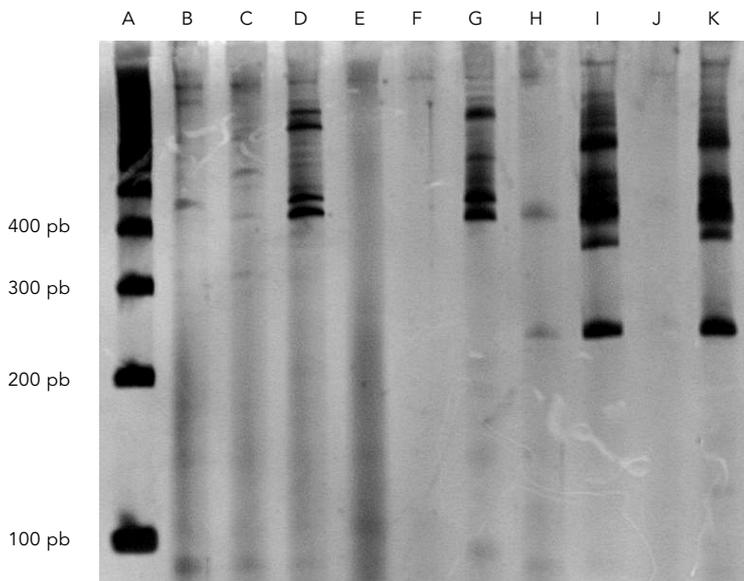
De um total de 119 *pools* de DNA analisados por PCR, 16 apresentaram resultado positivo. Destes, 6 *pools* foram provenientes de DNA de pulgas e 10 de DNA de carrapatos. A Figura 1 retrata um gel no qual estão apresentados resultados da análise de quatro das amostras testadas.

Das amostras positivas, foram realizados o seqüenciamento e pesquisa de homologia. Uma amostra proveniente de *Ctenocephalides* coletada em cão apresentou 100% de homologia com *R. felis*. Duas seqüências obtidas de *A. cajennense* (oriundos de cavalo) e *R. sanguineus* (cão) apresentaram 100% e 99% de homologia com *R. felis*, respectivamente. A seqüência de uma amostra de *A. cajennense* coletada em cavalo revelou homologia de 97%, tanto com *R. rickettsii* quanto com *R. honei* (Tabela 2).

Nenhum dos soros de cães analisados (n = 73) apresentou resultado positivo à RIFI, enquanto que 3/18 dos soros de eqüinos (17%) mostraram-se positivos nos títulos 1:64 (n = 1) e 1:128 (n = 2).

Figura 1

Gel de poli-acrilamida 8% corado pela prata de produto amplificado de PCR dúplex usando os pares de iniciadores Cs877p, Cs1258n e 17KDa 1, e 17KDa 2; e produto amplificado de *full nested* PCR usando o par de iniciadores n17KDa 1 e n17KDa 2.



Nota: Canaleta A – marcador de peso molecular (100 pb ladder); Canaletas B a E – PCR dúplex de amostras de campo; Canaleta F – controle negativo (dúplex); Canaleta G – controle positivo (dúplex); Canaletas H e I – nested PCR das amostras B e C, respectivamente; Canaleta J – controle negativo (nested PCR); Canaleta K – controle positivo nested PCR.

Discussão

A coleta de ectoparasitas de vida livre e parasitando cães, gatos e equinos do domicílio e peri-domicílio do bairro Candeias em Caratinga foi realizada no período de maio de 2002 a abril de 2003, com coletas bimensais, o que permitiu a cobertura da variação sazonal da distribuição dos estádios evolutivos do carrapato. Todas as pulgas que infestavam cães e gatos eram do gênero *Ctenocephalides*, que apresenta ampla distribuição mundial e variado espectro de hospedeiros, sendo um dos parasitas mais comuns em cães e gatos, além de se alimentar também em humanos^{14,15}.

A ocorrência de pulgas do gênero *Ctenocephalides* infectadas com *R. felis*, detectadas por meio de PCR, constitui evidência de que a *R. felis* pode ser uma espécie de importância epidemiológica na região estudada, indicando uma possibilidade de surgimento de outras riquetsioses humanas na região, além de atestar a po-

tencialidade das pulgas como vetores na transmissão das riquetsioses. *R. felis*, inicialmente designada agente ELB, é uma bactéria transmitida por pulgas do gênero *Ctenocephalides*, as quais também atuam como reservatórios devido à transmissão transovariana^{16,17,18}. Sua distribuição está ligada à presença do inseto vetor, e até o presente momento foram detectadas em populações de pulgas nas Américas do Sul e do Norte e Europa^{4,14}. A infecção humana por essa riquetsia tem sido demonstrada no México¹⁹, Brasil²⁰ e Europa²¹.

O *A. cajennense*, principal espécie de carrapato encontrada neste trabalho, é encontrada em abundância em todos os Estados das regiões Sudeste e Centro-oeste no Brasil, porém com distribuição limitada nas demais regiões, sendo a principal espécie de carrapato encontrada parasitando seres humanos no centro-sul brasileiro^{22,23,24} e considerada o principal vetor da febre maculosa²⁵. O fato de uma sequência de DNA amplificado de *A. cajennense* ter apresentado a mesma homologia tanto para *R. rickettsii* e *R. honei*, pode ser explicado pela metodologia empregada, uma vez que os iniciadores utilizados para o sequenciamento (17KDa) amplificam um fragmento altamente conservado dentro do gênero *Rickettsia*. De qualquer maneira, tanto *R. rickettsii* quanto *R. honei*, são espécies do grupo da febre maculosa capazes de causar doença ao homem, embora a *R. honei* não tenha sido descrita no Brasil.

O achado de carrapatos da espécie *R. sanguineus* infectado por *R. felis* é inédito na literatura, enquanto a presença de *R. felis* em carrapatos da espécie *A. cajennense* foi descrita anteriormente²⁶. Esses últimos achados são interessantes, já que no mundo das riquetsioses não tem sido descrita a presença da mesma bactéria em mais de um vetor. Acreditamos que, na verdade, as técnicas de isolamento e identificação utilizadas anteriormente não apresentavam o potencial de detecção da PCR, que é capaz de detectar a presença de fentogramas de DNA. Assim, é possível que agora estejamos apenas detectando um evento que não é novo, mas que não havia sido descrito anteriormente. Além de carrapatos da espécie *A. cajennense*, a espécie *R. sanguineus* foi encontrada de maneira importante em cães e cavalos, o que chama a atenção para a possibilidade de participação desses animais na epidemiologia das riquetsioses na região. Assim, o estudo sorológico desses hospedeiros potenciais é importante, pois pode fornecer informações sobre o ciclo epidemiológico da doença. Magnarelli et al.²⁷ observaram que a prevalência de carrapatos infectados detectados por imunofluores-

Tabela 2

Homologia de seqüências amplificadas de DNA de ectoparasitos coletados em animais domésticos. Caratinga, Minas Gerais, Brasil, no período de maio de 2002 a abril de 2003.

Pool	Animal de origem	Gênero/espécie	Homologia encontrada
06	cão	<i>Ctenocephalides</i> spp.	100% com <i>R. felis</i>
21	cavalo	<i>Amblyomma cajennense</i>	100% com <i>R. felis</i>
22	cão	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	99% com <i>R. felis</i>
28	cavalo	<i>Amblyomma cajennense</i>	97% com <i>R. rickettsii</i> e <i>R. honei</i>

cência direta é a mesma tanto em áreas endêmicas como em áreas não-endêmicas, fato este que reduz aparentemente a importância do carrapato como indicador de atividade riquetsial em uma determinada área, isto é, embora a presença do ixodídeo infectado seja necessária, ela em geral não seria suficiente para produzir casos humanos. Entretanto devem ser considerados os casos de alta infestação por carrapatos que podem alterar essa relação.

Dessa forma, para que haja atividade riquetsial poderia ser necessária a coexistência de uma relação de positividade entre vetores, hospedeiros e reservatórios, incluindo animais silvestres. O cão, assim como o cavalo, é um animal próximo do homem e ambos podem ter importante papel na cadeia epidemiológica da febre maculosa. A ausência de sorologia positiva no cão, associada à ausência de casos humanos diagnosticados no local nos últimos 12 anos parece ser importante para a caracterização de foco silencioso. No entanto, a presença de sorologia positiva em cavalos, considerando

o papel desses animais como sentinela, e a detecção molecular de riquetsias patogênicas em artrópodes vetores, apontam para necessidade de se manter um sistema de vigilância epidemiológica no local e na região. Associado a isso, há o fato desses animais serem de livre movimentação, criados soltos e utilizados para o transporte, podendo dispersar carrapatos infectados, os quais podem se estabelecer em outras áreas provocando, assim, o surgimento de novos focos.

Assim, embora tenha sido detectada a presença de anticorpos anti-riquetsias do grupo da febre maculosa no cavalo, e apesar da detecção molecular de riquetsias patogênicas em artrópodes vetores, não há registro sistemático de casos de febre maculosa na região nos últimos 12 anos, o que coloca o município num nível de baixa transmissão, embora o risco ainda exista, devendo-se manter o sistema de vigilância epidemiológica e acarológica no local e região.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi caracterizar *Rickettsia* spp. circulante em artrópodes vetores no Município de Caratinga, Minas Gerais, Brasil, por meio da PCR, e investigar a presença de anticorpos para riquetsias do grupo da febre maculosa em cães e eqüinos. 2.610 ectoparasitos foram coletados e identificados taxonomicamente. Amostras de DNA obtidas desses vetores foram submetidas à PCR e seqüenciamento. Em pulgas do gênero *Ctenocephalides* e em carrapatos *Amblyomma cajennense* foram identificadas seqüências com 100% de homologia com *R. felis*. Em carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* uma seqüência apresentou 99% de homologia com *R. felis* e uma seqüência obtida de *A. cajennense* apresentou 97% de homologia

com *R. honei* e *R. rickettsii*. Soros de cães (73) e de eqüinos (18) foram submetidos à imunofluorescência indireta (RIFI) usando-se antígeno de *R. rickettsii*. Apenas três dos soros de eqüinos (17%) mostraram-se positivos. A detecção molecular de riquetsias potencialmente patogênicas ao homem em vetores e a presença de sororeatividade para riquetsias do grupo da febre maculosa em eqüinos, demonstram o risco de transmissão de riquetsioses nessa área e a necessidade de se manter um sistema contínuo de vigilância epidemiológica.

Rickettsia; Rickettsioses; Febre Maculosa; Vetores Artrópodes

Colaboradores

L. D. Cardoso realizou a revisão bibliográfica, participou de todos os experimentos e realizou a análise e discussão dos dados. R. N. Freitas e C. V. B. Neves realizaram a extração de DNA, as reações de amplificação, as clonagens e os seqüenciamentos. C. L. Mafra, M. B. Labruna e S. M. Gennari colaboraram no planejamento do trabalho de campo e na coleta de vetores e sangue dos cães e eqüinos e C. L. Mafra foi responsável pela classificação taxonômica dos vetores, colaborou nos experimentos de sorologia, na análise e discussão dos dados. F. C. B. Figueira colaborou no cultivo de células Vero infectadas com *Rickettsia parkeri* e na obtenção de DNA para os controles positivos da PCR. D. H. Walker colaborou na obtenção dos antígenos para a sorologia, na análise e confirmação dos seqüenciamentos e na discussão dos resultados. M. A. M. Galvão coordenou o projeto e foi responsável pelo desenho do mesmo, colaborou nos experimentos de sorologia, na análise e discussão dos dados. L. D. Cardoso, R. N. Freitas e M. A. M. Galvão elaboraram a versão final do artigo.

Agradecimentos

Agradecemos ao laboratório Referência Estadual para Rickettsioses da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) em Belo Horizonte, Minas Gerais, onde foram realizadas as análises sorológicas; à Secretaria Municipal de Saúde de Caratinga e ao veterinário Álvaro Tapias que colaboraram com a infra-estrutura e material utilizado no trabalho de campo.

Referências

1. Hoogstraal H. Ticks in relation to human diseases caused by *Rickettsia* species. *Ann Rev Entomol* 1967; 12:377-420.
2. Friedhoff KT. Interaction between parasite and tick vector. *Int J Parasitol* 1990; 20:525-35.
3. Galvão MAM. Febre maculosa em Minas Gerais: um estudo sobre a distribuição da doença no estado e seu comportamento em área de foco periurbano [Tese de Doutorado]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 1996.
4. Oliveira RP, Galvão MAM, Mafra CL, Chamone CB, Calic SB, Silva SU, et al. *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides* spp. fleas, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2002; 8:317-9.
5. Aragão HB, Fonseca F. Notas de ixidologia. VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixidológica brasileira. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1961; 59:115-29.
6. Ruppert EE, Fox RS, Barnes RB. Invertebrate zoology: a functional evolutionary approach. 7th Ed. Belmont: Brooks Cole Thomson; 2004.
7. Billings AN, Yu XJ, Teel PD, Walker DH. Detection of spotted fever group *Rickettsia* in *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in South Texas. *J Med Ent* 1998; 35:474-8.
8. Azad AF, Webb L, Carl M, Dasch GA. Detection of *Rickettsiae* in arthropod vectors by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Ann NY Acad Sci* 1990; 590:557-63.
9. Webb L, Carl M, Malloy DC, Dasch GA, Azad AF. Detection of murine typhus infection in fleas by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990; 28:530-4.
10. Schriefer ME, Sacci JB, Dumler S, Bullen MG, Azad AF. Identification of a novel rickettsial infection in a patient diagnosed with murine typhus. *J Clin Microbiol* 1994; 32:949-54.
11. Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrilamide gels. *Biotechnol* 1994; 17:914-21.
12. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997; 25:3389-402.
13. Dumler SJ, Walker DH. Diagnostic tests for Rocky Mountain spotted fever and other rickettsial diseases. *Dermatol Clin* 1994; 12:25-36.
14. Márquez FJ, Muniain MA, Pérez JM, Pachón J. Presence of *Rickettsia felis* in the cat flea form southwestern Europe. *Emerg Infect Dis* 2002; 8:89-91.
15. Kenny MJ, Birtles RJ, Day MJ, Shaw SE. *Rickettsia felis* in the United Kingdom. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:1023-4.
16. Azad AF, Sacci Jr. JB, Nelson WM, Dasch GA, Schmidtman ET, Carl M. Genetic characterization and transovarial transmission of a typhus-like rickettsia found in cat fleas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:43-6.
17. Higgins JA, Radulovic S, Schieffer ME, Azad AF. *Rickettsia felis*: a new specie of pathogenic *Rickettsia* isolated from cat fleas. *J Clin Microbiol* 1996; 34:671-4.
18. Bouyer DH, Stenos J, Crocquet-Valdes PA. *Rickettsia felis*: molecular characterization of a new

- member of the spotted fever group. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51:339-47.
19. Zavala-Velazquez JE, Ruiz-Sosa JA, Vado-Solis IRA, Billings NA, Walker DH. Serologic study of the prevalence of rickettsiosis in Yucatan: evidence for a prevalent spotted fever group rickettsiosis. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61:405-8.
 20. Raoult D, La Scola B, Anea M, Fournier PE, Roux V, Fenollar F, et al. A flea associated *Rickettsia* pathogenic for humans. *Emerg Infect Dis* 2001; 7:73-81.
 21. Richter J, Fournier PE, Petridou J, Haussinger D, Raoult D. *Rickettsia felis* infection acquires in Europe and documented by polymerase chain reaction. *Emerg Infect Dis* 2002; 8:207-8.
 22. Guimarães JH, Tucci EC, Barros-Battesti, DM. Ectoparasitos de importância veterinária. São Paulo: Editora Plêiade; 2001.
 23. Labruna MB, Kerber CE, Ferreira F, Faccini JLH, De Waal DT, Gennari SM. Risk factors to tick infestations and their occurrence horses in the State of São Paulo, Brazil. *Vet Parasitol* 2001; 97:1-14.
 24. Secretaria de Estado da Saúde. Manual de vigilância acarológica. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde; 2004.
 25. Dias E, Martins AV. Spotted fever in Brazil: a summary. *Am J Trop Med* 1939; 19:103-8.
 26. Galvão MAM, Bouyer DH, Olano JP, Cerqueira-Leite R, Walker DH. *Rickettsia felis* in *Amblyomma cajennense* ticks, Brazil. In: International Conference on Rickettsiae and Rickettsial Diseases, Book of Abstracts. Ljubljana: MIDA/Institute of Microbiology and Immunology, Medical Faculty; 2002. p. 103.
 27. Magnarelli LA, Anderson JF, Philip RN, Burgdorfer W, Casper EA. Endemicity of spotted fever group rickettsiae in Connecticut. *Am J Trop Med Hyg* 1981; 30:239-52.

Recebido em 27/Jun/2005

Versão final reapresentada em 08/Nov/2005

Aprovado em 16/Nov/2005