

Pesquisa de *Rickettsia* spp em carrapatos *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* no Estado de São Paulo

Survey of *Rickettsia* spp in the ticks *Amblyomma cajennense* and *Amblyomma dubitatum* in the State of São Paulo

Richard Campos Pacheco¹, Maurício Cláudio Horta¹, Adriano Pinter², Jonas Moraes-Filho¹, Thiago Fernandes Martins¹, Marcello Schiavo Nardi¹, Savina Silvana Aparecida Lacerra de Souza², Celso Eduardo de Souza², Matias Pablo Juan Szabó³, Leonardo José Richtzenhain¹ e Marcelo Bahia Labruna¹

RESUMO

Foi pesquisada a presença de riquetsias em 3.545 carrapatos *Amblyomma cajennense* e 2.666 *Amblyomma dubitatum*. Através do teste de hemolinfa, reação em cadeia pela polimerase e isolamento de rickettsia em cultivo celular, todos os *Amblyomma cajennense* foram negativos, sendo que 634 (23,8%) *Amblyomma dubitatum* mostraram-se infectados com *Rickettsia bellii*.

Palavras-chaves: Carrapatos. *Amblyomma dubitatum*. *Amblyomma cajennense*. *Rickettsia bellii*. Isolamento em cultivo celular.

ABSTRACT

The presence of rickettsial infection was surveyed in 3,545 *Amblyomma cajennense* ticks and 2,666 *Amblyomma dubitatum* ticks. Using the hemolymph test, polymerase chain reaction and isolation of *Rickettsia* in cell cultures, all of the *Amblyomma cajennense* were negative, whereas 634 (23.8%) of the *Amblyomma dubitatum* ticks were shown to be infected with *Rickettsia bellii*.

Key-words: Ticks. *Amblyomma dubitatum*. *Amblyomma cajennense*. *Rickettsia bellii*. Isolation in cell culture.

A febre maculosa brasileira (FMB), doença causada pela bactéria *Rickettsia rickettsii*, é o principal agravo em consequência da infecção por riquetsias do grupo da febre maculosa (GFM) em humanos no Brasil. Casos confirmados de FMB têm sido relatados em determinadas áreas dos Estados da região Sudeste¹⁸. O carrapato *Amblyomma cajennense* é incriminado como o principal vetor da doença⁵ e, embora não haja comprovação do papel do *Amblyomma dubitatum* na transmissão da FMB, suspeita-se de sua possível participação na transmissão de riquetsias do GFM para humanos^{11 12}. Os equinos, capivaras e antas estão entre os principais hospedeiros para todos os estágios parasitários de *Amblyomma cajennense*⁷, enquanto as capivaras são também hospedeiros primários para o *Amblyomma dubitatum*⁹. Desta forma, este trabalho buscou avaliar a infecção

por *Rickettsia* spp em carrapatos *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* no Estado de São Paulo.

Durante o período de 2002 a 2006, carrapatos adultos das espécies *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum*, provenientes de 16 localidades do Estado de São Paulo (**Figura 1**), foram capturados em vida livre e, também através da retirada manual sobre as capivaras. Os carrapatos foram inicialmente submetidos ao teste de hemolinfa², método de triagem para detectar organismos morfológicamente compatíveis com riquetsias e, em seguida congelados a -80°C para posterior processamento. Os carrapatos positivos pelo teste de hemolinfa tiveram suas patas removidas, sem que o corpo fosse descongelado, as quais foram submetidas à extração de DNA e a técnica da reação em cadeia pela polimerase (PCR) utilizando-se os oligonucleotídeos CS-78 e CS-323, que amplificam um fragmento de 401 pares de base (pb) do gene citrato sintase (*glta*), presente em todas as espécies de riquetsias¹¹. Se positivo, a amostra de DNA era testada por outro PCR utilizando-se os oligonucleotídeos Rr190.70p e Rr190.602n, os quais amplificam um fragmento de 530pb do gene *ompA* (proteína de 190kDa), presente apenas em riquetsias do GFM¹⁶. Produtos da PCR foram purificados e, em seguida o DNA de cada amostra foi sequenciado¹⁴. As sequências obtidas foram submetidas ao programa *BLAST analysis* para determinar similaridades com outras espécies de riquetsias¹.

1. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
2. Superintendência de Controle de Endemias, São Paulo, SP. 3. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.

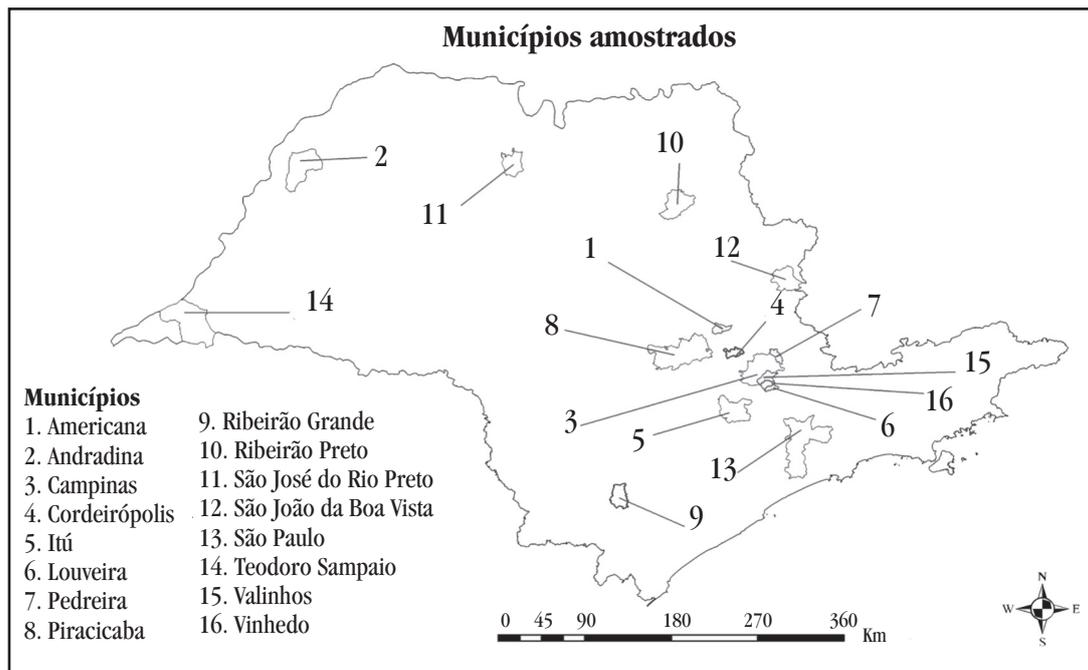
Apoio financeiro: FAPESP (processo n.º 03/13871-8)

Endereço para correspondência: Dr. Richard de Campos Pacheco. Laboratório de Doenças Parasitárias/Depto. Med. Vet. Preventiva e Saúde Animal/FMVZ/USP. Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, Cidade Universitária, 05508-270 São Paulo, SP.
Tel: 55 11 3091-1394; Fax: 55 11 3091-7928

e-mail: pachecorc@hotmail.com

Recebido para publicação em 25/06/2008

Aceito em 29/04/2009

**FIGURA 1**

Localização dos 16 municípios no Estado de São Paulo, onde foram coletados as amostras de carrapatos *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum*, no período de 2002 a 2006.

Dois carrapatos *Amblyomma dubitatum*, positivos na PCR para o gene *gltA*, foram descongelados e submetidos à técnica de isolamento de riquétsias em cultura de células Vero, conforme previamente descrito¹¹. Depois de estabelecido os isolados, foi realizado a extração de DNA de uma alíquota de cada inóculo, a qual foi testada por uma bateria de PCR's, objetivando a caracterização molecular dos isolados. Para a realização de cada reação foram utilizados os oligonucleotídeos CS-239 e CS-1069, que amplificam um fragmento de 834pb do gene *gltA*¹¹, oligonucleotídeos 17k-5 e 17k-3, os quais amplificam um fragmento de 549pb do gene *btrA* (proteína de 17kDa)¹¹, oligonucleotídeos 120-M59 e 120-807 para amplificação de um fragmento de 865pb do gene *ompB* (proteína de 135kDa)¹⁷ e, por fim uma alíquota dos isolados foi testada pela PCR utilizando os oligonucleotídeos Rr190.70p e Rr190.602n¹⁶.

Um total de 3.545 carrapatos *Amblyomma cajennense* e 2.666 *Amblyomma dubitatum* foi coletado nas 16 áreas estudadas. Dos *Amblyomma cajennense*, 3.517 foram negativos pelo teste de hemolinfa e 28 amostras foram inconclusivas, em consequência de problemas inerentes à técnica. Dos 2.666 *Amblyomma dubitatum*, 2.019 foram negativos no teste de hemolinfa, 244 foram inconclusivos e em 403 amostras foi possível observar organismos morfológicamente compatíveis com riquétsias.

Os 28 carrapatos *Amblyomma cajennense* inconclusivos pelo teste de hemolinfa foram negativos pela PCR. Dos 647 *Amblyomma dubitatum* positivos e inconclusivos, 634 (403 previamente positivos e 231 inconclusivos no teste de hemolinfa) foram positivos na PCR para o gene *gltA* (Tabela 1). Nenhum deles foi positivo para o gene *ompA*. Os produtos da PCR dos 634 *Amblyomma dubitatum* positivos nessa técnica foram seqüenciados e todas as seqüências obtidas mostraram 100% de

TABELA 1

Número total de carrapatos *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* coletadas por localidade durante o período de 2002 a 2006 em 16 municípios do Estado de São Paulo e freqüência de carrapatos positivos para *Rickettsia bellii* pela PCR.

Localidade (Município)	<i>Amblyomma cajennense</i>			<i>Amblyomma dubitatum</i>		
	coletado	positivo na PCR		coletado	positivo na PCR	
	nº	nº	%	nº	nº	%
Americana	7	0	0,0	15	1	6,7
Andradina	10	0	0,0	26	0	0,0
Campinas	135	0	0,0	186	35	18,8
Cordeirópolis	6	0	0,0	432	69	15,9
Itu	88	0	0,0	196	46	23,4
Louveira	3	0	0,0	94	23	24,4
Pedreira	555	0	0,0	841	378	44,9
Piracicaba	2.662	0	0,0	499	52	10,4
Ribeirão Grande	10	0	0,0	210	13	6,1
Ribeirão Preto	39	0	0,0	13	0	0,0
São José do Rio Preto	0	0	0,0	10	0	0,0
São João da Boa Vista	4	0	0,0	0	0	0,0
São Paulo	21	0	0,0	106	12	11,3
Teodoro Sampaio	0	0	0,0	14	0	0,0
Valinhos	2	0	0,0	24	5	20,8
Vinhedo	3	0	0,0	0	0	0,0
Total	3.545	0	0,0	2.666	634	23,8

PCR: reação em cadeia da polimerase.

similaridade com as seqüências correspondentes de *Rickettsia bellii* disponíveis no GenBank (números de acesso CP000087, DQ865204, DQ517288 e U59716). Dos 16 municípios amostrados, 10 apresentaram carrapatos *Amblyomma dubitatum* infectados por *Rickettsia bellii*, numa freqüência geral de 23,8%, variando

de 6,1 a 44,9% por população de carrapato infectada (Tabela 1). Foram obtidos dois isolados de *Rickettsia bellii*, provenientes de dois carrapatos *Amblyomma dubitatum* dos municípios de Cordeirópolis e Ribeirão Grande e, designados como Ad-CORD-SP e Ad-25-INT, respectivamente. Amostras de DNA de células infectadas da terceira passagem dos dois isolados geraram fragmentos de 1.078 a 1.092pb para o gene *gltA* e de 498 a 499pb para o gene *htrA*, respectivamente, os quais mostraram todos 100% de identidade com seqüências correspondentes de *Rickettsia bellii* no GenBank (números de acesso CP000087 e CP000849 para Ad-CORD-SP; DQ865204 e AY362702 para Ad-25-INT). Fragmentos dos genes *ompA* e *ompB* não foram obtidos para esses dois isolados.

Embora o carrapato *Amblyomma cajennense* seja o principal vetor de *Rickettsia rickettsii* no Brasil⁵, no presente estudo não foi possível verificar a infecção por nenhuma espécie de riquetsia neste carrapato. Sangioni e cols¹⁸ observaram resultado semelhante em seis outras áreas do Estado de São Paulo, possivelmente em consequência de uma baixa infecção pela bactéria. Notavelmente, Labruna e cols⁸ observaram que o *Amblyomma cajennense* é parcialmente refratário à infecção por *Rickettsia rickettsii*, quando comparado com outras espécies de carrapatos. A *Rickettsia bellii* foi a única espécie de riquetsia encontrada infectando carrapatos *Amblyomma dubitatum*. Esta espécie de riquetsia, embora de patogenicidade desconhecida para os seres humanos, tem sido relatada infectando inúmeras espécies de carrapatos no Brasil, incluindo *Amblyomma dubitatum*, com freqüências variadas de 0 a 100%, dependendo da espécie e população de carrapato^{4 6 10 11 14 15}.

Pacheco e cols¹³, avaliando a infecção por *Rickettsia* spp pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) em capivaras de seis municípios do Estado de São Paulo, onde nunca houve relatos de FMB em seres humanos, observaram evidências sorológicas de infecção por *Rickettsia parkeri* em capivaras de apenas um município e, por *Rickettsia bellii* em outros quatro locais, onde a maior parte das capivaras estavam infestadas por *Amblyomma dubitatum*. Esses resultados, em conjunto com o presente trabalho, indicam que enquanto a maior parte das populações de *Amblyomma dubitatum* do Estado de São Paulo encontram-se infectada por *Rickettsia bellii*, a infecção por riquetsias do GFM, como a *Rickettsia parkeri*, parece ser um achado bem raro nessa espécie de carrapato^{11 12}. Futuros estudos deverão avaliar o papel da infecção por *Rickettsia bellii* em diferentes populações de carrapatos, especialmente no que diz respeito à ecologia de riquetsias do GFM, uma vez que é sabido que um carrapato infectado por uma espécie de *Rickettsia* se torna refratário à infecção por uma segunda espécie de *Rickettsia*³.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro e ao Cássio Peterka do Instituto de Pesquisa Ecológica pela colaboração na coleta de amostras de carrapato.

REFERÊNCIAS

- Altschul SE, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410, 1990.
- Burgdorfer W. The hemolymph test. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 19: 1010-1014, 1970.
- Burgdorfer W, Hayes SF, Mavros AJ. Nonpathogenic rickettsiae in *Dermacentor andersoni*: a limiting factor for the distribution of *Rickettsia rickettsii*. In: Burgdorfer W, Anacker RL (eds) *Rickettsiae and rickettsial diseases*, Academic Press, Inc., New York, p. 585-594, 1981.
- Estrada DA, Schumaker TTS, Souza CE, Rodrigues Neto EJ, Linhares AX. Detecção de riquetsias em carrapatos do gênero *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) coletados em parque urbano do município de Campinas, SP. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39: 68-71, 2006.
- Guedes E, Leite RC, Prata MC, Pacheco RC, Walker DH, Labruna MB. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100: 841-845, 2005.
- Horta MC, Labruna MB, Pinter A, Linardi PM, Schumaker TTS. *Rickettsia* infection in five areas of the state of São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102: 793-801, 2007.
- Labruna MB, Kerber CE, Ferreira F, Faccini JLH, Waal DT, Gennari SM. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the state of São Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology* 97: 1-14, 2001.
- Labruna MB, Ogrzewalska M, Martins TF, Pinter A, Horta MC. Comparative susceptibility of larval stages of *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma cajennense*, and *Rhipicephalus sanguineus* to infection by *Rickettsia rickettsii*. *Journal of Medical Entomology* 45: 1156-1159, 2008.
- Labruna MB, Pinter A, Teixeira RHE. Life-cycle of *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae) using capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) as hosts. *Experimental and Applied Acarology* 32: 79-88, 2004.
- Labruna MB, Whitworth T, Bouyer DH, McBride JW, Camargo LMA, Camargo EP, Popov V, Walker DH. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the state of Rondônia, Western Amazon, Brazil. *Journal of Medical Entomology* 41: 1073-1081, 2004.
- Labruna MB, Whitworth T, Horta MC, Bouyer DH, McBride JW, Pinter A, Popov V, Gennari SM, Walker DH. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the State of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 90-98, 2004.
- Lemos ERS, Melles HHB, Colombo S, Machado RD, Coura JR, Guimarães MAA, Sanseverino SR, Moura A. Primary isolation of spotted fever in the group rickettsiae from *Amblyomma cooperi* collected from *Hydrochaeris hydrochaeris* in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 91: 273-275, 1996.
- Pacheco RC, Horta MC, Moraes-Filho J, Ataliba AA, Pinter A, Labruna MB. Rickettsial infection in capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from São Paulo, Brazil: serological evidence for infection by *Rickettsia bellii* and *Rickettsia parkeri*. *Biomédica* 27: 364-371, 2007.
- Pacheco RC, Rosa S, Richtzenhain L, Szabó MPJ, Labruna MB. Isolation of *Rickettsia bellii* from *Amblyomma ovale* and *Amblyomma incisum* ticks from Southern Brazil. *Revista MVZ Córdoba* 13: 1273-1279, 2008.
- Pinter A, Labruna MB. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. *Annals of New York Academic Science* 1078: 523-529, 2006.
- Regnery RL, Spruill CL, Plikaytis BD. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *Journal of Bacteriology* 173: 1576-1589, 1991.
- Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer membrane protein rOmpB (*ompB*). *International Journal of Systematic Evolution and Microbiology* 50: 1449-1455, 2000.
- Sangioni LA, Horta MC, Vianna MCV, Gennari SM, Soares RM, Galvão MAM, Schumaker TTS, Ferreira F, Vidotto O, Labruna MB. Rickettsial infection in animals and Brazilian Spotted Fever endemicity. *Emerging Infectious Diseases* 11: 265-269, 2005.