

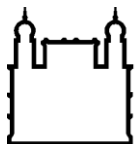
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação Biodiversidade e Saúde

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, ANÁLISE
FILOGENÉTICA E EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À
INFECÇÃO DE RIQUÉTSIAS DO GRUPO FEBRE MACULOSA
CIRCULANTES NO BRASIL**

ARANNADIA BARBOSA SILVA

Rio de Janeiro
Julho de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

ARANNADIA BARBOSA SILVA

Isolamento, caracterização molecular, análise filogenética e expressão de genes relacionados à infecção de riquetsias do Grupo Febre Maculosa circulantes no Brasil

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências (Biodiversidade e Saúde).

Orientador (es): Prof. Dr. Gilberto Salles Gazêta
Prof. Dr. Erik Machado Ferreira

RIO DE JANEIRO

Julho de 2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

S586 Silva, Arannadia Barbosa

Isolamento, caracterização molecular, análise filogenética e expressão de genes relacionados à infecção de riquetsias do grupo febre maculosa circulantes no Brasil / Arannadia Barbosa Silva. – Rio de Janeiro, 2016.

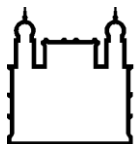
xx, 90 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, 2016.

Bibliografia: f. 68-85

1. Patógenos transmitidos por carrapatos. 2. Filogenia. 3. Cinética.
4. Expressão. I. Título.

CDD 579.327



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

ARANNADIA BARBOSA SILVA

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, ANÁLISE FILOGENÉTICA E EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À INFECÇÃO DE RIQUÉTSIAS GRUPO FEBRE MACULOSA CIRCULANTES NO BRASIL

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Gilberto Salles Gazêta
Prof. Dr. Erik Machado Ferreira**

Aprovada em: 15/ 07 / 2016

EXAMINADORES:

**Dra. Rita de Maria Seabra Nogueira – Universidade Estadual do Maranhão -
UEMA - Presidente**

Dra. Myrian Morato Duarte – Fundação Ezequiel Dias – FUNED - Titular

Dra. Rafaela Vieira Bruno – Instituto Oswaldo Cruz – IOC/ FIOCRUZ - Titular

Dra. Heloiza H. de O. M. Amaral (Sec. Estadual de Saúde/ RJ) - Suplente

Dra. Marinete Amorim– Instituto Oswaldo Cruz – IOC/ FIOCRUZ - Suplente

Rio de Janeiro, 15 de Julho de 2016.

*Em especial aos meus pais, que sempre me incentivaram à
pesquisa e me deram liberdade para pensar em caminhadas mais longas e
distantes!*

AGRADECIMENTOS

À Deus por permitir que eu cumpra mais esta etapa. Aos meus pais Julio e Francisca pelo amor incondicional, pelo incentivo, e por me mostrar o melhor caminho a seguir.

Aos meus irmãos (Ana Carla e Amarildo), Andressa, Samara, Marley, aos meus avós: Daniel Fernandes e Maria Fernandes (*in memorian*), Luís Pereira (*in memorian*) e Maria Alves (*in memorian*); meus tios e primos. Agradeço a todos, que sempre alegram minhas estadas em Imperatriz!

À pesquisadora Dra Rita Seabra, minha orientadora de Iniciação Científica e Mestrado, por ainda se fazer presente em minha vida, através de suas grandes contribuições para minha formação profissional, preocupações com meu bem-estar, apoio e amizade.

Aos meus orientadores Gilberto S. Gazêta e Erik Machado pela orientação, paciência, compreensão e incentivo durante esses quatro anos de convivência.

Aos professores Gazêta, Marinete e Serra-Freire (*in memorian*) do Laboratorio de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses – LIRN (IOC/FIOCRUZ) agradeço a todos vocês, pelo acolhimento e pela grande contribuição na minha vida profissional, através dos ensinamentos sobre carrapatos, riquetsias e sobre a vida.

Ao Dr. Vinicius Vizzoni pelo bom humor e ensinamentos. Muito obrigada por sempre me socorrer nas minhas dúvidas em relação à genética.

À toda família LIRN: Karen, Nicole, Karlinha, Tayra, Bia Gois, Bia Borsoi, Liege, Rebecca, Alessandro, Leonardo, Paula, Ademar, Valmir, Alciléia, Glécio, Diego, Beth; muito obrigada pelos momentos alegres que passamos no laboratório.

Às grandes amigas que fiz no Rio de Janeiro que levarei sempre no meu coração: Fenanda, Karen, Nicole, Tayra, Clarice e Lucia. Muito Obrigada por fazerem parte da minha vida.

À Karen, Nicole e Tayra que sempre estiveram dispostas a me ajudar na bancada, seja na Fiocruz ou UFRJ. Agradeço imensamente à Tayra pela ajuda na formatação.

À Fundação Ezequiel Dias (FUNED) pela parceria direta e indireta na realização deste trabalho: Ana Iris, Glauco, Gabriela, Ivanir, Felipe, Talita e Edilza; em especial à Myrian, por toda atenção e companherismo não medindo esforços para realização dos experimentos.

À equipe da IV Coordenadoria Regional da Saúde – Baturité da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará pela coleta dos carrapatos.

Aos meus amigos maranheses Ermilton e Mayra que estiveram comigo em todos os momentos que passei em Belo Horizonte, muito obrigada pela amizade e por proporcionarem momentos tão alegres nesta cidade mineira.

Ao pesquisador prof Dr. Carlos Soares Laboratório de Genética Molecular de Eucariontes e Simbiontes da UFRJ, pela colaboração neste trabalho.

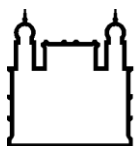
Ao programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, ao coordenador prof Dr. Cleber Galvão e Luciana Mara pelos conhecimentos transmitidos ao longo desses quatro anos.

À Fundação de Amparo a Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão, pela concessão da bolsa de doutorado

A todos que de alguma forma, mesmo com um simples "Boa Sorte", contribuíram para a concretização de mais esta etapa. MUITO OBRIGADA!!

“ Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a eletricidade e a energia atômica: a vontade.”

(Albert Einstein)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, ANÁLISE FILOGENÉTICA E EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À INFECÇÃO DE RIQUÉTSIAS DO GRUPO FEBRE MACULOSA CIRCULANTES NO BRASIL

RESUMO

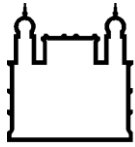
TESE DE DOUTORADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Arannadia Barbosa Silva

No Brasil, a Febre Maculosa (FM) é causada por *Rickettsia rickettsii* e por uma riquetsia filogeneticamente próxima à *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia sibirica* e *Rickettsia africae*, denominada de *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica. A FM causada por *R. rickettsii* concentra-se na região Sudeste e agrega todos os óbitos relacionados a esse agravo, enquanto aquela relacionada à *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica é de característica mais branda, sendo relatada nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste do país. Assim, apesar da evidente diversidade da FM no território brasileiro, não há, até o momento, a caracterização das espécies circulantes em alguns focos importantes no país, bem como o entendimento da cinética de crescimento e patogenicidade dessas espécies; conhecimento necessário e fundamental para o controle da FM. Desta forma, esta pesquisa foi dividida em três etapas: 1) realizar a análise filogenética da *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica circulante no Brasil; 2) realizar o isolamento e caracterização molecular da *Rickettsia* sp. circulante em foco recente de FM e 3) Analisar o comportamento de crescimento de estirpes de *Rickettsia* sp. do grupo FM e expressão de genes relacionados à infecção. Os resultados da primeira etapa deste trabalho baseados nas análises filogenéticas de distância par-a-par mostraram que a amostra analisada de *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica é uma espécie distinta de *R. parkeri*, no entanto, não foi possível diferenciá-la de *R. sibirica*. Neste estudo, obtivemos com sucesso o isolamento de riquetsias provenientes de carrapatos naturalmente infectados, coletados em foco recente de FM no Estado do Ceará: um isolado de *Rickettsia* sp.

filogeneticamente próximo a *R. rickettsii* que foi obtido a partir de *Rhipicephalus sanguineus* e uma *Rickettsia* sp. pertencente ao grupo FM obtida do carrapato *Amblyomma ovale*. Na terceira etapa do trabalho, avaliamos comparativamente a taxa de crescimento e expressão gênica de *R. rickettsii* cepa Taiaçu, *R. parkeri* cepa AT#24 e *R. rhipicephali* cepa HJ#5, todos isolados brasileiros, infectando células Vero. Foram observadas variações nos padrões de crescimento bacteriano destas três estirpes. Os dados sugerem que a estirpe *R. rhipicephali* apresenta um comportamento distinto, mostrando um crescimento mais rápido com elevadas taxas de infecção ao longo do período de 72 horas, quando comparada às estirpes patogênicas *R. rickettsii* e *R. parkeri*. No entanto, os dados de expressão gênica mostraram que o nível de expressão de ompA foi maior para *R. rickettsii* em comparação com as duas espécies, nas primeiras horas da infecção. A habilidade contínua das espécies de *Rickettsia* sp. em modificarem-se geneticamente impulsiona a realização de novos estudos, a fim de identificar fatores que possam contribuir para uma melhor compreensão da patogênese das riquetsias.

Palavras-chave: patógenos transmitidos por carrapatos, filogenia, cinética, expressão



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ISOLATION, MOLECULAR CHARACTERIZATION, PHYLOGENETIC ANALYSIS AND EXPRESSION OF GENES RELATED TO INFECTION SPOTTED FEVER GROUP RICKETTSIAL CIRCULATING IN BRAZIL

ABSTRACT

PHD THESIS IN BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Arannadia Barbosa Silva

In Brazil, Spotted Fever (SF) is caused by *Rickettsia rickettsii* and by another rickettsia phylogenetically close related to *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia sibirica* and *Rickettsia africae*, named *Rickettsia* sp. strain Atlantic Forest. The SF caused by *R. rickettsii* is concentrated in the Southeast region and put together all deaths related to this grievance, whereas that related to *Rickettsia* sp. strain Atlantic Forest is milder, being reported in the South, Southeast and Northeast regions. Thus, despite the apparent diversity of SF in Brazil, there is, until now, no characterization of circulating species in some important centers in the country, as well as the understanding of the growth kinetics and pathogenicity of these species, essential to the control of SF. Thus, this research was divided into three stages: 1) performing the phylogenetic analysis of *Rickettsia* sp. strain Atlantic Forest circulating in Brazil; 2) making the isolation and molecular characterization of *Rickettsia* sp. circulating in recent focus of SF and 3) compare growth of SFG *Rickettsia* sp. strains and expression of genes related to infection rickettsial. The results of the first step of this work based on peer-to-peer distance phylogenetic analyzes showed that *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest is a distinct species not related to *R. parkeri*, however, it was not possible to differentiate it from *R. sibirica*. In this study, we successfully obtained the isolation of rickettsiae from naturally infected ticks collected in SF recent focus on the state of Ceará: an isolate of *Rickettsia* sp., obtained from *Rhipicephalus sanguineus*, is phylogenetically close related to *R. rickettsii*, whereas the other isolate, obtained from the *Amblyomma ovale*, is phylogenetically close related to SFG *Rickettsia* sp. In the third stage of this work, we comparatively evaluate the rate growth and gene expression of *R. rickettsii* strain Tiaçu, *R. parkeri* strain AT#24 and *Rickettsia rhipicephali* strain HJ#5, all Brazilian isolates, infecting Vero cells. Variations in patterns of bacterial growth of the three strains were observed in this study. Data suggest that *R. rhipicephali* strain has a different behavior, showing a

more rapid growth to high rates of infection over a 72 hour period when compared to pathogenic strains *R. rickettsii* and *R. parkeri*. However, gene expression data suggest that the level of expression ompA were more highly in *R. rickettsii* when compared to the two species in the early hours of the infection. The continued ability of the *Rickettsia* to modify genetically drives new studies in order to identify factors that may contribute to a better understanding of rickettsial pathogenesis.

Keywords: tick-borne pathogens, phylogeny, kinetics, expression

ÍNDICE

RESUMO	VIII
ABSTRACT	X
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Caracterização do agente	2
1.2 Principais vetores envolvidos na transmissão de <i>Rickettsia</i> spp.	3
1.3 Epidemiologia dos agentes etiológicos da Febre Maculosa	6
1.4 Justificativa	9
2 OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo Geral	10
2.2 Objetivos Específicos	10
3 CAPÍTULO 1: ANÁLISE FILOGENÉTICA DE <i>RICKETTSIA</i> SP. CEPA MATA ATLÂNTICA CIRCULANTE NO BRASIL	11
3.1 INTRODUÇÃO	11
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.2.1 Amostras	14
3.2.2 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	15
3.2.3 Visualização dos produtos amplificados	15
3.2.4 Purificação e sequenciamento de DNA	16
3.2.5 Edição de sequências e análises filogenéticas	17
3.3 RESULTADOS.....	17
3.4 DISCUSSÃO	24
4 CAPÍTULO 2: ISOLAMENTO DE <i>RICKETTSIA</i> SP. CIRCULANTE EM FOCO RECENTE DE FEBRE MACULOSA	29
4.1 INTRODUÇÃO	29
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.2.1 Área de estudo	30
4.2.2 Isolamento de <i>Rickettsia</i> spp.	31
4.2.3 Manutenção do isolado	32
4.2.4 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	33
4.2.5 Caracterização do Isolado	33
4.3 RESULTADOS.....	35

4.3.1	Isolamento de <i>Rickettsia</i> spp. em cultura de células Vero	35
4.4	DISCUSSÃO	39
5	CAPÍTULO 3: COMPARAÇÃO DE CRESCIMENTO DE ESTIRPES DE RICKETTSIA SP. DO GRUPO FEBRE MACULOSA E EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS A INFECÇÃO	43
5.1	INTRODUÇÃO	43
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS	45
5.2.1	Cultivo Celular	45
5.2.2	Microscopia óptica.....	46
5.2.3	Extração do RNA e DNA	46
5.2.4	PCR e Sequenciamento de DNA.....	47
5.2.5	Ensaio de qPCR.....	47
5.2.6	Análise estatística	48
5.3	RESULTADOS	49
5.3.1	Confirmação das espécies	49
5.3.2	Cinética de crescimento de <i>Rickettsia</i> spp.	51
5.3.3	Expressão gênica de <i>Rickettsia</i> spp.	57
5.4	DISCUSSÃO	59
5.5	ARQUIVOS SUPLEMENTARES	64
5.5.1	Figuras suplementares	64
5.5.2	Tabelas suplementares	66
6	CONCLUSÕES	67
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
8	ANEXO	86

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 ANÁLISE FILOGENÉTICA DE *Rickettsia* sp. CEPA MATA ATLÂNTICA CIRCULANTE NO BRASIL

- Figura 1.1.** Análise filogenética desenvolvida com a sequência nucleotídica do gene *gltA*. A árvore é resultante de uma reconstrução utilizando o método Neighbor-joining com o modelo evolutivo Kimura-2p. Os números apresentados dos nós dos ramos são os valores de bootstrap obtidos a partir da análise de 1000 réplicas. Valores inferiores a 70% foram excluídos. Os números de acesso no GenBank das sequências utilizadas estão representados no início dos nomes. A sequência identificada por um triângulo pertence à *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica (*Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest)..... 19
- Figura 1.2.** Análise filogenética desenvolvida com a sequência nucleotídica do gene *ompA*. A árvore é resultante de uma reconstrução utilizando o método Neighbor-joining com o modelo evolutivo Kimura-2p. Os números apresentados nos nós dos ramos são os valores de bootstrap obtidos a partir da análise de 1000 replicatas. Valores inferiores a 70% foram excluídos. Os números de acesso no GenBank das sequencias utilizadas estão representados no início dos nomes. A sequência identificada por um triângulo pertence à *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica (*Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest)..... 20
- Figura 1.3.** Análise filogenética desenvolvida com a sequência nucleotídica do gene *ompB*. A árvore é resultante de uma reconstrução utilizando o método Neighbor-joining com o modelo evolutivo Kimura-2p. Os números apresentados nos nós dos ramos são os valores de bootstrap obtidos a partir da análise de 1000 replicatas. Valores inferiores a 70% foram excluídos. Os números de acesso no GenBank das sequencias utilizadas estão representados no início dos nomes. A sequência identificada por um triângulo pertence à *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica (*Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest)..... 22
- Figura 1.4.** Análise filogenética desenvolvida com a sequência nucleotídica do gene *D*. A árvore é resultante de uma reconstrução utilizando o método Neighbor-joining com o modelo evolutivo Kimura-2p. Os números apresentados nos nós dos ramos são os valores de bootstrap obtidos a partir da análise de 1000 replicatas. Valores inferiores a 70% foram excluídos. Os números de acesso no GenBank das sequencias utilizadas estão representados no início dos nomes. A sequência identificada por um triângulo pertence à *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica (*Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest)..... 23

CAPÍTULO 2 ISOLAMENTO DE *Rickettsia* sp. CIRCULANTE EM FOCO RECENTE DE FEBRE MACULOSA

Figura 2.1.	Área de estudo: Mapa do Brasil, Estado do Ceará, destacando os municípios que compõem Região do Maciço de Baturité.....	31
Figura 2.2.	Imagem de cultura de células Vero infectada com riquetsias isoladas a partir de carrapatos provenientes de área de foco de Febre Maculosa no Estado do Ceará. Acompanhamento da infecção do isolado 11 (AO11). A) 21º dia. B) 28º dia após o isolamento (coloração de Gimenez, 1000x).....	36
Figura 2.3.	Células Vero infectadas por riquetsias, demonstrado por coloração de Gimenez (A e B) e por ensaio de imunofluorescência indireta utilizando <i>Rickettsia</i> Universal Positive Control (diluição 1:32) e conjugado Anti-Human IgG (Scimedx Corporation) (C e D), ambas as células Vero estavam infectadas por riquetsias no 90º dia após o descongelamento. (A e C) Isolado AO11. (B e D) isolado RS8. As fotografias foram tiradas no microscópio óptico (Olympus DP72) na objetiva de 100 com aumento de 1000X (A e B) e microscópio de imunofluorescência (Olympus DP72) na objetiva de 40 com aumento de 400X (C e D). Setas indicam a presença de bactérias em forma de bastonete (estruturas compatíveis com riquetsias).....	37
Figura 2.4.	Árvore filogenética para o gene <i>htrA</i> construída pelo método Neighbor-Joining utilizando o modelo evolutivo Kimura- 2-parâmetros com o uso do programa MEGA 5.2. Os valores de bootstrap acima de 70% que dão suporte aos nós estão apresentados. Os triângulos de cor preta representam os isolados AO11 e RS8. Os números de acesso do GenBank estão entre parênteses.....	38
Figura 2.5.	Inferência filogenética para o geneD (<i>sca4</i>) construída pelo método Neighbor-Joining e modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros. Os valores de bootstrap acima de 70% que dão suporte aos nós estão representados. O triângulo de cor preta representa o isolado RS8. Os números de acesso do GenBank estão entre parênteses.....	39

CAPÍTULO 3 COMPARAÇÃO DE CRESCIMENTO DE ESTIRPES DE *Rickettsia* sp. DO GRUPO FEBRE MACULOSA E EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À INFECÇÃO

- Figura 3.1.** Inferência filogenética de *Rickettsia* sp. utilizando sequências do gene *ompA* construída pelo método Neighbor-Joining, utilizando o modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros com o uso do programa MEGA 5.2.2. Os triângulos pretos indicam sequências obtidas no presente trabalho, e os códigos de acesso GenBank para as sequências são apresentadas entre parêntesis. Os suportes dos nós internos foram calculados usando análise de bootstrap com 1000 réplicas. Os valores de bootstrap inferiores a 70% não estão presentes..... 50
- Figura 3.2.** Visualização das células Vero infectadas com estirpes de *Rickettsia* sp. do Grupo Febre Maculosa. A) Fotomicrografias ilustram a presença de *Rickettsia* sp. (*Rickettsia rickettsii* cepa Taiaçu, *Rickettsia parkeri* cepa AT#24 e *Rickettsia rhipicephali* cepa HJ#5) infectando células Vero e células Vero não infectadas (Control) coradas pelo método Giménez (1964) (aumento 1000x) nos períodos de 24, 48 e 72 horas pós-inoculação bacteriana. B) Percentagem de células Vero infectadas com *R. rickettsii* cepa Taiaçu, *R. parkeri* cepa AT#24 e *R. rhipicephali* cepa HJ#5 nos períodos de 24, 48 e 72 horas após a inoculação. Os resultados foram estatisticamente significativos (Tempo $F_{3,18}=223,56$; $p=0,000$; Espécies $F_{2,18}=5,10$; $p=0.018$; Interação, $F_{6,18}=4,43$; $p=0,006$; 95%IC; Levene's = 0,07). O teste de comparação múltipla LSD mostrou que apenas no período de 24 horas a diferença entre as três espécies foram estatisticamente significativas..... 52
- Figura 3.3.** Curva padrão para análises de qPCR de diluições seriadas de DNA (5, 10, 30, 50 e 100 ng / μ) utilizando iniciadores para os genes *ompA* de *Rickettsia* sp. e β -actina para a célula Vero. A) oligonucleotídeos (190.588F-190.701R) para o gene *ompA* utilizado em amostras de DNA de *Rickettsia rickettsii* cepa Taiaçu, *Rickettsia parkeri* cepa AT#24 e *Rickettsia rhipicephali* cepa HJ#5. B) Oligonucleotídeos (ACTB-F e ACTB-R) para o gene β -actina utilizado em amostras de DNA de células Vero. Cada ensaio de qPCR continha 30ng/ μ l e oligonucleotídeos na concentração final de 0,4mM. Ct: Threshold Cycle; RR: *R. rickettsii*; RP: *R. parkeri*; RRhip: *R. rhipicephali*..... 54

- Figura 3.4.** Quantificação relativa de estirpes de *Rickettsia* sp. do Grupo Febre Maculosa em células Vero. A) Análise relativa das taxas de crescimento de *Rickettsia rickettsii* cepa Taiacu, *Rickettsia parkeri* cepa AT#24 e *Rickettsia rhipicephali* cepa H#J5 infectando células Vero nos períodos de 1, 2, 24, 48 e 72 horas após a inoculação bacteriana. Existe diferença estatisticamente significativa entre as espécies (espécie *R. rhipicephali*, $F_{4,65} = 304,90$; $p=0,000$; 95%IC) ocorre interação entre as variáveis tempo e espécie (interação, $F_{8,65} = 114,50$; $p= 0,000$; 95%IC). B) Razão (ratio) comparativa da abundância de *R. rhipicephali* em células Vero com *R. rickettsii* e *R. parkeri*. As comparações com *R. parkeri* (barras brancas) e *R. rickettsii* (barras pretas) são apresentadas. As abundâncias de *Rickettsia* spp. foram determinadas como a quantidade relativa dos genes *ompA* (bacteriana) / *B-actina* (eucarioto) nos períodos de 2, 24, 48 e 72 horas..... 56
- Figura 3.5.** Curva padrão para análises de qPCR de diluições em série de RNA (cDNA) (5, 10, 30 e 50 ng/μ) utilizando iniciadores para os genes *gltA* e *ompA* para *Rickettsia* sp. A) oligonucleotídeos (CS5 e CS6) utilizados em amostras de RNA (cDNA) de *Rickettsia rickettsii* cepa Taiacu, *Rickettsia parkeri* cepa AT#24 e *Rickettsia rhipicephali* cepa HJ#5. B) Oligonucleotídeos (190.588F-190.701R) para o gene *ompA* utilizado em amostras de RNA (cDNA) de *R. rickettsii* cepa Taiacu, *R. parkeri* cepa AT#24 e *R. rhipicephali* cepa HJ#5. Cada ensaio de qPCR continha 30ng/μl e oligonucleotídeos na concentração final de 0,4mM. Ct: Threshold Cycle; RR: *R. rickettsii*; RP: *R. parkeri*; RRhip: *R. rhipicephali*..... 58
- Figura 3.6.** Expressão relativa de *Rickettsia rickettsii* cepa Taiacu, *Rickettsia parkeri* cepa AT#24 e *Rickettsia rhipicephali* cepa H#J5, Grupo Febre Maculosa, infectando células Vero nos períodos de 1, 2, 24 horas após a inoculação bacteriana. * Diferença significativa ($p<0,05$)..... 59

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1	ANÁLISE FILOGENÉTICA DE <i>Rickettsia</i> sp. CEPA MATA ATLÂNTICA CIRCULANTE NO BRASIL	
Tabela 1.1	Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR e sequenciamento.....	16
Tabela 1.2	Identidade entre as sequências do gene <i>gltA</i> em % - Valor máximo para ser uma nova espécie=99,9%.....	19
Tabela 1.3	Identidade entre as sequências do gene <i>ompA</i> em % - Valor máximo para ser uma nova espécie=98,8%.....	21
Tabela 1.4	Identidade entre as sequências do gene <i>ompB</i> em % - Valor máximo para ser uma nova espécie=99,2%.....	22
Tabela 1.5	Identidade entre as sequências do gene <i>geneD</i> em % - Valor máximo para ser uma nova espécie=99,3%.....	23
CAPÍTULO 2	ISOLAMENTO DE <i>Rickettsia</i> sp. CIRCULANTE EM FOCO RECENTE DE FEBRE MACULOSA	
Tabela 2.1	Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR e sequenciamento.....	34
CAPÍTULO 3	COMPARAÇÃO DE CRESCIMENTO DE ESTIRPES DE <i>Rickettsia</i> sp. DO GRUPO FEBRE MACULOSA E EXPRESSÃO DE GENES À INFECÇÃO	
Tabela 3.1	Oligonucleotídeos utilizados para a realização dos ensaios de PCR e qPCR.....	48

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

% = por cento

°C = graus Celsius

® = marca registrada

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

DNA = ácido desoxirribonucléico

DNase = Desoxirribonuclease

dNTPs= Desorribonucleotídeo trifosfatado

DMSO= Dimetilsulfóxido

EDTA = ácido etileno-diamino-tetracético

et al. = e colaboradores

FMB = febre maculosa brasileira

FM = febre maculosa

g = força da gravidade

GT= Grupo Tifo

GFM= Grupo Febre Maculosa

GA= Grupo Ancestral

KDa = quilodalton

mg = miligrama

MgCl₂ = Cloreto de Magnésio

M = molar

µg = micrograma

mL = mililitro

µL = microlitro

mM = milimolar

MEM= meio mínimo essencial de Eagle

ng = nanograma

pb = pares de bases

PCR = reação em cadeia da polimerase

qPCR= Reação em Cadeia pela Polimerase quantitativo

RIFI = Reação de Imunofluorescência Indireta

RMSF = rocky mountain spotted fever

RNA= ribonucleic acid – Ácido ribonucléico

RNase = Ribonuclease

Taq = *Thermus aquaticus*

TAE = Tris-Acetato-EDTA

TRIS = tris(hydroxymethyl/ hidroximetil) amino metano

uv = ultravioleta

1 INTRODUÇÃO

Riquetsioses são doenças infecciosas, causadas por organismos do gênero *Rickettsia*, presentes em todos os continentes, emergentes na população humana em forma epidêmica podendo causar altas taxas de mortalidade (Azad & Beard, 1998). Estão associadas a diversos artrópodes, incluindo-se piolhos, pulgas, carrapatos e ácaros (Raoult & Roux, 1997). Estas zoonoses vêm despertando grande interesse científico e na Saúde Pública em função de sua re-emergência em várias regiões do mundo.

Carrapatos pertencentes a diferentes gêneros (*Amblyomma*, *Aponoma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ixodes*, *Rhipicephalus*) podem ser observados naturalmente infectados por riquetsias em diferentes partes do mundo (Parola et al., 2005). O artrópode pode permanecer infectado durante toda sua vida, mantendo a bactéria na população de carrapatos através da transmissão transovariana e/ou transtadial. Desta forma, atua como reservatório natural. Pode ainda, durante seu repasto sanguíneo, transmitir as riquetsias para uma grande diversidade de mamíferos.

Cães, cavalos, gatos, pequenos roedores, capivaras, marsupiais e morcegos podem apresentar sorologia positiva para riquetsias (Dias & Martins 1939; Lemos 2002; Horta et al., 2004). Nos vertebrados, a riquetsemia geralmente é breve, dificultando a detecção direta das riquetsias. Na natureza, a manutenção do ciclo das riquetsias é garantida pela capacidade dos carrapatos atuarem como vetores, reservatórios e/ou amplificadores (Parola et al., 2005). Eventualmente, animais sinantrópicos e/ou domésticos que atuam como hospedeiros primários de carrapatos podem introduzir e manter carrapatos infectados em ambientes antrópicos.

Em um dado ecotópo, a disponibilidade de espécies de hospedeiros, bem como sua susceptibilidade a infecções por riquetsias e a infestações por carrapatos podem variar no espaço e ao longo do tempo. Além desta dinâmica, riquetsias do Grupo Febre Maculosa (GFM) envolvendo múltiplos grupos de vetores e mamíferos podem coexistir na mesma área, compartilhando ou não de elementos epidemiológicos (Rudakov et al., 2003). Os diferentes tipos de atividades humanas e sua conexão com a atividade sazonal dos carrapatos influenciam a manifestação epidêmica da riquetsiose no foco natural. Todos estes fatores contribuem para o aumento da complexidade da epidemiologia das riquetsioses.

1.1 Caracterização do agente

O gênero *Rickettsia* compreende bactérias intracelulares obrigatórias pertencentes à ordem Rickettsiales e a família Rickettsiaceae, descritos como formas cocobacilares, pequenos bastonetes ou bacilos Gram-negativos (0,3 a 0,5 µm por 0,8 a 2,0 µm). *Rickettsia* spp. podem se localizar no citoplasma e/ou núcleo da célula hospedeira (Eremeeva & Dasch, 2000; Eremeeva et al., 2000). Em infecções naturais, o principal alvo em animais vertebrados são as células endoteliais, nas quais o agente se multiplica, causando vasculites com a ativação de plaquetas e do sistema de coagulação (Greene & Breitschwerdt, 2006). Já nos artrópodes vetores, a bactéria permanece em células intestinais, túbulos de Malpighi, hemolinfa, glândulas salivares e ovários (Burgdorfer, 1970; Billings et al., 1998; Yu & Walker, 2003).

O desenvolvimento de novas tecnologias tem influenciado significativamente as constantes revisões taxonômicas e filogenéticas, com diferentes proposições para família Rickettsiaceae (Gillespie et al., 2007; Fournier et al., 2008; Gillespie et al., 2008; Weinert et al., 2009). Entretanto, classicamente, com base em critério antigênico e molecular, as espécies do gênero *Rickettsia* estão subdivididas tradicionalmente em Grupo Ancestral (GA), Grupo Tifo (GT) e Grupo Febre Maculosa (GFM) (Stothard et al., 1994; Roux et al., 1997; Roux & Raoult, 2000; Yu & Walker, 2003).

No GFM são reconhecidas cerca de 30 espécies do gênero *Rickettsia*. Destas, até o início do presente século, apenas nove eram consideradas patogênicas para o homem. Hoje são reconhecidas pelo menos 15 espécies deste grupo como sendo patogênicas: *Rickettsia aeschlimannii*, *Rickettsia africae*, *Rickettsia akari*, *Rickettsia australis*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia felis*, *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia honei*, *Rickettsia japonica*, *Rickettsia marmionii*, *Rickettsia mongolotimonae*, *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia sibirica*, *Rickettsia slovaca*. Com exceção de *Rickettsia akari* e *Rickettsia felis* transmitidas, respectivamente, por ácaros e pulgas, todas as demais são veiculadas por carrapatos (Raoult & Roux 1997; Graves & Stenos 2003; Brouqui et al., 2004, Parola et al., 2013).

O GA é formado pelas espécies *Rickettsia bellii* e *Rickettsia canadensis*, ambas de patogenicidade desconhecida para animais (Raoult & Roux, 1997). O GT contém as espécies *Rickettsia prowazekii* (agente causal do tifo epidêmico) e

Rickettsia typhi (agente do tifo endêmico ou murino), transmitidas por piolhos e pulgas, respectivamente.

Em 2009, Weinert e colaboradores propuseram uma nova classificação dos grupos para o gênero *Rickettsia*, baseado numa abordagem multigênica: 1) Grupo Tifo composto pela *R. prowazekii* e *R. typhi*; 2) Grupo Febre Maculosa, maior grupo e representado por mais de vinte espécies; 3) Grupo de Transição, no qual estão inseridas *R. akari*, *R. felis* e *R. australis*; 4) Grupo Canadensis, representado pela espécie *R. canadensis*; 5) Grupo Bellii, representado pela espécie *R. bellii*.

No Brasil, tradicionalmente, a doença causada por riquetsias do Grupo Febre Maculosa (GFM) era denominada Febre Maculosa Brasileira (FMB), tendo como agente etiológico *R. rickettsii*. Entretanto, com o aprimoramento das técnicas de detecção, isolamento e filogenia molecular foram descritas a circulação de *R. felis*, *R. parkeri* e outra riquetsia denominada de *Rickettsia sp.* cepa Mata Atlântica, espécies sabidamente patogênicas responsáveis por ocasionar a doença denominada Febre Maculosa (FM) (Plank et al., 1979; Oliveira et al., 2002; Labruna et al., 2004a; Labruna et al., 2004b; Silva & Galvão 2004; Silveira et al., 2007; Labruna et al., 2006; Horta et al., 2010; Silva et al., 2011; Szabó et al., 2013; Moura-Martiniano et al., 2014; Nunes et al., 2015).

Espécies de riquetsias detectadas apenas em vetores são caracterizadas como não patogênicas ou de patogenicidade desconhecida. No entanto, é possível que, no futuro, algumas destas possam ser diagnosticadas em humanos e associadas a algum tipo de patogenia, sendo assim re-classificada como patogênica, tal como sucedido com *R. parkeri* (febre ganglionar) (Paddock et al., 2004).

1.2 Principais vetores envolvidos na transmissão de *Rickettsia* spp.

Nos Estados Unidos existem oficialmente três espécies de carrapatos incriminadas na transmissão da *R. rickettsii*: *Dermacentor variabilis*, *Dermacentor andersoni* e *Rhipicephalus sanguineus* (CDC, 2006).

No Brasil, os carrapatos vetores de *Rickettsia* spp. pertencem ao gênero *Amblyomma*: *Amblyomma sculptum* (anterior *Amblyomma cajennense*) (Dias & Martins, 1939; Sangioni et al., 2005; Guedes et al., 2005), *Amblyomma aureolatum* (Pinter & Labruna, 2006; Labruna, 2009; Pinter et al., 2004) e *Amblyomma ovale* (Sabatini et al., 2010; Medeiros et al., 2011; Szabó et al., 2013). Até o momento, a

participação dos carrapatos *Amblyomma dubitatum* e *Amblyomma triste* como possíveis vetores da Febre Maculosa (FM) ainda é incerto. No entanto, há relatos da participação do *R. sanguineus* como potencial vetor da FMB (Cunha et al., 2009; Moraes-Filho et al., 2009).

A. sculptum é uma espécie de carrapato com ampla distribuição na região Neotropical com populações de carrapatos do Sul do Texas, EUA, para o Sul da América do Sul até a latitude 29°S (Estrada-Peña et al., 2004). No Brasil, *A. sculptum*, é conhecido como “carrapato estrela” sendo o principal vetor da FMB (Dias & Martins, 1939). Seus estádios evolutivos de larva, ninfa e adulto, podem transmitir a bactéria (Comer, 1991). É encontrado em abundância nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, com distribuição limitada nos demais locais (Sangioni et al., 2005). Apesar de cavalos, antas (*Tapirus terrestris*) e capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) serem os principais hospedeiros de *A. sculptum*, quando a população deste ixodídeo está aumentada, esta espécie pode se alimentar em uma ampla variedade de hospedeiros vertebrados, entre estes, o cão doméstico (Labruna & Pereira, 2001). Uma das características desta espécie é que foi estatisticamente associada com a presença de pastos “sujos” (presença de plantas indesejáveis em pastagens, tais como arbustos). Esta espécie de carrapato pode também ser frequentemente encontrada associada a matas ciliares próximas aos assentamentos humanos (Souza et al., 2006).

A. aureolatum é encontrado na área oriental da América do Sul (Guglielmone et al., 2003). No Brasil encontra-se facilmente em áreas de Mata Atlântica com habitat muito úmido e temperaturas mais frias (Pinter et al., 2004). Desta forma, é tipicamente um carrapato da Mata Atlântica com altitudes mais elevadas, como observado na região Sudeste (Sabatini et al., 2010), mas também, pode ser encontrado perto do nível do mar na região Sul do Brasil (Medeiros et al., 2011). Sob condições laboratoriais, o *A. aureolatum* é mais susceptível à infecção por *R. rickettsii* do que *A. sculptum*. Esta espécie de carrapato é mais eficiente na manutenção da infecção através perpetuação transestadial e transovariana (Labruna et al., 2008, Labruna et al., 2011). Este carrapato também já foi indicado como possível vetor de FM na porção leste do estado de São Paulo (Moraes-Filho et al., 2009), sendo considerado, em alguns locais endêmicos, como principal transmissor do *R. rickettsii* a seres humanos (Evans et al., 2000). Os canídeos, inclusive os cães domésticos, são os principais hospedeiros para os estádios adultos de *A.*

aureolatum e, em ambientes rurais próximos a remanescentes de floresta (Evans et al., 2000).

Carrapatos da espécie *A. ovale* apresentam ampla distribuição (Neotropical-Neártica) (Guglielmone et al., 2003) sendo encontrado em vários biomas brasileiros, incluindo Pantanal (Pereira et al., 2000), Amazônia (Labruna et al., 2005a), Mata Atlântica (Szabó et al., 2009a) e Cerrado (Szabó et al., 2007). Carrapatos adultos desta espécie alimentam-se facilmente em cães de áreas rurais próximas à ambientes naturais (Szabó et al., 2001; Labruna et al., 2005a; Sabatini et al., 2010; Szabó et al., 2010; Szabó et al., 2013a). Além disso, o parasitismo humano por esta espécie é frequente (Labruna et al., 2005a; Guglielmone et al., 2006b; Szabó et al., 2006). Esta espécie de carrapato está fortemente associada à *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica (Sabatini et al., 2010; Medeiros et al., 2011; Szabó et al., 2013

As capivaras são considerados o principal hospedeiro para todas as fases do carrapato *A. dubitatum* (Nava et al., 2010; Perez et al., 2008). O papel deste carrapato como vetor da FM é indeterminado. O que se observa é que *A. dubitatum* está geralmente associado com *R. bellii* (Pacheco et al., 2009), espécie de *Rickettsia* de patogenicidade desconhecida, que não pertence ao GFM. *A. dubitatum* não é tão agressivo como *A. sculptum*, apesar de já ter sido relatado parasitando os seres humanos (Labruna et al., 2007a). Assim, a relação de *A. dubitatum* com *R. rickettsii* merece uma investigação mais aprofundada.

No Brasil, a infecção natural de *R. parkeri* em carrapatos *A. triste* já foi demonstrada através da PCR, no entanto, há poucas ocorrências desta espécie no país; e ainda, não se tem relatos da picada deste carrapato em seres humanos (Silveira et al., 2007).

O *R. sanguineus* (“carrapato-marrom-do-cão”) é o principal carrapato que parasita os cães no Brasil, principalmente em áreas urbanas (Labruna et al., 2001). É encontrado em todas as regiões brasileiras sendo capaz de sobreviver em ambientes fechados. Raramente são relatados parasitando seres humanos, apesar de serem comumente encontrados em ambientes domésticos (Dantas-Torres et al., 2006; Serra-Freire et al., 2011). A participação de *R. sanguineus* na epidemiologia de *R. rickettsii* no Brasil foi evidenciada pela primeira vez em uma área endêmica da região metropolitana de São Paulo (Moraes-Filho et al., 2009). E também em uma região rural do Rio de Janeiro, onde foi relatada, pela primeira vez, a infecção natural por *R. rickettsii* em *R. sanguineus* com registros anteriores de casos humanos

de FMB (Cunha et al., 2009). Estes dois estudos mostram a possível participação dessa espécie de carrapato na transmissão da bactéria a seres humanos no Brasil.

As pulgas *Ctenocephalides* spp. são responsáveis por transmitir a *R. felis*. A infecção de *R. felis* é mantida por transmissão vertical (transovariana) por sucessivas gerações da pulga, sem a necessidade de um reservatório vertebrado, o que justifica a alta incidência dos agentes nesses vetores (Wedincamp & Foil, 2002). Além disso, infecções por *R. typhi* e *R. felis* não são letais para seus vetores naturais, diferentemente do que acontece com outras riquetsias, como por exemplo *R. prowazekii* (Azad et al., 1997) e *R. rickettsii* (Niebylski et al., 1999) para piolhos e carrapatos, respectivamente.

1.3 Epidemiologia dos agentes etiológicos da Febre Maculosa

Dentre as espécies de riquetsia, a *R. rickettsii* é a mais conhecida e a mais patogênica, sobretudo no Brasil. Sua distribuição está restrita às Américas, com registros de casos confirmados no Canadá, Estados Unidos, México, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Brasil e Argentina (Dumler & Walker 2005; Paddock et al., 2008; Labruna et al., 2009). Nos últimos anos, outras espécies de *Rickettsia* têm sido apontadas como causadoras de enfermidades muitas vezes desconhecidas ou emergentes, como *Rickettsia massiliae* na Itália (Vitale et al., 2006), *R. aeschlimannii* em Marrocos (Raoult et al., 2002), *R. parkeri* na Virginia, EUA (Paddock et al., 2004) e a *Rickettsia amblyommii* na Carolina do Norte, EUA (Apperson et al., 2008). Essas doenças têm ocorrido em várias regiões do mundo, manifestando-se de forma branda ou não.

As espécies *R. africae*, *R. conorii* e *R. sibirica* são principalmente do Velho Mundo, no entanto, *R. africae* provavelmente foi introduzida nas Ilhas do Caribe (Índias Ocidentais) (Kelly, 2006; Goddard, 2009). *R. parkeri* é encontrada somente no Novo Mundo nas regiões central e sul dos EUA, bem como, em algumas porções da América do Sul. As manifestações clínicas das quatro espécies de *Rickettsia*, acima citadas, são semelhantes e incluem formação de lesão papular típica (“tache noir”), porém, a doença produzida por *R. conorii* geralmente resulta em quadros clínicos mais severos. No que se refere aos vetores, na África, Ásia e Europa, *R. conorii* e *R. sibirica* têm sua transmissão relacionada principalmente aos carrapatos *Rhipicephalus* spp. e *Dermacentor* spp., respectivamente, enquanto que *R. africae* é transmitida por carrapatos do gênero *Amblyomma*, assim como *R. parkeri* nas

Américas (Goddard, 2003; Sousa et al., 2006; Sousa et al., 2007; Lorusso et al., 2013).

Nas Américas, as espécies causadoras de riquetsioses em humanos são *R. rickettsii*, *R. africae*, *R. felis*, *R. akari*, *R. parkeri* e *Rickettsia sp.* cepa Mata Atlântica. Entretanto, no Brasil, apenas *R. rickettsii*, *R. felis*, e *Rickettsia sp.* cepa Mata Atlântica estão associados a casos humanos, enquanto que *R. parkeri* foi detectada circulando apenas nos vetores. Entretanto, outra espécie de *Rickettsia* do GFM têm sido descrita em carrapatos nas Américas, como por exemplo a *R. amblyommii*, com possível associação a casos de riquetsioses em humanos ou animais (Billeter et al., 2007; Apperson et al., 2008).

R. rickettsii é o principal agente etiológico do GFM, e também a espécie mais patogênica para seres humanos e cães, sendo que pode haver variação quanto à virulência dos genótipos circulantes da bactéria (Labruna et al., 2009; Parola et al., 2009). No Brasil, esta espécie é responsável por causar a doença chamada de FMB. Na Colômbia, Panamá, México e Costa Rica esta mesma doença recebe o nome de “Fiebre Manchada”, e nos Estados Unidos é conhecida como “Rocky Mountain Spotted fever” (Febre maculosa das Montanhas Rochosas-FMMR). Atualmente, é considerada uma zoonose reemergente no Brasil e de grande impacto para a saúde pública, em decorrência da dificuldade de diagnóstico e à alta mortalidade em casos humanos não tratados precocemente (Greca et al., 2008).

R. felis é uma espécie relativamente nova, descrita na década de 90 nos EUA, sendo considerada o agente etiológico da riquetsiose transmitida por pulgas. Desde então, já foi relatada em diferentes países de todos os continentes, indicando uma distribuição cosmopolita. Pulgas infectadas com *R. felis* têm sido relatados na Espanha (Márquez et al., 2002), França (Rolain et al., 2005) em algumas localidades nos Estados Unidos (Boostrom et al., 2002), México (Zavala-Velázquez et al., 2002) e Peru (Pachas et al., 2001). No Brasil, há relatos de pulgas infectadas por *R. felis* no estado de Minas Gerais (Oliveira et al., 2002; Cardoso et al. 2006) e São Paulo (Horta et al., 2005; Horta et al., 2006; Horta et al., 2007). Embora existam dados da detecção da *R. felis*, via Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), em carrapatos (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 desta espécie ao homem por intermédio de carrapatos.

Casos humanos de rickettsioses causada por *R. felis* foram notificados em Portugal, Estados Unidos, França, México, Alemanha, Tailândia e no Brasil (Schriefer et al., 1994; Raoult et al. 2001; Richter et al., 2002; Parola et al., 2003; Horta et al., 2010). Inclusive no Brasil, com evidências sorológicas da presença de anticorpos IgM reativos para *R. felis*, através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em humanos que trabalhavam com colônias de pulgas *Ctenocephalides felis* infectadas por *R. felis* (Horta et al., 2010). Este fato tem grande importância epidemiológica, pois atesta o potencial das pulgas como vetores na transmissão da *R. felis*. Até o momento, não há registro de casos letais causados por esta riquetsia.

R. parkeri foi considerada não patogênica por mais de 60 anos. Entretanto, em 2004 foi comprovado o primeiro caso de riquetsiose em humanos por esta espécie (Paddock et al. 2004). Atualmente a doença causada por esta riquetsia, é reconhecida nos EUA, Uruguai e Argentina (Raoult, 2004; Raoult & Paddock, 2005, Conti-Diaz et al., 2009, Romer et al., 2011). No Brasil, até o momento não existe a comprovação de casos humanos por esta espécie, tendo sido detectada somente em carrapatos (Silveira et al., 2007). Entretanto, *Rickettsia sp.* cepa Mata Atlântica é responsável pela ocorrência dos casos humanos no Brasil, sendo comuns em áreas não degradadas do bioma Mata Atlântica (Spolidorio et al., 2010; Silva et al., 2011; Krawczak et al., 2015). *R. parkeri* e *Rickettsia sp.* cepa Mata Atlântica, espécies circulantes no Brasil, caracterizam-se por causar uma doença de curso não letal, o que tende a dificultar o diagnóstico clínico. Desta forma, pode passar despercebida em locais onde nunca fora relatada. Esta doença tende a diferenciar-se clinicamente da FM causada por *R. rickettsii*, por apresentar linfadenopatia e uma lesão papular típica (“tache noir”) no sítio de fixação do carrapato (Paddock et al., 2004; Silva et al., 2011).

No Brasil, a ocorrência de casos de FM concentra-se em algumas áreas das regiões Sudeste, Sul, Centro Oeste e Nordeste do País. A maior incidência está diretamente relacionada à presença do *A. sculptum*; e em alguns casos, a participação do *A. aureolatum* (Pinter & Labruna, 2006; Labruna et al., 2011; Soares et al., 2011). No entanto, em algumas áreas, o carrapato *A. ovale*, está associado à cepa de riquetsia circulante no bioma de Mata Atlântica (Sabatini et al., 2010; Medeiros et al., 2011). Esta cepa também foi detectada em *A. aureolatum* e *R. sanguineus* neste mesmo bioma (Medeiros et al., 2011).

Até o presente momento, no Brasil, os únicos casos em humanos comprovados da riquetsiose causada pela cepa Mata Atlântica são em São Paulo (Spolidorio et al., 2010), Bahia (Silva et al., 2011) e Santa Catarina (Krawczak et al., 2015). No entanto, nos dois primeiros casos, as análises moleculares indicaram que o agente era intimamente relacionado com *R. parkeri*, *R. africae* e *R. sibirica*, se tornando inconclusivas. Acredita-se que essa nova cepa de riquetsia, esteja amplamente distribuída por toda a Mata Atlântica e a espécie de carrapato envolvida na transmissão possivelmente seja o *A. ovale* (Szabó et al., 2013a), com alguma participação secundária de *A. aureolatum* (Medeiros et al., 2011).

1.4 Justificativa

No Brasil, o cenário epidemiológico da FM causada por *R. rickettsii* já está bem estabelecida, bem como, a caracterização molecular desta bactéria. O mesmo não ocorre para a riquetsiose causada pela *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica por apresentar caráter mais brando, sem letalidade, é bem possível que muitos casos de riquetsiose, estejam ocorrendo em proporções muito maiores do que se é notificado. Nos últimos anos, a circulação desta cepa ao longo do território brasileiro, vem sendo relatada nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste. Entretanto, ainda existem dúvidas sobre a relação filogenética de *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica com três riquetsias do GFM que apresentam manifestações clínicas semelhantes.

Na região Nordeste, o Estado do Ceará registrou casos de uma riquetsiose com caráter mais brando, na região do Maciço de Baturité. Dados preliminares realizados por nosso grupo de pesquisa em potenciais vetores da região indicam que a região parece ser endêmica para riquetsias patogênicas, com existência de vários focos; e a *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica parece estar envolvida no ciclo epidêmico na região. Desta forma, apesar da evidente diversidade da FM no território brasileiro, não há, até o momento, a caracterização das espécies circulantes em alguns focos importantes no país, bem como do entendimento da cinética de crescimento e patogenicidade dessas espécies, conhecimento necessário e fundamental para o controle da FM.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar o isolamento, caracterização molecular, análise filogenética e expressão de genes relacionados à infecção de riquetsias do Grupo Febre Maculosa circulantes no Brasil.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar a análise filogenética da *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica circulante no Brasil;
- Realizar o isolamento e caracterização molecular da *Rickettsia* spp. circulante em foco recente de Febre Maculosa;
- Analisar o comportamento de crescimento de estirpes de *Rickettsia* sp. do Grupo Febre Maculosa em linhagens de células Vero;
- Analisar a expressão de genes relacionados à infecção por riquetsia.

3 CAPÍTULO 1: ANÁLISE FILOGENÉTICA DE *Rickettsia* sp. CEPA MATA ATLÂNTICA CIRCULANTE NO BRASIL

3.1 INTRODUÇÃO

A primeira descrição da *Rickettsia parkeri*, detectada no carrapato *Amblyomma maculatum*, ocorreu em 1937 nos Estados Unidos da América (EUA) por Parker et al. (1939). Durante muito tempo esta bactéria foi considerada de patogenicidade desconhecida para humanos, entretanto, no ano de 2004 foi feito o primeiro relato de um caso de riquetsiose causada por esta espécie (Paddock et al., 2004). Desde esta data, já foram relatados diversos outros casos e esta espécie foi descrita em diferentes países do continente americano (Raoult, 2004; Raoult & Paddock, 2005, Conti-Diaz et al., 2009, Romer et al., 2011).

Interessantemente, durante os anos 1990 a 1994, dezenas de casos de riquetsioses causadas por bactérias do Grupo Febre Maculosa (GFM) foram relatados no Uruguai. Estes pacientes apresentavam um quadro clínico menos severo do que o apresentado por pessoas infectadas por *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da Febre Maculosa Brasileira ou Rocky Mountain Spotted Fever (EUA). Os sintomas encontrados eram febre, linfadenopatia e uma lesão no local onde ocorreu a fixação do carrapato, sinal raramente observado em casos de infecção por *R. rickettsii*. Trabalhos de investigação sobre estes casos detectaram na área de ocorrência a espécie patogênica *R. parkeri* em carrapatos da espécie *Amblyomma triste* (Pacheco et al., 2006). Este carrapato é frequentemente encontrado parasitando humanos nesta região (Silveira et al., 2007).

A espécie de carrapato *A. triste* é encontrada em outros 12 países da América Latina, incluindo o Brasil. De fato, Silveira et al., (2007) descreveram carrapatos desta espécie, coletados no estado de São Paulo infectados com a espécie *R. parkeri*. Este mesmo trabalho conseguiu isolar em culturas de células Vero, linhagem de células eucariotas, a cepa de nome *R. parkeri* strain At#24. Ao contrário do Uruguai, no Brasil não há relatos de carrapatos da espécie *A. triste* parasitando humanos.

Em conjunto com os três países já citados, outros países do continente Americano, como por exemplo, Argentina e a Bolívia identificaram a circulação de *R. parkeri* (Tomassone et al., 2010, Romer et al., 2011). Nestes países o carrapato da espécie *Amblyomma tigrinum* é apontado como vetor, entretanto na Argentina,

além desta espécie de carrapato, o *A. triste* também é considerado vetor desta bactéria (Nava et al., 2008; Tomassone et al., 2010; Romer et al., 2014).

Apesar da ausência de relatos do carrapato *A. triste* parasitando humanos no Brasil, um caso de riquetsiose com sintomas semelhantes aos observados pela doença causada por *R. parkeri* foi descrito em São Paulo, mesmo estado onde esta espécie de *Rickettsia* foi identificada. Em 2009, um homem que caminhava por seu sítio, localizado em uma área de mata atlântica, foi picado por um carrapato. Alguns dias depois os primeiros sintomas surgiram e dentre eles destacavam-se febre, dores no corpo, rash cutâneo e uma lesão no local onde ocorreu a picada. Análises imunológicas realizadas com o sangue do paciente identificaram anticorpos contra *Rickettsias* do GFM e análises moleculares realizadas com amostras obtidas a partir de biópsias da pele no local da fixação, detectaram material genético de uma bactéria similar às espécies *Rickettsia sibirica*, *Rickettsia africae* e *R. parkeri*. Esta bactéria foi chamada *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica (*Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest) (Spolidorio et al., 2010).

Assim como no primeiro caso, uma área de mata atlântica foi o local onde ocorreu o segundo relato de doença com sintomas que se assemelhavam aos da doença causada por *R. parkeri*. Um homem foi picado por um carrapato no Parque Nacional da Chapada Diamantina no estado da Bahia e análises moleculares identificaram uma *Rickettsia*, chamada *Rickettsia* sp. Bahia, que apresentava 100% de identidade com *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica, sendo então considerada a mesma cepa detectada em São Paulo (Silva et al., 2011).

O terceiro caso aconteceu Blumenau, Santa Catarina, um paciente do sexo feminino que apresentou sinais clínicos compatíveis com FM 10 dias após ter sido picada por carrapato. As análises moleculares baseadas no gene *ompA* demonstraram 100% de identidade com *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica (Genbank KJ855085) (Krawczak et al., 2015). Portanto, a mesma cepa detectada em São Paulo e na Bahia.

Um trabalho realizado na região do estado de São Paulo onde o primeiro caso de riquetsiose causado por *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica foi relatado, demonstrou uma maior prevalência desta cepa infectando o carrapato *Amblyomma ovale* (Szabó et al., 2013a). Até o momento, a detecção desta *Rickettsia* ocorreu em cinco diferentes países, sendo Brasil, Belize e Colômbia, locais onde o carrapato identificado era da espécie *A. ovale* (Londoño et al. 2014; Lopes et al. 2016). Na Argentina esta bactéria foi identificada no carrapato *A. dubitatum* (Monje et al., 2015)

e nos Estados Unidos foi identificada em um carrapato coletado em uma ave migratória no estado do Texas (Cohen et al., 2015). No Brasil, a *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica foi encontrada infectando o *A. ovale* nos estados de São Paulo (Szabó et al., 2013a), Mato Grosso (Witter et al., 2016), Santa Catarina (Barbieri et al., 2014), Ceará (Moerbeck et al., 2016) e Rio Grande do Sul (Vizzoni et al., 2016) sendo as duas últimas identificações realizadas por nosso grupo de pesquisa.

O carrapato *A. ovale* possui uma ampla distribuição, com populações sendo encontradas desde a América do Norte até América do Sul (Gugliemone et al., 2003). Em adição, Krawczak et al. (2016) confirmaram experimentalmente a competência desta espécie de carrapato como transmissora de *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica, assim como sua atuação como reservatório, o que demonstra o potencial envolvimento desta espécie de carrapato no ciclo enzoótico e epidêmico desta bactéria.

Apesar do aumento das identificações desta bactéria nos diferentes estados brasileiros e em outros países desde o seu primeiro relato, ainda existem dúvidas sobre a relação filogenética de *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica com a *R. parkeri*, *R. sibirica* ou *R. africae*.

A hibridização DNA-DNA é uma das técnicas utilizadas para descrição de espécies bacterianas, sendo estipulado um limite mínimo de 70% de homologia para que duas cepas sejam consideradas a mesma espécie. Entretanto quando utilizada para diferenciar cepas de bactérias do gênero *Rickettsia*, essa técnica leva a resultados como o agrupamento das espécies *R. rickettsii*, *Rickettsia conorii*, *R. sibirica* e *Rickettsia montanensis*, como sendo bactérias pertencentes a uma única espécie. Devido a isso, um dos métodos mais utilizados para diferenciação de espécies neste gênero bacteriano foi durante muito tempo a sorotipagem em camundongos (Philip et al., 1978). Este método detecta epítomos específicos com alto peso molecular presentes em proteínas de membrana como OmpA, OmpB e 120KDa (*geneD* ou *sca4*), porém não é altamente reprodutível, além de ser muito trabalhoso, uma vez que, cada novo isolado deve ser comparado a todas as espécies previamente descritas. Tendo em vista estas dificuldades no que se refere à diferenciação de espécies no gênero *Rickettsia*, Fournier et al. (2003) desenvolveram um método taxonômico baseado na análise da sequência de 5 genes bacterianos comuns a quase todas as espécies de *Rickettsia*. Os genes escolhidos foram o 16S rRNA, amplamente utilizado na taxonomia bacteriana no geral, o gene *gltA* que codifica uma proteína com função de citrato sintase, e os

genes *ompA*, *ompB* e *geneD* (*sca4*) (Proteína 120KDa) que codificam proteínas de membrana. O gene *ompA* é um gene grupo específico, sendo encontrado em *Rickettsias* que compõem o Grupo Febre Maculosa (GFM).

Esta metodologia foi desenvolvida a partir da análise da distância par-a-par das sequências referentes a esses cinco genes individualmente, sequenciados de 20 espécies de *Rickettsia* validadas. O alinhamento das sequências estudadas é a primeira etapa do processo e é realizado para exibir a correspondência de homologia existente entre os nucleotídeos ou aminoácidos entre as sequências analisadas. A distância par-a-par mede a distância evolutiva entre dois pares de sequências calculando a proporção de nucleotídeos diferentes entre estas duas sequências e dividindo pelo tamanho do alinhamento observado entre essas mesmas duas sequências. Ao final das análises realizadas, os autores concluíram que para um novo isolado ser considerado uma nova espécie de *Rickettsia*, ele não pode ter mais do que um dos valores de identidade maiores do que os limites estabelecidos para os 5 genes estudados, quando comparado com qualquer espécie de *Rickettsia* reconhecida. Os autores afirmam também, que o critério não deve ser utilizado para a descrição oficial de uma nova espécie, sem que um isolado tenha sido estabelecido.

Uma vez que há dúvidas sobre a real relação filogenética entre três espécies (*R. parkeri*, *Rickettsia sibirica* e *Rickettsia africae*) e a *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica, o presente trabalho deu início ao processo de comparação entre sequências de nucleotídeos aplicando a metodologia taxonômica desenvolvida por Fournier et al. (2003).

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Amostras

As análises foram realizadas com amostra proveniente de carrapato naturalmente infectado por *Rickettsia* spp. e com amostra proveniente de cultivo celular infectado por *Rickettsia* spp. (Barbieri et al., 2014).

Em novembro de 2013, durante a investigação de caso de FM no Rio Grande do Sul-RS. Um carrapato foi encontrado fixado a um homem residente na área rural do município de Lindolfo Collor, RS. Este episódio de parasitismo ocorreu simultaneamente, no espaço e no tempo, a dois casos confirmados de FM de acordo

com dados oficiais da Doença de Vigilância Sistema Nacional de Dados (SINAM - 2016). O espécime foi identificado como uma fêmea *A. ovale* e posteriormente, encaminhado ao Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses-LIRN, IOC/Fiocruz para análises moleculares.

A outra amostra utilizada nas análises filogenéticas é *Rickettsia* sp. aa46 obtida a partir do isolamento em células Vero (Barbieri et al., 2014), proveniente do carrapato *Amblyomma aureolatum* coletado no município de Blumenau, Santa Catarina.

3.2.2 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

O carrapato foi submetido à extração de DNA genômico (DNAg) através da técnica de extração por sal (Aljanabi; Martinez, 1997). O DNAg do isolado aa46 (Barbieri et al., 2014) foi cedido pelo Prof. Labruna (Lab. de Doenças Parasitárias - USP) para realização das análises. Alíquotas de DNAg foram submetidos às reações de PCR utilizando oligonucleotídeos que amplificam fragmentos gênicos para os genes *gltA*, *ompA*, *ompB* e *geneD* (*sca4*), como mostra na tabela 1.1.

As reações de PCR incluíam: 10-100ng de solução de DNA (em 1µL), 20,0µL de água milliQ, 2,5µL de tampão 10X sem MgCl₂, 0,8µL de MgCl₂ 50mM, 0,2µL de uma mistura com 2,5mM de cada dNTP, 0,2µL de cada iniciador a 50µM e 0,1µL de *Taq* DNA-polimerase Platinum® (Invitrogen) a 5U/µL, totalizando 25µL. Empregou-se a ciclagem de: 94°C/ 3 min, 40X [94°C/ 30seg, 55 °C / 30seg, 72°C (1min/Kb)], 72°C/ 7 min, 12°C / tempo indefinido. Utilizou-se como controle positivo DNA de *R. rickettsii* cepa taiaçu e água DNase/ RNase free como controle negativo.

3.2.3 Visualização dos produtos amplificados

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% (100ml TAE 1X; 1g agarose UltraPure™ Agarose Invitrogen™) e tampão TAE 1X (tampão Tris-Acetato-EDTA, pH 8,0) a 100V durante 40 minutos. Utilizou-se marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Ludwig Biotec). Posteriormente, os géis foram corados em solução de brometo de etídio por 15 minutos, observados sob luz UV (ultravioleta) (286nm) e em seguida fotografados.

Tabela 1.1: Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR e sequenciamento

Gene	Designação do iniciador	Sequência Nucleotídica (5' – 3')	Fragmento amplificado (pb)	Referência
<i>gltA</i>	CS-78	GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT	401	Labruna et al. (2004b)
	CS-323	GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT		
<i>gltA</i>	CS-239	GCTCTTCTCATCCTATGGCTATTAT	821	Labruna et al. (2004b)
	CS-1069	CAGGGTCTTCGTGCATTTCTT		
<i>ompA</i>	Rr190.70p Rr190.602n	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA AGTGCAGCATTTCGCTCCCCCT	512	Regnery et al. (1991)
<i>ompB</i>	120-M59 120-807	CCGCAGGGTTGGTAACTGC CCTTTTAGATTACCGCCTAA	862	Roux & Raoult (2000)
<i>ompB</i>	ompB3064 ompB4271	GGTATAGCCGGAATAGGTTTTGACG TCAGTTTTAGTGATACCGATAGCAGC	1208	Nunes et al. (2015)
<i>geneD</i> (<i>sca4</i>)	D1738f D3069r	GTATCTGAATTAAGCAATGCG TCAGCGTTGTGGAGGGGAAG	1331	Sekeyova et al. (2001)

3.2.4 Purificação e sequenciamento de DNA

As amostras que amplificaram no tamanho esperado, foram submetidas a purificação de DNA utilizando o HiYield™ Gel/PCR DNA Mini Kit (Real Genomics™), seguindo-se as orientações do fabricante. Após a purificação o DNA era eluído em 30-50µL da solução de eluição fornecida pelo kit e alíquotas de 3-5µL eram usadas para avaliação da qualidade da purificação em eletroforeses em géis de agarose.

As reações de sequenciamento foram montadas com produtos de reações de PCR purificados. Para o sequenciamento de um produto de PCR contendo fragmentos com tamanhos na faixa entre 500pb e 1000pb é recomendado o uso de 5-20ng de DNA por reação de sequenciamento. As reações de sequenciamento foram montadas com BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1, totalizaram 10µL e continham: 1µL de Ready Reaction Kit (BigDye), 1,5µL de BigDye Sequencing Buffer (5X), 1µL de iniciador (senso ou antissenso) na concentração 3,2pmol e volume da amostra contendo o DNA a ser sequenciado, de acordo com a quantificação do mesmo, e água DNase/ RNase free para completar 10µL. Empregou-se a ciclagem: 40X [94°C por 10seg, 50 °C por 5seg, 60°C por 4 minutos] 12°C / tempo indefinido.

O processo de precipitação e a reação de sequenciamento foram realizados pela Plataforma Genômica - Sequenciamento de DNA - RPT01A- PDTIS/FIOCRUZ. Os amplicons foram sequenciados em ambas as direções utilizando os mesmos

iniciadores aplicados na reação de PCR, em um sequenciador automático ABI 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) de acordo com o protocolo previamente descrito por Otto et al. (2008).

3.2.5 Edição de sequências e análises filogenéticas

As sequências obtidas no presente trabalho foram analisadas e editadas utilizando-se o programa SeqMan, parte do pacote de programas para Windows Lasergene (DNASTAR, Madison, WI). O alinhamento das sequências de nucleotídeos foi realizado utilizando-se o ClustalW no programa MEGA 5.2 – (Tamura et al., 2011) seguido de reconstituições por “Neighbor Joining” utilizando-se um “*bootstrap*” de 1000 réplicas e o modelo evolutivo Kimura-2p (Kimura, 1980). A avaliação da distância par-a-par entre as sequências alinhadas foi realizada com o MEGA 5.2, sem o uso de modelos evolutivos para correção. Os resultados obtidos foram transformados em valores de porcentagem e subtraídos de 100% para que os valores resultantes pudessem ser comparados com os valores de corte da técnica taxonômica aplicada. Estes limites são 99,8% para o 16S rRNA, 99,9% para o gene *gltA*, 98,8% para o gene *ompA*, 99,2% para o gene *ompB* e 99,3% para o gene *geneD*.

3.3 RESULTADOS

Na metodologia taxonômica proposta por Fournier et al. (2003), no seu desenvolvimento inicial, utilizou como tamanho mínimo para o alinhamento, as sequências dos genes de *R. rickettsii* disponíveis no GenBank sob os números de acesso L36217 para 16S rRNA, U59729 para *gltA*, U43804 para *ompA*, X16353 para *ompB* e AF163000 para *geneD*. Destas sequências foram considerados os nucleotídeos entre as posições 17 a 1424, 87 a 1134, 1 a 590, 296 a 5141 e 33 a 2979 respectivamente. Após a retirada das regiões onde as sequências apresentavam deleções ou inserções (gaps) os tamanhos finais analisados apresentavam os seguintes valores de pares de bases: 1400pb, 1047pb, 565pb, 4682pb e 2725pb para os genes 16S rRNA, *gltA*, *ompA*, *ompB* e *geneD* respectivamente.

O presente trabalho fez uso desta mesma metodologia para comparar as sequências disponíveis para as riquetsias *R. parkeri*, *R. sibirica*, *R. africae* e *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica. Para a amostra proveniente do carrapato

(LIC4317) infectado com *Rickettsia* spp. foram comparados 1048pb para *gltA*, 476pb para *ompA*, 1701pb para *ompB* e 1057pb para *geneD*. Para a amostra referente ao isolado (aa46), comparou-se 1047pb para *gltA* e 575pb para *ompA*. As análises para os 16S rRNA *ompB* e *geneD* para esta amostra estão em andamento.

As espécies *R. parkeri*, *R. sibirica* e *R. africae* apresentam genomas sequenciados e disponíveis no GenBank (CP003341, LAOL000000000.1, LAOK000000000.1, LAOO000000000.1, CP001612, NZ_AABW000000000.1, NZ_AHIZ000000000.1, NZ_AHZB000000000.1) e foram utilizados nas análises filogenéticas. Os genes analisados para a amostra LIC4317 foram o *gltA* e parcialmente os genes *ompA*, *ompB* e *geneD*. Nas análises com a amostra aa46 foram utilizadas as suas sequências disponíveis no Genbank para os genes *gltA* (KJ855083) e *ompA* (KJ855085). Para os genes *gltA*, *ompA*, *ompB* e *geneD*, foram realizadas análises filogenéticas e cálculos de distância par-a-par utilizando as mesmas sequências e alinhamento aplicados na construção da árvore filogenética.

O primeiro gene analisado foi o *gltA*, a sequência concatenada foi obtida com iniciadores CS-78/ CS-323 e CS-239/ CS-1069. A figura 1.1 representa a árvore obtida, enquanto que a tabela 1.2 apresenta os valores das distâncias par-a-par em porcentagem entre as *Rickettsia* sp. analisadas. A análise mostra que a distância entre a *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica LIC4317 e a *R. sibirica* é zero, enquanto que entre *R. parkeri* e *R. africae* são 0,1 e 0,3, respectivamente. A mesma distância foi observada com a *Rickettsia* sp. aa46. A sequência obtida para *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica LIC4317 para este gene foi depositada no genBank com número de acesso KT153031.

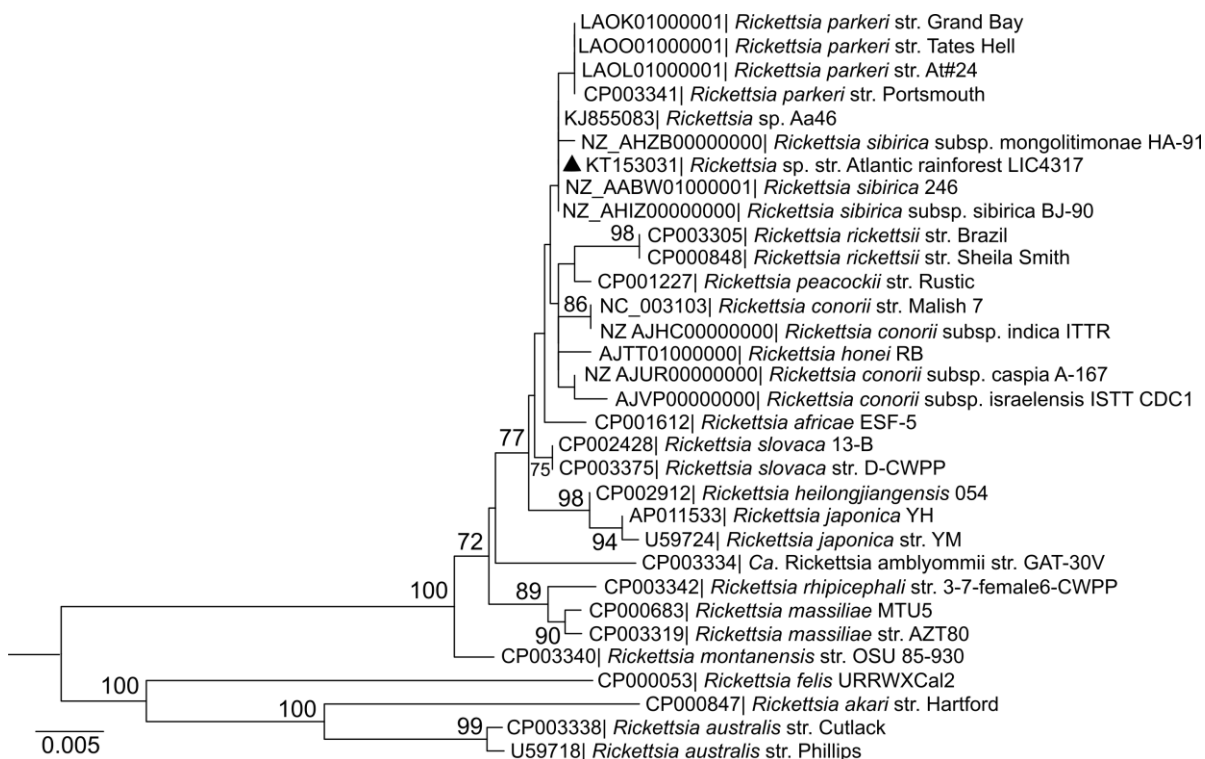


Figura 1.1: Análise filogenética desenvolvida com a sequência nucleotídica do gene *gltA*. A árvore é resultante de uma reconstrução utilizando o método Neighbor-joining com o modelo evolutivo Kimura-2p. Os números apresentados dos nós dos ramos são os valores de bootstrap obtidos a partir da análise de 1000 réplicas. Valores inferiores a 70% foram excluídos. Os números de acesso no GenBank das sequências utilizadas estão representados no início dos nomes. A sequência identificada por um triângulo pertence à *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica (*Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest).

Tabela 1.2: Identidade entre as sequências do gene *gltA* em % - Valor máximo para ser uma nova espécie=99,9%

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 KJ855083 <i>Rickettsia</i> sp. Aa46										
2 KT153031 <i>Rickettsia</i> sp. str. Atlantic rainforest LIC4317	100,0%									
3 CP003341 <i>Rickettsia parkeri</i> str. Portsmouth	99,9%	99,9%								
4 LAOL01000001 <i>Rickettsia parkeri</i> str. AT*24	99,9%	99,9%	100,0%							
5 LAOK01000001 <i>Rickettsia parkeri</i> str. Grand Bay	99,9%	99,9%	100,0%	100,0%						
6 LAOO01000001 <i>Rickettsia parkeri</i> str. Tates Hell	99,9%	99,9%	100,0%	100,0%	100,0%					
7 CP001612 <i>Rickettsia africana</i> ESF-5	99,7%	99,7%	99,6%	99,6%	99,6%	99,6%				
8 AABW01000001 <i>Rickettsia sibirica</i> 246	100,0%	100,0%	99,9%	99,9%	99,9%	99,9%	99,7%			
9 AHIZ01000008 <i>Rickettsia sibirica</i> subsp. sibirica BJ-90	100,0%	100,0%	99,9%	99,9%	99,9%	99,9%	99,7%	100,0%		
10 NZ AHZB01000021 <i>Rickettsia sibirica</i> subsp. mongolitimonae H	99,9%	99,9%	99,8%	99,8%	99,8%	99,8%	99,6%	99,9%	99,9%	

Os valores apresentados na primeira coluna são a comparação da *Rickettsia* sp.aa46 com as três espécies. Os valores da segunda coluna são a comparação da *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica LIC4317 com as demais espécies. Os valores em cinza são os valores que ultrapassam o limite que caracteriza espécies diferentes.

A segunda análise foi feita com o gene *ompA*. A sequência obtida através da amostra LIC4317 foi analisada com um fragmento com 89pb a menos do que o utilizado na metodologia usada por Fournier *et al.* (2003), em virtude do fragmento para a *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica LIC4733 ser menor do que a referência. Em comparação com a sequência *R. rickettsii* (GenBank U43804) foram utilizados os nucleotídeos do intervalo de 1 a 491. Na análise realizada com a sequência da

amostra aa46 utilizou um fragmento com 10pb a mais do que a metodologia (Fournier et al. 2003). A figura 1.2 apresenta a árvore filogenética obtida e a tabela 1.3 apresenta as distâncias par-a-par. A árvore apresenta uma topologia onde a *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica e *Rickettsia* sp. aa46 estão posicionadas filogeneticamente mais próximas da *R. sibirica* do que da *R. parkeri*. A sequência obtida para este gene foi depositada no genBank com número de acesso KX034217.

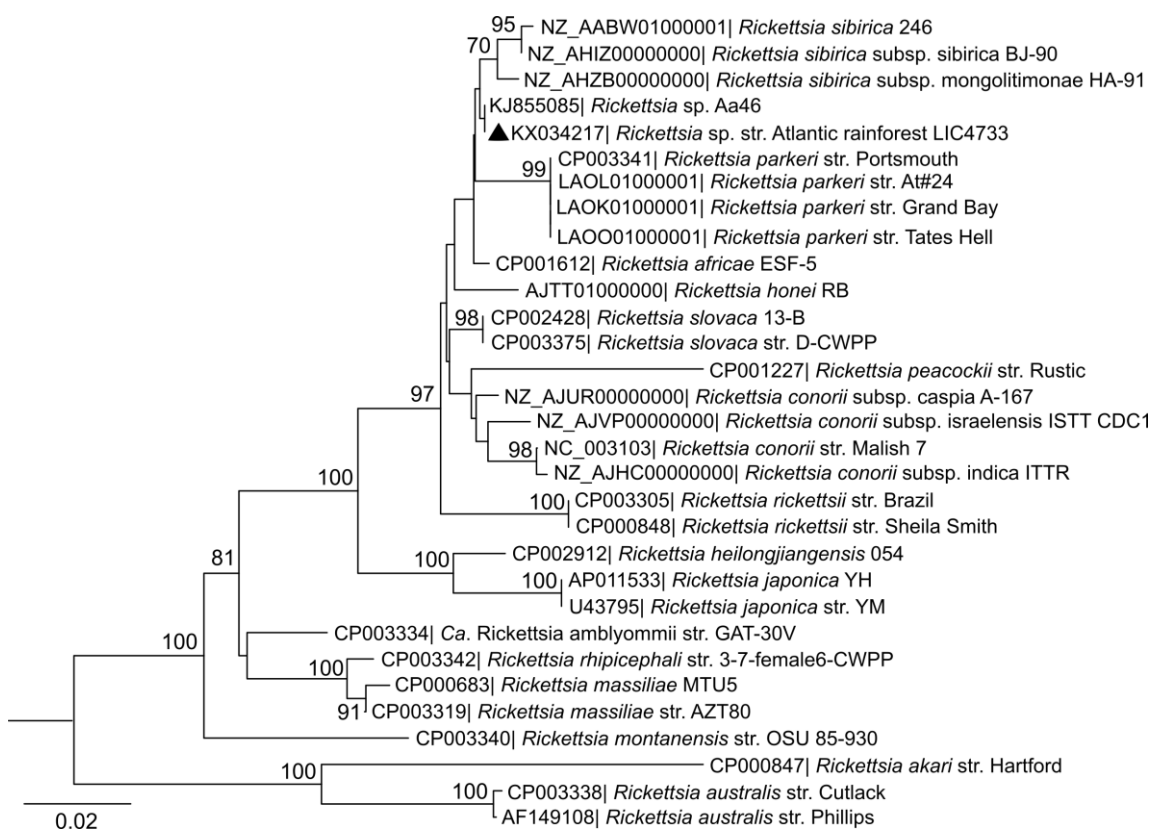


Figura 1.2: Análise filogenética desenvolvida com a sequência nucleotídica do gene *ompA*. A árvore é resultante de uma reconstrução utilizando o método Neighbor-joining com o modelo evolutivo Kimura-2p. Os números apresentados nos nós dos ramos são os valores de bootstrap obtidos a partir da análise de 1000 replicatas. Valores inferiores a 70% foram excluídos. Os números de acesso no GenBank das sequências utilizadas estão representados no início dos nomes. A sequência identificada por um triângulo pertence à *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica (*Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest).

Tabela 1.3: Identidade entre as sequências do gene *ompA* em % - Valor máximo para ser uma nova espécie=98,8%

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	KJ855085 <i>Rickettsia</i> sp. Aa46									
2	KX034217 <i>Rickettsia</i> sp. isolate LIC4317	100,0%								
3	CP003341 <i>Rickettsia parkeri</i> str. Portsmouth	98,3%	98,3%							
4	LAOL01000001 <i>Rickettsia parkeri</i> str. AT*24	98,3%	98,3%	100,0%						
5	LAOK01000001 <i>Rickettsia parkeri</i> str. Grand Bay	98,3%	98,3%	100,0%	100,0%					
6	LAOO01000001 <i>Rickettsia parkeri</i> str. Bates Hell	98,3%	98,3%	100,0%	100,0%	100,0%				
7	CP001612 <i>Rickettsia africana</i> ESF-5	99,6%	99,6%	98,3%	98,3%	98,3%	98,3%			
8	NZ_AABW01000001 <i>Rickettsia sibirica</i> 246	98,9%	98,9%	97,5%	97,5%	97,5%	97,5%	98,5%		
9	NZ_AHIZ01000007 <i>Rickettsia sibirica</i> subsp. <i>sibirica</i> BJ-90	99,2%	99,2%	97,7%	97,7%	97,7%	97,7%	98,7%	99,8%	
10	NZ_AHZZ01000020 <i>Rickettsia sibirica</i> subsp. <i>mongolitonae</i> HA	99,2%	99,2%	98,1%	98,1%	98,1%	98,1%	98,7%	98,9%	99,2%

Os valores apresentados na primeira coluna são a comparação da *Rickettsia* sp.aa46 com as três espécies. Os valores da segunda coluna são a comparação da *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica LIC4317 com as demais espécies. Os valores em cinza são os valores que ultrapassam o limite que caracteriza espécies diferentes.

A figura 1.3 apresenta a árvore filogenética resultando da análise das sequências do gene *ompB* para *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica LIC4733. Foram analisadas duas partes do gene, em uma única sequência concatenada. Em comparação com a sequência *R. rickettsii* (GenBank X16353) foram utilizados os nucleotídeos dos intervalos de 296 a 1049 e 3371 a 4360. A primeira parte da sequência concatenada (296 a 1049) é a de número de registro KX034218 no GenBank. A segunda parte da sequência concatenada (3371 a 4360) está em vias de submissão e ainda não possui número de acesso. A tabela 1.4 apresenta os valores de distância par-a-par obtidos.

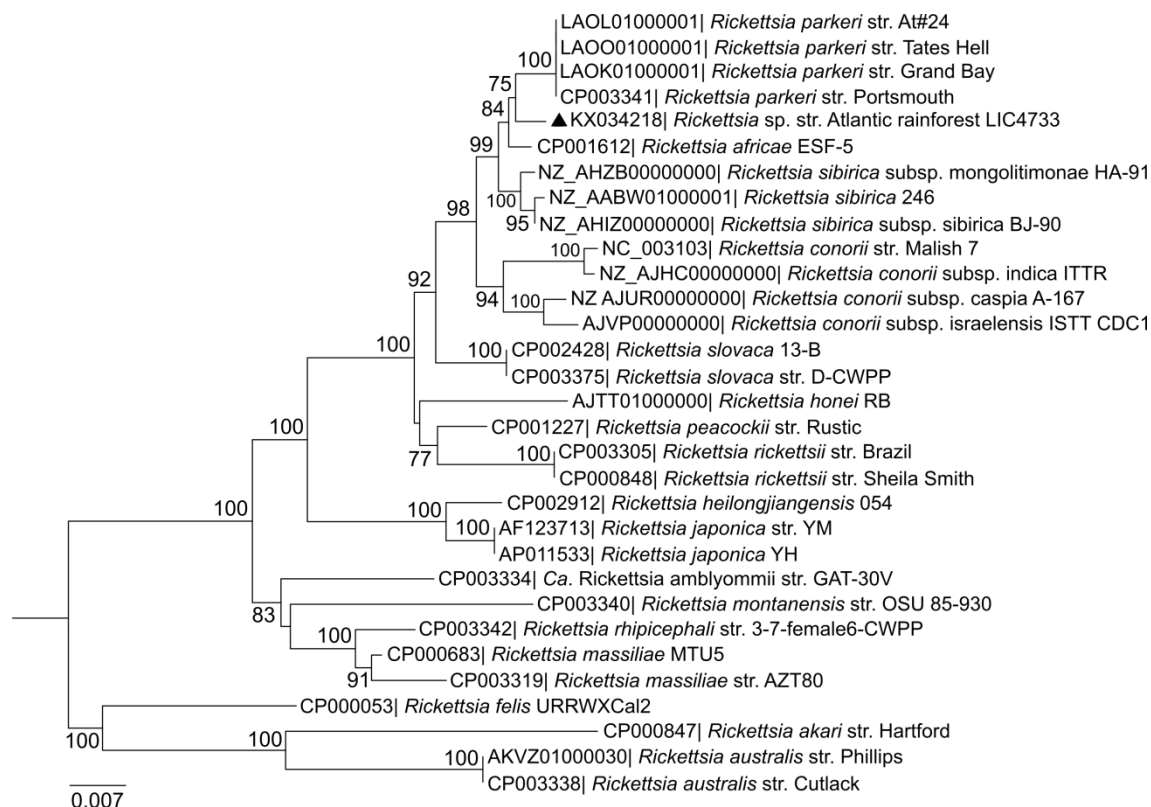


Figura 1.3: Análise filogenética desenvolvida com a sequência nucleotídica do gene *ompB*. A árvore é resultante de uma reconstrução utilizando o método Neighbor-joining com o modelo evolutivo Kimura-2p. Os números apresentados nos nós dos ramos são os valores de bootstrap obtidos a partir da análise de 1000 replicatas. Valores inferiores a 70% foram excluídos. Os números de acesso no GenBank das sequências utilizadas estão representados no início dos nomes. A sequência identificada por um triângulo pertence à *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica (*Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest).

Tabela 1.4: Identidade entre as sequências do gene *ompB* em % - Valor máximo para ser uma nova espécie=99,2%

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 Rickettsia_sp_isolate_LIC4733									
2 CP003341 Rickettsia parkeri str. Portsmouth	99.1%								
3 LAOL01000001 Rickettsia parkeri str. At#24	99.1%	100.0%							
4 LAOK01000001 Rickettsia parkeri str. Grand Bay	99.1%	100.0%	100.0%						
5 LAOO01000001 Rickettsia parkeri str. Tates Hell	99.1%	100.0%	100.0%	100.0%					
6 CP001612 Rickettsia africae ESF-5	99.3%	99.1%	99.1%	99.1%	99.1%				
7 NZ AABW01000001 Rickettsia sibirica 246	98.8%	98.7%	98.7%	98.7%	98.7%	99.1%			
8 NZ AHIZ00000000 Rickettsia sibirica subsp. sibirica BJ-90	98.9%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	99.2%	99.9%		
9 NZ AHZB00000000 Rickettsia sibirica subsp. mongolitimonae HA-91	98.9%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	99.2%	99.5%	99.6%	

Os valores apresentados na primeira coluna são a comparação de *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica e as três espécies. Os valores em cinza são os valores que ultrapassam o limite que caracteriza espécies diferentes.

A última análise foi realizada com as sequências do gene *D* (*sca4*) para *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica LIC4733. A figura 1.4 apresenta a árvore filogenética resultante desta análise. Em comparação com a sequência *R. rickettsii* (GenBank AF163000) foram utilizados os nucleotídeos do intervalo 1822 a 2928. Na tabela 1.5 podemos observar os valores de distância par-a-par obtidos. A sequência obtida para este gene foi depositada no genBank com número de acesso KX034216.

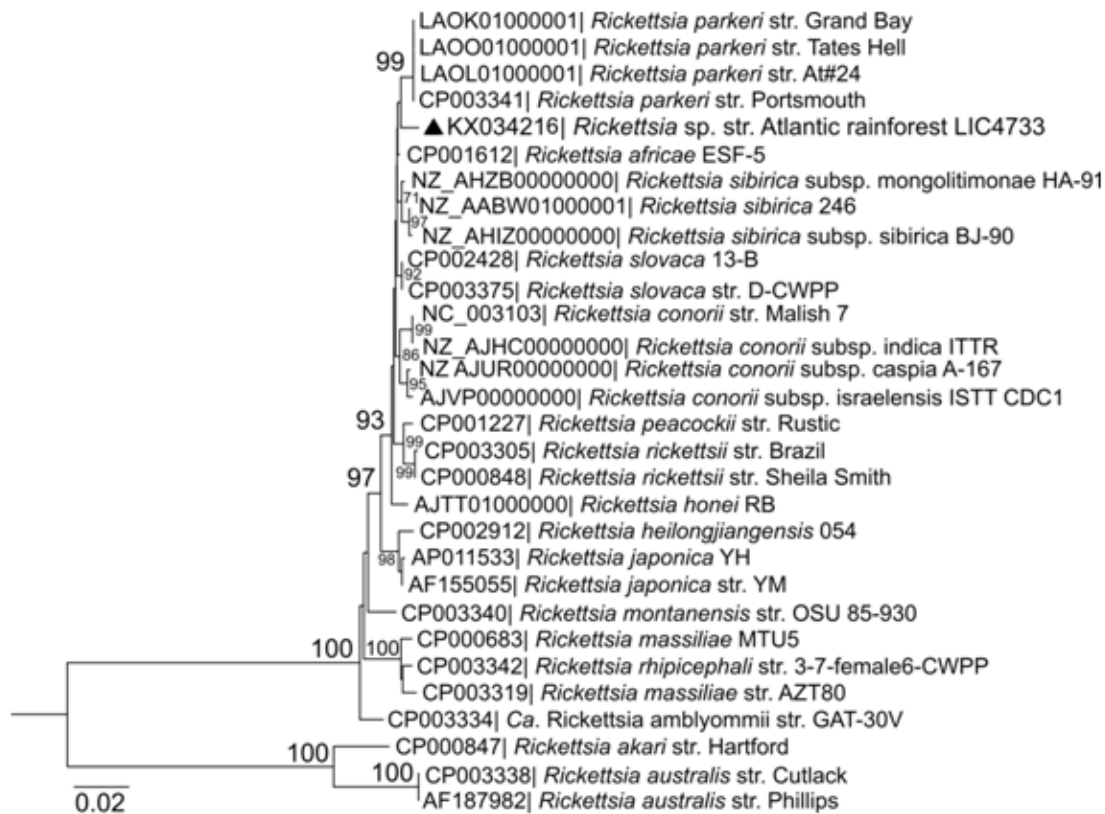


Figura 1.4: Análise filogenética desenvolvida com a sequência nucleotídica do *geneD*. A árvore é resultante de uma reconstrução utilizando o método Neighbor-joining com o modelo evolutivo Kimura-2p. Os números apresentados nos nós dos ramos são os valores de bootstrap obtidos a partir da análise de 1000 replicatas. Valores inferiores a 70% foram excluídos. Os números de acesso no GenBank das sequências utilizadas estão representados no início dos nomes. A sequência identificada por um triângulo pertence à *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica (*Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest).

Tabela 1.5: Identidade entre as sequências do *geneD* em % - Valor máximo para ser uma nova espécie=99,3%

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 Rickettsia_sp_isolate_LIC4733									
2 CP003341 <i>Rickettsia parkeri</i> str. Portsmouth	98.9%								
3 LAOL01000001 <i>Rickettsia parkeri</i> str. At#24	98.9%	100.0%							
4 LAOK01000001 <i>Rickettsia parkeri</i> str. Grand Bay	98.9%	100.0%	100.0%						
5 LAOO01000001 <i>Rickettsia parkeri</i> str. Tates Hell	98.9%	100.0%	100.0%	100.0%					
6 CP001612 <i>Rickettsia africana</i> ESF-5	99.1%	99.4%	99.4%	99.4%	99.4%				
7 NZ_AABW01000001 <i>Rickettsia sibirica</i> 246	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	99.4%			
8 NZ_AHIZ00000000 <i>Rickettsia sibirica</i> subsp. <i>sibirica</i> BJ-90	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	99.4%	99.9%		
9 NZ_AHQB00000000 <i>Rickettsia sibirica</i> subsp. <i>mongolitimona</i> HA-91	99.1%	99.1%	99.1%	99.1%	99.1%	99.6%	99.6%	99.5%	

Os valores apresentados na primeira coluna são a comparação de *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica e as três espécies. Os valores em cinza são os valores que ultrapassam o limite que caracteriza espécies diferentes.

3.4 DISCUSSÃO

O presente trabalho visa contribuir com a caracterização filogenética da *Rickettsia* denominada *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica. Diferentes estudos citam que esta bactéria é filogeneticamente próxima à *R. parkeri*, *R. sibirica*, *R. africae*. De fato, a proximidade entre estas três espécies é reconhecida e já foi discutida por outros trabalhos (Goddard, 2009, Spolidorio et al., 2010, Szabó et al., 2013a). Um fato relevante é que *R. sibirica* e *R. africae* não foram descritas no Brasil, apesar desta última ter sido introduzida no Caribe (Kelly, 2006; Goddard, 2009).

Com esse intuito, demos início a aplicação da metodologia taxonômica desenvolvida por Fournier et al., 2003, que se baseia na comparação da distância par-a-par de cinco genes. Os genes escolhidos são os que apresentam o maior número de sequências disponíveis no GenBank para diferentes espécies e cepas. Apesar de diversos genomas completos de *Rickettsia* estarem disponíveis, o que permite técnicas mais robustas de análise, o mesmo não ocorre para *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica, cujo genoma completo ainda não está disponível e por isso, a aplicação desta metodologia é a estratégia mais viável no momento.

Em adição, a metodologia deve ser utilizada para descrição de novas espécies, somente se a bactéria estiver isolada em cultura de células. Desta forma, é necessária a realização de análises com material isolado em cultura de células. As análises realizadas neste trabalho foram obtidas a partir da análise das sequências de *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica obtidas em amostras de carrapato e *Rickettsia* spp. isolada em cultivo celular. Nas tabelas 1.2 e 1.3, observamos que *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica e *Rickettsia* sp. aa46 pertencem a mesma espécie, visto que a distância entre elas é zero.

A região genômica que codifica o 16S rRNA é parte integrante da análise, entretanto a utilização de amostras onde o DNA genômico da bactéria é obtido a partir de uma extração de DNA que utiliza o carrapato por inteiro, inviabiliza a obtenção desta sequência específica, uma vez que os iniciadores disponíveis são considerados universais e amplificam a região referente ao 16S rRNA de todos os DNAs genômicos bacterianos presentes na extração. Este grande número de possíveis sequências disponíveis tornam a obtenção do 16S rRNA de *Rickettsia*, com o tamanho desejado, um processo trabalhoso e que depende de outras técnicas, como clonagem, do que somente de um único PCR com iniciador específico. A utilização da amostra obtida através do isolamento da bactéria

desejada em cultura de células eucariotas, torna o processo de obtenção da sequência 16S rRNA muito mais simplificada, uma vez que, somente uma bactéria estará presente no sistema. Por esse motivo, a amostra de *Rickettsia* sp. proveniente do carrapato (LIC4317) utilizada neste estudo, não foi submetida a amplificação para o gene 16S rRNA. Entretanto, as sequências obtidas para o gene 16S rRNA para isolado de *Rickettsia* sp. aa46 estão sendo analisadas.

A árvore filogenética resultante da análise para o gene *gltA* mostra que *R. parkeri*, *R. sibirica*, *Rickettsia* sp. aa46 e *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica se agrupam em um único ramo, o que é um resultado semelhante ao observado por Roux et al. (1997). Estes resultados mostram que o gene *gltA* não é uma boa opção para análises filogenéticas de riquetsias, pertencentes a estas espécies, uma vez que, o gene não apresenta variabilidade suficiente para resolver a filogenia das mesmas. A análise da distância par-a-par entre a *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica e a *R. sibirica* é zero (100%), o mesmo é observado para *Rickettsia* sp. aa46. Desta forma, ambas ultrapassam o limite máximo para que elas duas sejam consideradas espécies distintas à *R. sibirica*. Desta forma, baseando-se na metodologia descrita por Fournier et al. (2003), estas bactérias seriam uma única espécie. Em relação à *R. parkeri* e *R. africae*, os valores de identidade são 99,9% e 99,7%, respectivamente. Se todos os outros quatro genes ou somente três fossem abaixo de seus limites (16S rRNA, *ompA*, *ompB* e *geneD*), o resultado do gene *gltA* permitiria afirmar que *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica LIC4317 e *Rickettsia* sp. aa46 são espécies distintas de *R. parkeri* e *R. africae*, uma vez que, o valor de identidade não ultrapassa o limite para estas duas espécies (Fig. 1.1 e Tab. 1.2).

Em relação ao gene *ompA*, a sua parte mais próxima ao terminal 5', observamos uma topologia com uma melhor separação entre as espécies estudadas, entretanto, os valores de bootstrap obtidos são inferiores a 70, o que não confere confiabilidade ao resultado, indicando que de fato, ainda para esse gene, a variação observada é insuficiente para uma resolução filogenética precisa. A topologia mostra que para este gene, *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica e *Rickettsia* sp. aa46 são próximas à *R. parkeri* e *R. africae*, mas aparece como clado irmão de *R. sibirica*. A análise da distância par-a-par corrobora com o observado pela filogenia, pois os valores em relação a *R. parkeri* são 98,3%, para *R. africae* é 99,6% e em relação a *R. sibirica* são 98,9% e 99,2%. Para a primeira espécie os valores são 0,5% abaixo do limite de corte da metodologia, enquanto que, para *R. africae* é 0,8% acima do limite de corte e para *R. sibirica* são 0,1% e 0,4% acima do limite de

corde, o que definiria *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica LIC4317 e *Rickettsia* sp. aa46 como espécies diferentes quando comparada a *R. parkeri* e a mesma espécie quando comparada a *R. sibirica* e *R. africae* (Fig. 1.2 e Tab. 1.3).

O gene *ompB* apresenta a melhor análise filogenética entre os quatro genes analisados. A topologia da árvore é sustentada por valores de bootstrap superiores a 70 em quase todos os ramos, exceto no que agrupa *Rickettsia honei*, *Rickettsia peacockii* e *R. rickettsii*. Neste resultado observamos que para esta sequência concatenada do gene *ompB*, *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica LIC4317 é clado irmão da *R. parkeri*, aparecendo separada de *R. sibirica* pela primeira vez. A análise da distância par-a-par apresenta os valores de 99,1% na comparação entre *R. parkeri* e *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica. Este valor é 0,1% abaixo do limite para o gene *ompB*, o que indicaria que são espécies diferentes. Na análise comparativa entre *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica e *R. sibirica* observa-se 98,8 e 98,9%, apresentando 0,4 e 0,3% abaixo do limite. O mesmo não ocorre para *R. africae* que apresenta 0,1% acima do limite de corte (Fig. 1.3 e Tab. 1.4). As sequências obtidas para o gene *ompB* para isolado de *Rickettsia* sp. aa46 estão sendo analisadas.

O último gene analisado foi o *geneD*. A árvore filogenética resultante para estas sequências repete o observado com os genes *gltA* e *ompA* e apresenta uma topologia cujo nós dos ramos não possuem valores de bootstrap acima de 70. Apesar da baixa confiabilidade deste resultado, *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica LIC4317 também aparece próxima à *R. parkeri*. A distância par-a-par entre as sequências destas duas bactérias apresenta os valores de 98,9%, o que é 0,4% abaixo do limite de corte da metodologia, indicando que também para este gene as duas bactérias são espécies distintas. O mesmo ocorre para *R. africae* e *R. sibirica* que apresenta 0,2% e 0,4/0,5/0,2% abaixo do limite, respectivamente (Fig. 1.4 e Tab. 1.5). As sequências obtidas para o gene *geneD* para isolado de *Rickettsia* sp. aa46 estão sendo analisadas.

De acordo com esta metodologia, para que duas bactérias sejam consideradas espécies distintas, somente um dos cinco genes analisados podem apresentar os valores acima dos limites de corte, logo, não foi possível separar *Rickettsia* sp. aa46 e *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica LIC4317 de *R. sibirica* nas análises obtidas para os genes *gltA* e *ompA*. Da mesma forma que não foi possível separar *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica LIC4317 de *R. africae* para os genes *ompA* e *ompB*. Em relação à *R. parkeri*, inicialmente considerada a espécie de

Rickettsia sp. cepa Mata Atlântica, nenhum dos genes analisados apresentou valores acima dos limites de corte, indicando que ambas são espécies distintas.

O que pode ser observado até o momento diante desta análise é que o gene *gltA*, ambos os tipos de amostras, foi analisado utilizando o mesmo número de pares de base indicado pela metodologia. O gene *ompA* foi analisado com menos 89pb do que a indicado pela metodologia na amostra proveniente do carrapato (LIC4317). A sequência analisada para este gene utilizando amostra isolada em cultivo celular apresentou 10pb acima do que o indicado pela metodologia. Ambas as análises apresentaram distâncias acima dos limites de corte quando comparados à espécie *R. sibirica*. Além disso, para as sequência de riquetsia proveniente do carrapato, os genes *ompA* e *ompB* apresentam distâncias acima dos limites quando comparadas à *R. africae*. Entretanto, vale ressaltar que para o gene *ompB* a sequência analisada apresentava 2981pb a menos do que indicado pela metodologia, não conferindo confiabilidade ao resultado para este gene.

Porém, uma observação muito importante em relação aos três genes, *ompA*, *ompB* e *geneD*, deve ser feita. As três sequências utilizadas para a *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica LIC4317 são menores do que as utilizadas no desenvolvimento da metodologia proposta por Fournier et al. (2003). Essa variação no tamanho influi diretamente na comparação dos valores das distâncias par-a-par observadas com os limites de corte da técnica, pois o valor das distâncias varia com o tamanho da sequência analisada. Baseado nesse fato, é possível que ao analisarmos os três genes utilizando sequências completas para esta amostra, possamos observar valores de distância que modifiquem completamente o panorama encontrado até o momento. Ambos os cenários são possíveis, tanto a permanência das distâncias de *ompA* entre *R. sibirica* e *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica LIC4317 quanto *R. africae* e *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica LIC4317, com valores acima dos limites de corte, indicando que ambas são uma única espécie, ou o aumento da diferença entre elas, indicando que são espécies diferentes. O mesmo pode ocorrer com a *R. parkeri*.

Em adição, outra observação deve ser feita em relação às análises utilizando sequências para os genes *gltA* e *ompA* do isolado *Rickettsia* sp. aa46. Nestas análises é possível observar que não foi possível separar a *Rickettsia* sp. aa46 de *R. sibirica* para os genes *gltA* e *ompA*. Da mesma forma que não foi possível separar *Rickettsia* sp. aa46 de *R. africae* para o gene *ompA*. Desta forma, é possível afirmar que *R. sibirica* supera o número de limites de genes permitidos para

ser considerada uma espécie distinta de *Rickettsia* sp. aa46. Por outro lado, *R. africana* já apresenta o número de genes permitido para ser considerada espécie distinta de *Rickettsia* sp. aa46. Nas outras análises, é possível que encontremos ou não valores acima dos limites de corte, ao analisarmos os outros genes restantes (16S rRNA, *ompB* e *geneD*) para *Rickettsia* sp. aa46. Desta forma, com base em nossas análises é possível inferirmos que não é possível separar *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica de *R. sibirica*, sugerindo que ambas são a mesma espécie, aplicando a metodologia proposta por Fournier et al. (2003).

4 CAPÍTULO 2: ISOLAMENTO DE *Rickettsia* sp. CIRCULANTE EM FOCO RECENTE DE FEBRE MACULOSA

4.1 INTRODUÇÃO

No Brasil, observam-se dois cenários ecológicos e epidemiológicos distintos para a circulação de *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri* e *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica. Num cenário, observa-se uma maior incidência da doença causada por *R. rickettsii*, inclusive com casos fatais, na região Sudeste e Centro Oeste do país, tendo a participação dos carrapatos *Amblyomma aureolatum* e *Amblyomma sculptum* no ciclo epidêmico da doença (Pinter & Labruna, 2006; Labruna et al., 2011; Soares et al., 2011).

No outro cenário, observa-se a circulação de *R. parkeri* e/ou *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica (Silveira et al. 2007; Spolidorio et al. 2010; Szabó et al. 2013). Até o momento, *R. parkeri* tem sido identificada circulando apenas em carrapatos (Silveira et al. 2007). O mesmo não ocorre para *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica que vem ganhando uma grande importância epidemiológica, pois tem sido detectada em carrapatos e/ou associada a casos humanos em diversos estados brasileiros incluindo São Paulo, Bahia, Mato Grosso, Santa Catarina e Ceará (Spolidorio et al., 2010; Silva et al., 2011; Szabó et al., 2013a; Barbieri et al., 2014; Moreira, 2015; Witter et al., 2016).

Na região Nordeste, no período de 2010 a 2013, o Estado do Ceará registrou sete casos em dois municípios da região do Maciço de Baturité, com sintomatologia semelhante àquela causada por *R. parkeri*, *Rickettsia sibirica* e *Rickettsia africae*. Além disso, os carrapatos *Amblyomma ovale* e *Rhipicephalus sanguineus* parecem estar envolvidos na circulação de riquetsias patogênicas em ambiente antrópico. O carrapato *A. ovale* apresenta maior potencial de participação no ciclo epidêmico na região, além disso, *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica foi detectada molecularmente neste carrapato (Moreira, 2015). Vale ressaltar que *A. ovale* é antropofílico (Labruna et al., 2005; Guglielmone et al., 2006; Szabó et al., 2006) e pode parasitar várias espécies de carnívoros silvestres e também cães de áreas rurais no Brasil (Labruna et al., 2001), o que pode estar acontecendo em áreas de foco de FM no estado do Ceará. Entretanto, recentemente, Caetano et al. (2015) identificaram uma espécie filogeneticamente próxima a *R. rickettsii* circulando em carrapatos da espécie *R. sanguineus* neste mesmo estado.

As riquetsias podem ser cultivadas *in vitro* em uma ampla variedade de tipos celulares, incluindo as linhagens derivadas a partir de fibroblastos humanos (MRC5), células epiteliais (HeLa), células de anfíbios (XTC-2), fibroblastos de embrião de galinha e células de artrópodes (Cox, 1941; Yu & Walker, 2005). As células Vero (células renais do macaco verde africano *Cercopithecus aethiops*) e as células L929 (fibroblastos de camundongos) são utilizadas com mais frequência para isolamento e manutenção de *Rickettsia* spp. *in vitro* (Yu & Walker, 2005; Ammerman et al., 2008). A técnica do isolamento permite o estabelecimento do isolado como amostra de referência, permitindo futuros estudos biológicos e genéticos que possam ser úteis para entendimento da patogenicidade e virulência de algumas riquetsias. Desta forma, o objetivo deste estudo foi realizar o isolamento e a caracterização molecular das riquetsias circulantes em foco recente de FM no Estado do Ceará.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Área de estudo

Os carrapatos foram coletados na Região do Maciço do Baturité (4° 19' 43" S e 38° 53' 05" WGr), Estado do Ceará, Brasil. A Região do Maciço do Baturité é composta por 13 municípios, como mostra a figura 2.1. Esta região apresenta bioma caatinga, no entanto, também é composta por fragmento de Mata Atlântica. Apresenta complexa formação vegetal com características de mata atlântica dentro do bioma caatinga, região ecologicamente identificada como brejo de altitude do nordeste. Este microambiente gera um excelente habitat para a sobrevivência dos carrapatos ixodídeos e mamíferos hospedeiros dos estádios intermediários dos carrapatos.

O período de coleta foi em março de 2015 em parceria com a equipe da IV Coordenadoria Regional da Saúde – Baturité, Secretaria de Saúde do Estado do Ceará. Nesta expedição, foram coletados 125 carrapatos em 25 cães nos municípios de Baturité, Guaramiranga, Mulungu, Aratuba, Pacoti e Redenção. Os espécimes foram identificados de acordo com o protocolo de Barros-Battesti et al. (2006). Nove espécimes de *R. sanguineus* e 39 espécimes de *A. ovale*, foram selecionados para o isolamento de riquetsias.

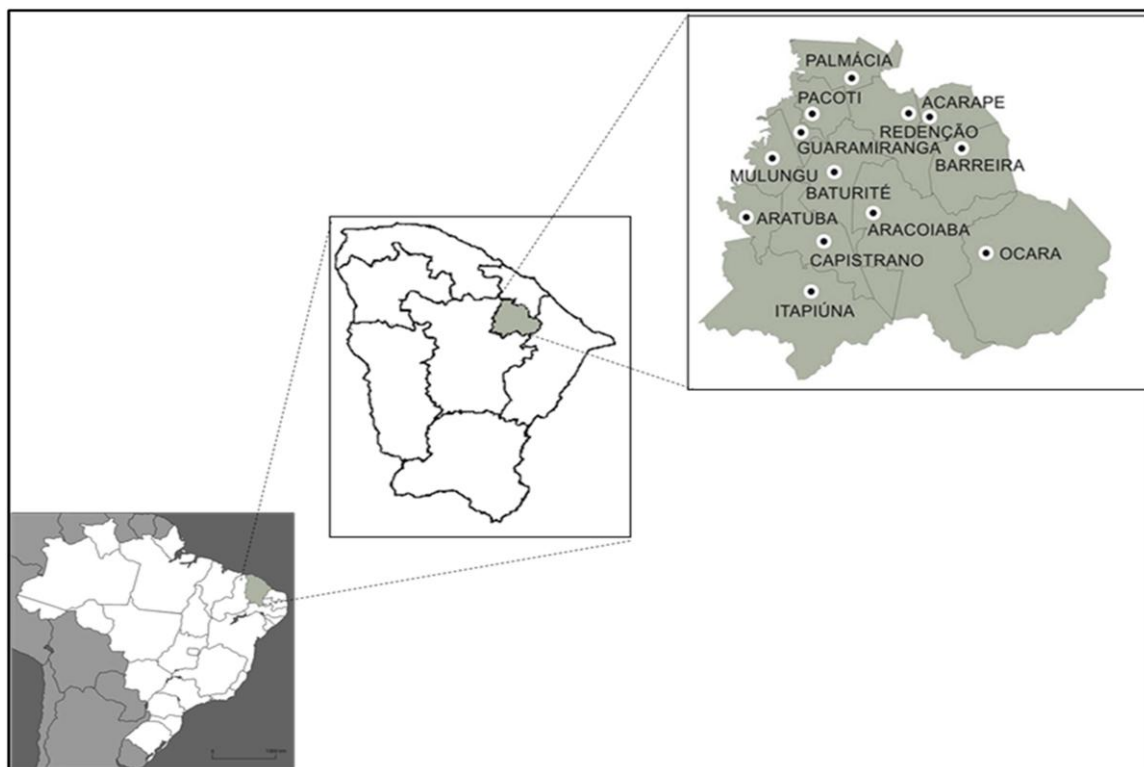


Figura 2.1: Área de estudo: Mapa do Brasil, Estado do Ceará, destacando os municípios que compõem a Região do Maciço de Baturité. Fonte: Moerbeck et al. (2015).

4.2.2 Isolamento de *Rickettsia* spp.

Os espécimes de carrapatos selecionados foram encaminhados ao Laboratório de Nível de Biossegurança 3 da Divisão de Epidemiologia e Controle de Doenças (DECD), FUNED, Belo Horizonte - Minas Gerais, para realização do isolamento da riquetsia em cultura de células Vero, utilizando-se o método de “shell vial”, conforme descrito por Kelly et al. (1991) e Labruna et al. (2004b) com algumas modificações. Para o isolamento, cada carrapato, foi individualmente desinfetado em álcool iodado (25% de iodo em álcool 70%) por 10 minutos, lavado com água Milli-Q estéril de forma abundante. Após, com um bisturi estéril, foi realizada uma secção na base do capitulo. O capitulo foi macerado em uma placa de vidro estéril com uma gota de meio de cultura MEM (Sigma-Aldrich) contendo sais de Earle, L-glutamina, aminoácidos não essenciais e bicarbonato de sódio acrescido de 10% de soro de bezerro enriquecido com ferro (Hyclone) e antibióticos (10U penicilina/mL e 10µg de estreptomicina/mL). A suspensão de cada carrapato foi diretamente inoculada no poço correspondente, contendo monocamada de células Vero. Cada carrapato foi identificado com o número do poço onde foi inoculado. As monocamadas foram preparadas previamente em duas placas de 24 poços e acrescentado 1mL deste

mesmo meio com antibióticos. As placas contendo a suspensão para isolamento foram centrifugadas a 400g por 1 hora a temperatura ambiente, em seguida incubadas a 28°C em estufa sem CO₂.

Após três dias, o meio foi trocado para um meio de cultura isento de antibióticos. Depois de 7 dias, parte da monocamada foi raspada em 100µL de meio de cultivo e retirado 20 µL, e subsequentemente examinada por coloração de acordo com Gimenez (1964) para analisar a presença de organismos semelhantes à *Rickettsia* spp. Este procedimento foi realizado a cada sete dias. Quando detectadas estruturas compatíveis com riquetsias, as células do poço eram raspadas com a ponta de uma pipeta estéril e inoculadas em placa de 24 poços contendo uma monocamada de células Vero para tentativa de estabelecer o isolado em laboratório. Se negativos, os isolados continuaram sendo incubados na mesma temperatura, e examinados a cada sete dias, até que a monocamada fosse naturalmente destruída.

4.2.3 Manutenção do isolado

Assim que as células do “shell vial” demonstraram indício de infecção por riquetsias, estas foram inoculadas em garrafa de 25cm² contendo uma monocamada de células Vero. O nível de infecção era monitorado a cada passagem utilizando a metodologia descrita por Giménez (1964) e subsequente visualização em microscópio óptico (Olympus DP72) com aumento de 1000X em óleo de imersão. Os isolados foram mantidos por no mínimo 5 passagens em monocamadas de células Vero, posteriormente, estes cultivos foram raspados e criopreservados a -80 °C em solução contendo soro de bezerro enriquecido com ferro a 15% (Hyclone) e Dimetilsulfóxido (DMSO) a 10%.

Os tubos criogênicos contendo os isolados foram descongelados rapidamente e seu conteúdo (~1mL) foi adicionado em frascos (25cm²) contendo uma monocamada de células Vero não infectadas. Os meios de cultura foram removidos dos frascos antes da adição dos isolados. Os frascos foram incubados sob agitação suave durante uma hora a 22°C. Em seguida, foi adicionado 4mL de MEM (Sigma-Aldrich) contendo sais de Earle, L-glutamina, aminoácidos não essenciais, bicarbonato de sódio e 10% de soro de bezerro enriquecido com ferro, em seguida incubou-se a 28°C, sem CO₂. Após as primeiras 24 horas, o meio foi trocado e os frascos foram mantidos nestas condições por aproximadamente 7 dias, quando a primeira passagem após o descongelamento foi realizada. As passagens

eram realizadas a cada 7 dias e o nível de infecção monitorado por Giménez, conforme descrito anteriormente.

4.2.4 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Parte das células infectadas provenientes da 11^a passagem após o descongelamento, foram utilizados para a produção de antígeno de *Rickettsia* em lâminas de teflon com 12 poços (Interprise), nas quais foram utilizadas em ensaios de RIFI, como anteriormente descrito (Horta et al., 2004). Os ensaios de RIFI foram de acordo com o Procedimento Operacional Padrão (POP) seguindo a rotina do Laboratório de Hantavirose e Riquetsioses do Serviço de Virologia e Riquetsioses, Funed - Minas Gerais – Brasil. Como controles positivos e negativos utilizou-se *Rickettsia* Universal Positive Control (diluição 1:32) e *Rickettsia* Universal Negative Control, respectivamente, provenientes no kit (Scimedx Corporation). Para a análise foi utilizado o anticorpo conjugado Anti-Human IgG fornecido no próprio kit.

4.2.5 Caracterização do Isolado

4.2.5.1 Reação em Cadeia pela Polimerase

Após os isolados serem estabelecidos em condições laboratoriais, o DNA foi extraído através do QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante.

Primeiramente, o DNA extraído foi testado por Nested-PCR utilizando oligonucleotídeos gênero-específicos para o gene *htrA* (High-temperature requirement A) que codifica uma proteína estrutural de membrana de 17 KDa, altamente conservada no gênero riquetsia (Tabela 2.1). O material extraído foi submetido 1^a reação do nested-PCR. Cada reação apresentava 1X de solução tampão com pH 8,5; 1,5 mM de MgCl₂; 200 µM de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP; 0,5 µM de cada iniciador (17k-3 e 17k-5); 0,5 U de GoTaq G2 Hot Start Polymerase (Promega) e 100-200 ng de DNA. O volume foi completado para 25µl com água DNase/ RNase free. Utilizou-se como controle positivo DNA de *R. rhipicephali* cepa HJ#5 e água DNase/ RNase free como controle negativo. Empregou-se a ciclagem de: 94°C/ 3 min, 35X [94°C/ 45 seg, 56 °C / 1min, 72°C (90 seg)], 72°C/ 10 min, 20°C / tempo indefinido. O material amplificado foi submetido a 2^o reação do nested-PCR juntamente com 1X de solução tampão com pH 8,5; 1,5 mM de MgCl₂; 200 µM de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP; 0,4 µM de cada iniciador (17kD1 e 17kD2); 0,5 U

de GoTaq G2 Hot Start Polymerase (Promega) e 1µl da 1ª reação. O volume foi completado para 25µl com água DNase/ RNase free. Utilizou-se a seguinte ciclagem: 94 °C/ 3 min, 35X [94°C/ 45 seg, 56 °C / 30 seg, 72°C (90 seg)], 72°C/ 10 min, 12°C / tempo indefinido.

As amostras de DNA dos isolados foram submetidas a outras reações de PCR (Reação em Cadeia Polimerase) utilizando oligonucleotídeos que amplificam fragmentos gênicos para o gene *sca4* (previamente conhecido como "*geneD*") que codifica uma proteína antigênica de 120KDa presente na superfície riquetsial (Tab. 2.1). Cada reação de PCR apresentava 1X de solução tampão com pH 8,5; 1,5 mM de MgCl₂; 200 µM de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP; 0,5 µM de cada iniciador (D1738f e D2482r); 0,5 U de GoTaq G2 Hot Start Polymerase (Promega) e 100-200 ng de DNA. O volume foi completado para 25µl com água DNase/ RNase free. Utilizou-se como controle positivo DNA de *R. rhipicephali* cepa HJ#5 e água DNase/ RNase free como controle negativo. Empregou-se a ciclagem: 94°C/ 3 min e 30 seg, 40X [94°C/ 30 seg, 54 °C / 30 seg, 72°C (90 seg)], 72°C/ 7 min, 12°C / tempo indefinido.

Tabela 2.1: Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR e sequenciamento

Gene	Designação do iniciador	Sequência Nucleotídica (5' – 3')	Fragmento amplificado (pb)	Referência
<i>htrA</i> (1ª reação)	17k-3	TGTCTATCAATTCACTTGCC	549	Labruna et al. (2004b)
	17k-5	GCTTTACAAAATTCTAAAAACCATATA		
<i>htrA</i> (2ª reação)	17kD1	GCTCTTGCAACTTCTATGTT	434	Webb et al. (1990)
	17kD2	CATTGTTTCGTCAGGTTGGCG		
<i>geneD</i> (<i>sca4</i>)	D1738f	GTATCTGAATTAAGCAATGCG	~ 744	Sekeyova et al. (2001)
	D2482r	CTATAACAGGATTAACAGCG		

4.2.5.2 Visualização dos produtos amplificados

Os produtos amplificados da reação de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (100ml TAE 1X; 1,5g agarose UltraPure™ Agarose Invitrogen™), em cuba horizontal e tampão TAE 1X (tampão Tris-Acetato-EDTA, pH 8,0) a 100V durante 40 minutos. Utilizou-se marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Ludwig Biotec). Os géis foram corados em solução de brometo de etídio (0,5 ug/ml) por 15 minutos e a visualização das bandas em transiluminador ultravioleta.

4.2.5.3 Purificação e sequenciamento de DNA

As amostras que amplificaram no tamanho esperado, tiveram os produtos de PCR purificados utilizando o kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, (Macherey Nagel). As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) utilizando o sequenciador automático ABI 3730xl (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) de acordo com o protocolo de Otto et al. (2008) realizado pela Plataforma de Sequenciamento (PDTIS/FIOCRUZ).

4.2.5.4 Edição de sequências e análises filogenéticas

As sequências obtidas para cada gene foram analisadas e editadas utilizando-se o programa SeqMan do pacote de programas para Windows Lasergene DNASTAR™. As sequências de nucleotídeos foram comparadas com as disponíveis no banco de dados do GenBank utilizando o algoritmo Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). O alinhamento das sequências de nucleotídeos foi realizado utilizando-se o ClustalW no programa MEGA 5.2. Para reconstrução filogenética foi feita uma análise por Neighbor-Joining (Tamura et al., 2011), utilizando modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros (Kimura, 1980), com 1000 repetições e exclusão dos “gaps”.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Isolamento de *Rickettsia* spp. em cultura de células Vero

Dos 48 carrapatos submetidos à técnica de isolamento de riquetsias, dois isolados foram obtidos com sucesso. Um isolado proveniente do carrapato *A. ovale* – AO11 e o outro proveniente do *R. sanguineus* – RS8, ambos coletados no município de Baturité. Cada poço foi raspado e corado de acordo com Gimenez (Gimenez, 1964), na qual, o isolado 11 (AO11) demonstrou indício de infecção no 21º dia após o isolamento (Fig. 2.2), enquanto que o isolado 8 (RS8) demonstrou indício de infecção no 28º dia.

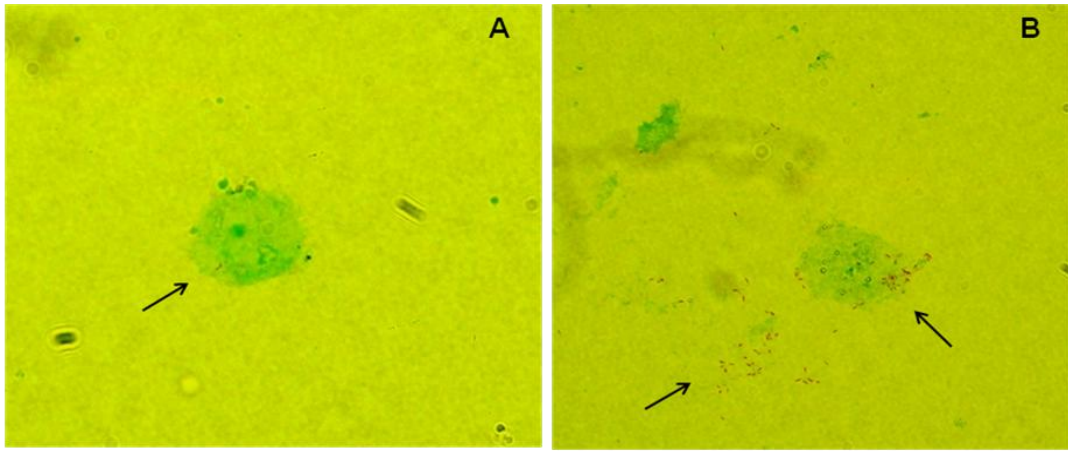


Figura 2.2: Imagem de cultura de células Vero infectada com riquétsias isoladas a partir de carrapatos provenientes de área de foco de Febre Maculosa no Estado do Ceará. Acompanhamento da infecção do isolado 11 (AO11). A) 21º dia. B) 28º dia após o isolamento (coloração de Gimenez, 1000x).

A partir desta etapa, as células destes poços foram raspadas e inoculadas em uma garrafa de 25cm² contendo uma monocamada de células. Estes isolados foram mantidos por no mínimo 5 passagens antes do congelamento, no entanto, a taxa de infecção não foi superior a 50%, onde metade das células analisadas utilizando a metodologia de Gimenez (1964) apresentaram bactérias (coradas em fucsina) internalizadas ou em contato com as células Vero. Após o descongelamento, os isolados AO11 e RS8 foram mantidos por sucessivas passagens em garrafas de 25cm², sempre demonstrando de 80 a 100% de infecção após 7 dias. Após a 8ª passagem a taxa de infecção de ambos os isolados diminuíram drasticamente, não sendo superior a 20% de células infectadas. Morfologicamente, os isolados AO11 e RS8 foram caracterizados como organismos bastonetes, como demonstrado por coloração com Gimenez e RIFI em células Vero infectadas (Fig. 2.3). Atualmente, estes isolados estão estabelecidos em cultivo celular e encontram-se congelados no Laboratório de Nível de Biossegurança 3 da DECD, FUNED, Belo Horizonte - Minas Gerais, Brasil.

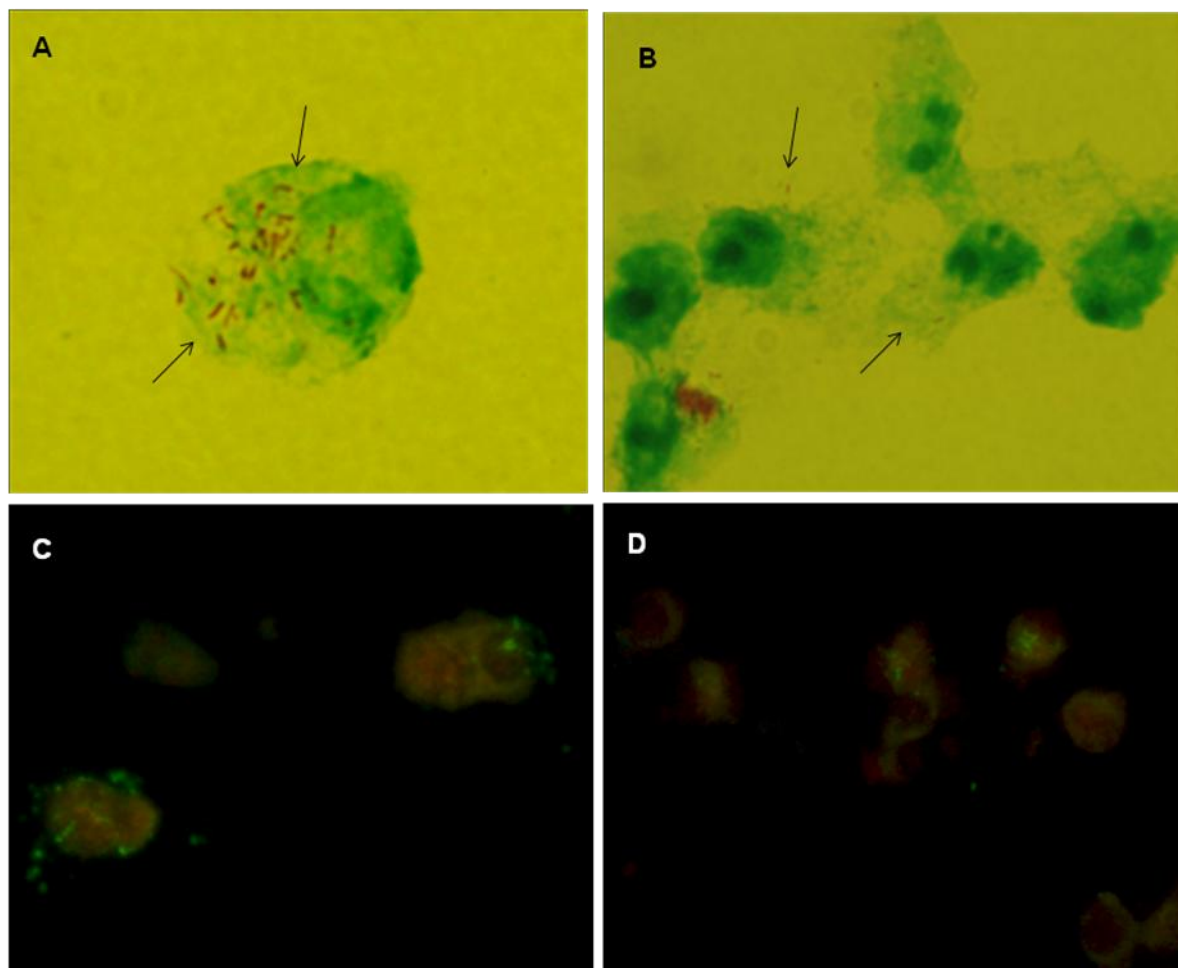


Figura 2.3: Células Vero infectadas por estruturas compatíveis com *Rickettsia* spp., demonstrado por coloração de Gimenez (A e B) e por ensaio de imunofluorescência indireta utilizando Rickettsia Universal Positive Control (diluição 1:32) e conjugado Anti-Human IgG (Scimedx Corporation) (C e D), ambas as células Vero estavam infectadas por riquetsias no 90° dia após o descongelamento. (A e C) Isolado AO11. (B e D) isolado RS8. As fotografias foram tiradas no microscópio óptico (Olympus DP72) na objetiva de 100 com aumento de 1000X (A e B) e microscópio de imunofluorescência (Olympus DP72) na objetiva de 40 com aumento de 400X (C e D). Setas indicam a presença de bactérias em forma de bastonete (estruturas compatíveis com riquetsias).

4.3.2 Caracterização Molecular

DNA total obtido dos isolados AO11 e RS8 foram utilizados como molde para amplificação dos genes *htrA* e *geneD* que foram subsequentemente sequenciados. Vale ressaltar que a sequência para o *geneD* do isolado AO11 apresentou baixa qualidade, não sendo portanto analisada filogeneticamente. A sequência de 434 pb do gene *htrA* obtida a partir dos isolados AO11 (408/409) e RS8 (412/416) mostraram identidade de 99% como *R. rickettsii* cepa Brazil (CP003305) e *R. rickettsii* cepa Sheila Smith (CP000848), *Rickettsia philipii*, *R. parkeri* (CP003341), *Rickettsia peacockii* (CP001227), *Rickettsia slovacica* (CP003375), *Rickettsia conorii* (AE006914) e *R. sibirica* (AF445384). Além disso, a

sequencia de ~744 pb para o *geneD* do isolado RS8 mostrou identidade de 99% (742/749) com *R. rickettsii* cepa Brazil (CP003305), *R. rickettsii* cepa Sheila Smith (CP000848) e *R. philipii* (CP003308) e *R. peacockii* (CP001227).

No dendograma filogenético formado com o gene *htrA* observamos que ambos os isolados são riquetsias pertencentes ao GFM com um bootstrap de 74% (Fig. 2.4). Entretanto, a análise baseada no fragmento do *geneD* mostrou que o isolado RS8 está inserido no grupo formado por *R. rickettsii* com um bootstrap de 81%, sendo filogeneticamente próxima de *R. rickettsii* cepa Brasil (CP003305) com 71% de bootstrap (Fig. 2.5). As sequências obtidas para os genes *htrA* e *sca4* foram depositadas no GenBank. Para o gene *htrA* os números de acesso são KX356603 e KX356605 para os isolados AO11 e RS8, respectivamente. O número KX356604 corresponde ao depósito obtido para o gene *sca4* do isolado RS8.

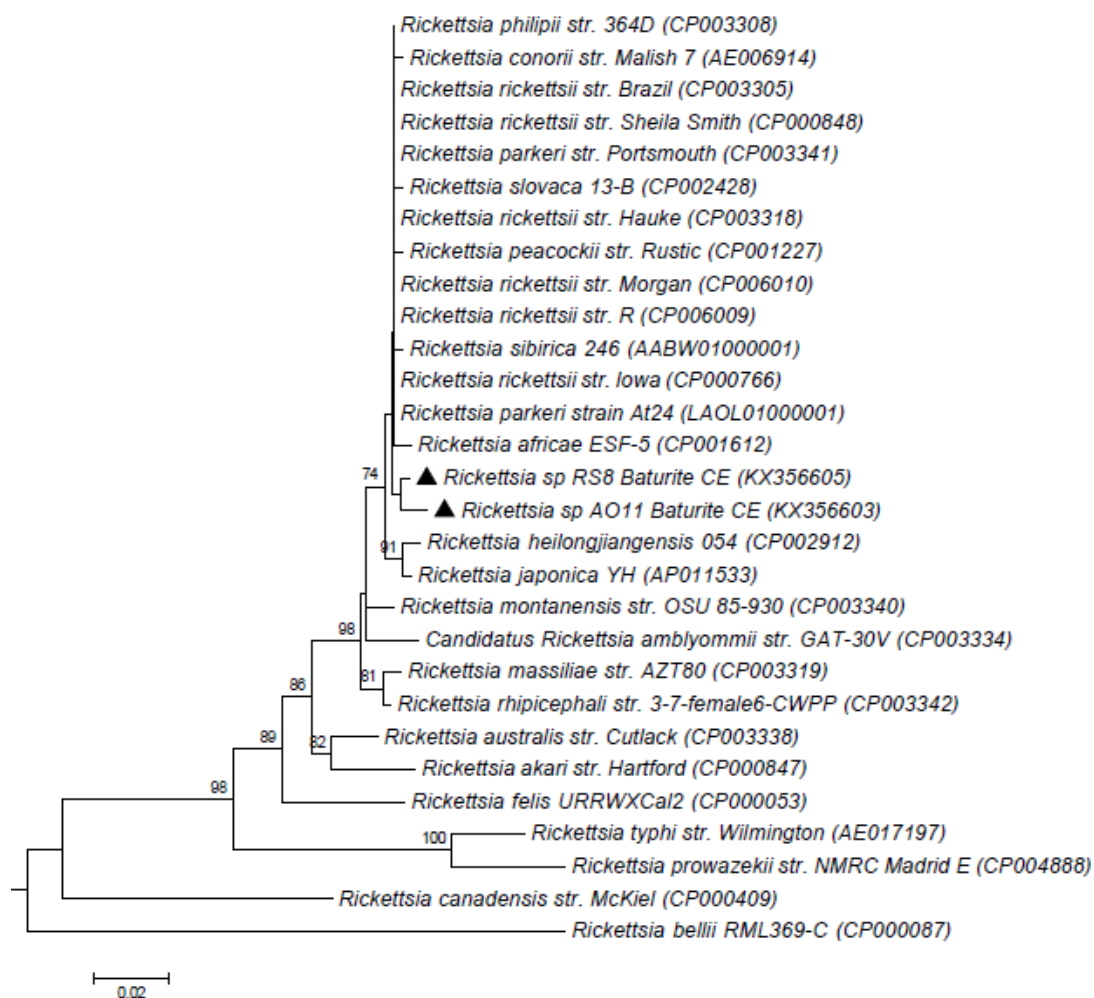


Figura 2.4: Árvore filogenética para o gene *htrA* construída pelo método Neighbor-Joining utilizando o modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros com o uso do programa MEGA 5.2. Os valores de bootstrap acima de 70% que dão suporte aos nós estão apresentados. Os triângulos de cor preta representam os isolados AO11 e RS8. Os números de acesso do GenBank estão entre parênteses.

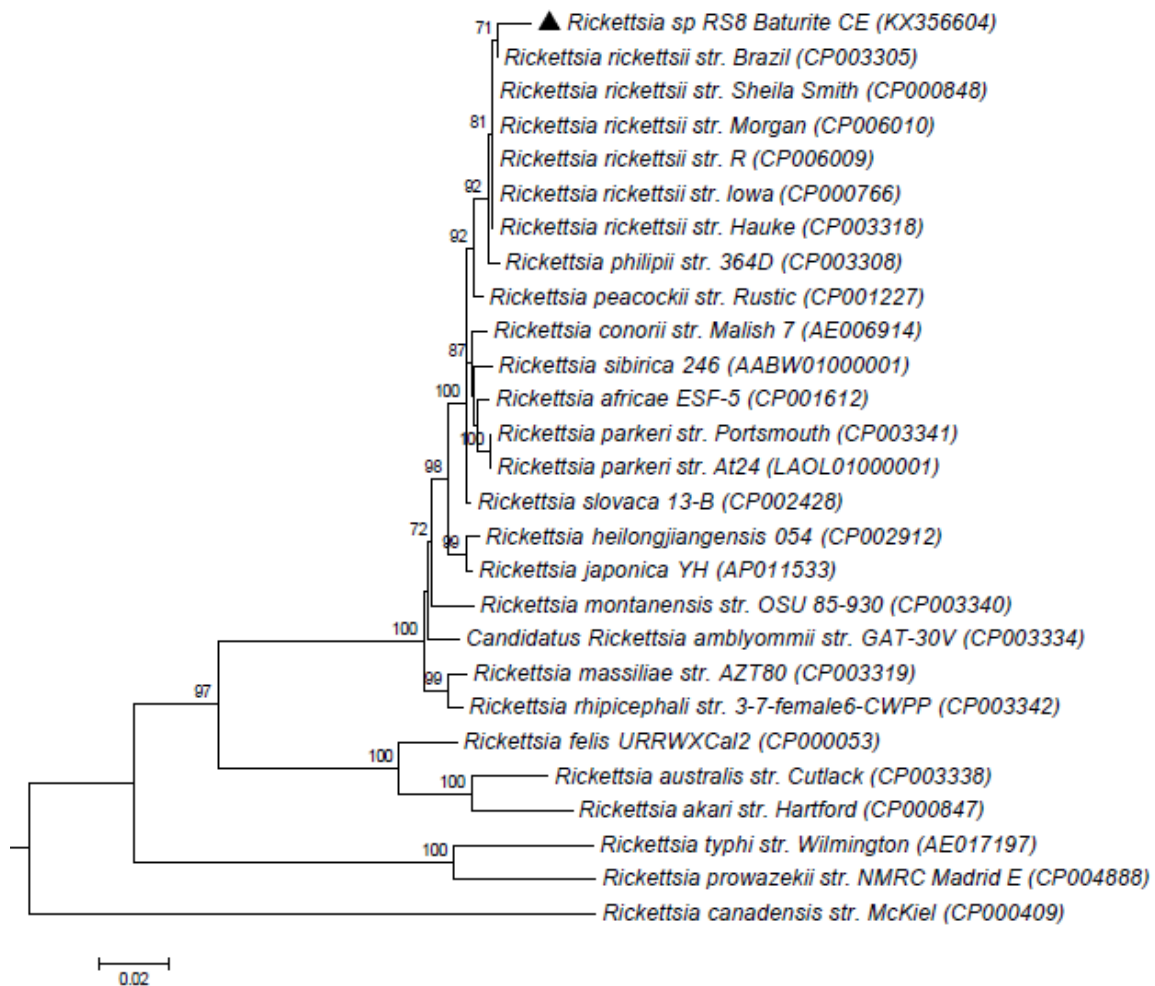


Figura 2.5: Inferência filogenética para o geneD (*sca4*) construída pelo método Neighbor-Joining e modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros. Os valores de bootstrap acima de 70% que dão suporte aos nódulos estão representados. O triângulo de cor preta representa o isolado RS8. Os números de acesso do GenBank estão entre parênteses.

4.4 DISCUSSÃO

O presente estudo relata o isolamento de duas bactérias, ambas do GFM, a partir de carrapatos naturalmente infectados coletados no Estado do Ceará, nordeste brasileiro. De acordo com Fournier et al. (2003), o critério baseado nas sequências gênicas para identificação de novas espécies de *Rickettsia*, propuseram que para uma determinada espécie de riquetsia seja classificada como nova espécie, o isolado deve ter sido estabelecido. Além disso, o isolado não deve exibir mais do que um dos seguintes graus de similaridade de nucleotídeos (valores de corte) com as espécies validadas mais homologas: 99,8 e 99,9% para os genes *rrs*

(16S rRNA) e *gltA*, respectivamente, e quando amplificável 98,8%, 99,2% e 99,3% para os genes *ompA*, *ompB*, e *sca4* (gene D), respectivamente.

Neste estudo, apenas os genes *htrA* e *sca4* foram avaliados. O que se observa na árvore obtida através do gene *htrA* é que os isolados AO11 e RS8 pertencem ao gênero *Rickettsia* do GFM. Este gene é muito conservado, desta forma, não é uma boa opção para análises filogenéticas de riquetsias, pois não apresenta uma grande capacidade de resolução, dificultando a análise de forma precisa das espécies pertencentes ao GFM (Fig. 2.4).

Por outro lado, o gene *sca4* (*geneD*), codifica uma proteína antigênica presente na superfície riquetsial (surface cell antigen 4), considerado como um bom marcador para estudos filogenéticos de *Rickettsia* spp. (Sekeyova et al., 2001) e por isso vem sendo amplamente utilizado em diversos estudos (Beninati et al. 2005; Oteo et al., 2014 Mediannikov et al., 2015). Na inferência filogenética obtida para o fragmento do *geneD* (fig 2.5), observa-se claramente que o isolado RS8 agrupou juntamente com *R. rickettsii* cepa Brazil (CP003305), *R. rickettsii* cepa Sheila Smith (CP000848), *R. rickettsii* cepa Morgan (CP006010), *R. rickettsii* cepa R (CP006009) e *R. rickettsii* cepa Hauke (CP003318) e *R. rickettsii* cepa Iowa (CP000766), apresentando um valor de bootstrap de 81%.

O Estado do Ceará confirmou 10 casos de FM no período de 2010 a 2013, a grande maioria na região do Maciço de Baturité. As características clínico-epidemiológicas dos casos, sugeriram o ciclo epidêmico envolvendo *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica, cães e *A. ovale* (Moerbeck et al., 2016). Até o momento, o Estado do Ceará não registrou casos graves de FM causados por *R. rickettsii*, é bem possível que o ciclo epidêmico para esta espécie de riquetsia ainda não esteja bem estabelecido, visto que, na área deste estudo, uma pequena frequência de carrapatos *A. sculptum*, principal vetor de *R. rickettsii* no Brasil, foram encontrados na região (Moerbeck et al., 2016). No sudeste do Brasil, onde se localiza a maioria dos casos graves de FMB, a doença ocorre principalmente dentro de cenário ecológico já conhecido: altas infestações ambientais de *A. sculptum* mantidos por um dos seus principais hospedeiros, como por exemplo, as capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Algumas características ecológicas de *A. sculptum* do sudeste do Brasil indicam que ele é favorecido por fatores antrópicos (Szabó et al., 2013b). Esta espécie de carrapato é frequentemente encontrado associado a matas ciliares próximas aos assentamentos humanos (Souza et al., 2006). Em condições naturais, *A. sculptum* é uma espécie de carrapato associado ao bioma Cerrado (Szabó et al.,

2007; Veronez et al., 2010). Ao mesmo tempo, é geralmente ausente no bioma Mata Atlântica, mas possivelmente, pode aparecer em áreas degradadas de tal bioma (Szabó et al., 2009).

Neste estudo, uma espécie filogeneticamente próxima à *R. rickettsii* foi isolada a partir de carrapatos da espécie *R. sanguineus*. Esta espécie de carrapato foi introduzida no país com a colonização e apresenta estreita relação com os cães domésticos (Szabó et al., 2005), sendo que associações com outros animais, incluindo o homem, são consideradas como acidentais. No Brasil, a transmissão de FMB por uma outra espécie de carrapato que não seja *A. sculptum* ou *A. aureolatum*, como por exemplo o *R. sanguineus*, ainda é incerto. No entanto, o seu potencial de transmissão não deve ser desconsiderado, uma vez que, esta espécie de carrapato é o principal vetor de *R. conorii*, agente da Febre Botonosa na bacia do Mediterrâneo e da Febre maculosa das Montanhas Rochosas causada por *R. rickettsii* em humanos, nos EUA e México (Demma et al., 2005; Eremeeva et al., 2011). No entanto, apesar dos relatos de *R. sanguineus* parasitando humanos não serem tão frequentes no Brasil (Dantas-Torres et al., 2006; Serra-Freire et al., 2011), deve se considerar que em condições laboratoriais foi demonstrado que *R. sanguineus* é um vetor competente para *R. rickettsii* e, ao contrário ao observado com os carrapatos *A. aureolatum* e *A. sculptum*, a espécie *R. rickettsii* não provocou efeito letal sobre os carrapatos *R. sanguineus* (Piranda et al., 2011). A infecção natural de *R. sanguineus* com *R. rickettsii* já foram observadas em áreas endêmicas e não endêmicas de FMB (Cunha et al., 2009; Gehrke et al., 2009; Moraes-Filho et al., 2009; Pacheco et al., 2011; Ogrzewalska et al., 2012; Caetano et al., 2015).

É interessante mencionar que todos os carrapatos coletados na região do Maciço do Baturité pra tentativa de isolamento de riquetsias foram coletados em cães. Em condições naturais, os cães podem desempenhar um importante papel na cadeia epidemiológica da FMB, uma vez que, em condições laboratoriais foi constatado que carrapatos *R. sanguineus*, quando alimentados em cães riquetsêmicos, se infectaram com *R. rickettsii*, sugerindo assim, um papel amplificador para este animal em áreas endêmicas (Piranda et al., 2011). Além disso, a morte de quatro funcionários que trabalhavam em um abrigo para cães no Rio de Janeiro foi atribuída à FMB. Neste caso, apenas carrapatos da espécie *R. sanguineus* foram encontrados, além do que, 97% dos cães deste abrigo mostraram-se soropositivos quando testados para antígeno de *R. rickettsii* (Costa et al., 2012). Assim, a participação do espécie *R. sanguineus* na ocorrência de ciclos

epidêmicos da FMB devem ser sempre considerada e investigada. Desta forma, enfatizamos que os cães expostos a carrapatos infectados com *Rickettsia* spp. patogênicas, podem representar um potencial risco para a transmissão humana ao carrearem os vetores para o ambiente domiciliar, possibilitando o contato dos carrapatos com seres humanos (Evans et al., 2000). Além do que, *R. sanguineus*, infectados ou não por *Rickettsia* spp., podem se alimentar em cães, concomitantemente com carrapatos do gênero *Amblyomma* spp., espécies antropofílicas, aumentando o risco de transmissão para humanos, em virtude do compartilhamento de patógenos. Desta forma, a possibilidade que *R. rickettsii* esteja circulando na área estudada, fato também observado por Caetano et al. (2015), pode impactar na mudança clínica da doença na área do foco, visto que, até o momento não foram diagnosticados casos graves ou fatais da doença na área.

Os isolados de riquetsias obtidos neste estudo serão utilizados em futuros estudos biológicos e genéticos comparativos, utilizando também outras estirpes de *Rickettsia* sp. isoladas no Brasil, visando o entendimento sobre o comportamento, patogenicidade e virulência destas riquetsias.

5 CAPÍTULO 3: COMPARAÇÃO DE CRESCIMENTO DE ESTIRPES DE *Rickettsia* sp. DO GRUPO FEBRE MACULOSA E EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS A INFECÇÃO

5.1 INTRODUÇÃO

No Brasil, tradicionalmente a doença causada por uma riquetsia do Grupo Febre Maculosa (GFM), é chamada de Febre Maculosa (FM), anteriormente causada exclusivamente por *Rickettsia rickettsii*. No entanto, nos últimos anos, outra espécie patogênica do GFM, *Rickettsia parkeri*, tem sido detectada circulando em carrapatos (Angerami et al., 2006; Dantas-Torres, 2007; Silveira et al., 2007; Labruna, 2009; Parola et al., 2013).

R. rickettsii é o agente causador da Febre maculosa Brasileira (FMB) e Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (FMRR) nos EUA, sendo considerada a mais grave de todas as riquetsioses transmitidas por carrapatos (Parola et al., 2005). *R. parkeri* foi recentemente reclassificada como bactéria patogênica que causa uma doença exantemática associada à escara, considerada menos grave do que a riquetsiose causada por *R. rickettsii* (Paddock et al., 2004). *Rickettsia rhipicephali* é também pertencente ao GFM, e o seu papel como agente patogênico para humanos não foi relatado. No entanto, experimentos *in vitro* mostraram que esta bactéria pode ser moderadamente patogênica para cobaias (Burgdorfer et al., 1978; Gage & Jerrells, 1992). Além disso, a transmissão natural à mamíferos, através da alimentação dos carrapatos parece não ocorrer (Norment & Burgdorfer, 1984). Deste modo, o papel de *R. rhipicephali* como agente patogênico para humanos deve ser considerada como desconhecida.

OmpA e OmpB são membros de uma família de antígenos de superfície celular (SCA), proteínas autotransportadoras encontradas na superfície riquetsial (Blanc et al., 2005). rOmpA é conservada em riquetsias do GFM, enquanto que rOmpB é conservada no GFM e no Grupo Tifo (GT). Estudos sugeriram que rOmpA desempenha um papel na adesão e rOmpB tem sido implicada tanto na adesão quanto na invasão celular (Chan et al., 2009; Uchiyama, 2003). Desta forma, compreendem uma interface importante para interações patógeno-hospedeiro incluindo a adesão, invasão e sobrevivência no citoplasma.

Rickettsia sp. do GFM, replicam-se dentro do citoplasma das células e exploram a maquinaria da célula hospedeira para a polimerização de actina, impulsionando-se para as células vizinhas, como um mecanismo de disseminação célula-a-célula e evasão imune (Goldberg, 2001; Carlsson & Brown, 2006). A proteína SCA2 (antígenos de superfície celular 2/ surface cell antigen 2) apresenta várias características sugestivas de seu papel na motilidade à base de actina e também associado a adesão como observado em *Rickettsia conorii* por Cardwell & Martinez (2009). Em um estudo realizado por Kleba et al. (2010) foi observado que SCA2 e a motilidade à base de actina parecem ser fatores determinantes de virulência de riquetsias do GFM, visto que, a formação da cauda de actina em “forma de cometa” tem sido demonstrado como um importante determinante de virulência para outras bactérias, como *Listeria* e *Shigella* (Bernardini et al., 1989; Kocks et al., 1992; Brundage et al., 1993). A proteína RickA tem sido proposta como uma molécula responsável por direcionar a motilidade à base de actina em *Rickettsia* sp. do GFM, uma vez que, encontra-se ausente em *Rickettsia* sp. do GT (Gouin et al., 2004). Esta proteína localiza-se na superfície das bactérias. Ensaios *in vitro* demonstram que ela ativa o complexo de proteínas reguladoras *Arp2/3*, bem como, promove a polimerização da actina (Gouin et al., 2004; Jeng et al., 2004). É possível que SCA2 e RickA funcionem em conjunto para promover a motilidade à base de actina.

Até o momento, poucos estudos têm procurado caracterizar a dinâmica de crescimento em meio de cultura de diferentes espécies ou estirpes de *Rickettsia*, bem como a expressão de genes relacionados a infecção riquetsial, fornecendo assim parâmetros que possam apoiar o avanço do conhecimento sobre estes patógenos (Rolain et al., 2002; Ereemeeva et al., 2003; Boldis et al., 2009; Elfving et al., 2012). Neste contexto, análises comparativas usando *R. rhipicephali* e riquetsias patogênicas do GFM podem fornecer novas informações sobre o potencial patogênico e comportamento destas bactérias em co-cultivo com células Vero. Assim, no presente estudo, avaliamos comparativamente a taxa de crescimento e expressão gênica de *R. rickettsii*, *R. parkeri* e *R. rhipicephali*, todos isolados brasileiros, infectando células Vero.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Cultivo Celular

Os experimentos com *R. rickettsii* cepa Taiaçu (Pinter & Labruna, 2006), *R. parkeri* cepa AT#24 (Silveira et al., 2007), e *R. rhipicephali* cepa H#J5 (Labruna et al., 2007b) foram desenvolvidos no Laboratório de Nível de Biossegurança 3 da Divisão de Epidemiologia e Controle de Doenças (DECD) da Fundação Ezequiel Dias - Funed, Belo Horizonte, Minas Gerais - Brasil.

Tubos criogênicos contendo células Vero infectadas com riquetsias foram rapidamente descongeladas e o seu conteúdo (~1mL) foi adicionado em frascos (25cm²) contendo uma monocamada de células Vero não infectadas. Os meios de cultivo presentes nos frascos foram removidos imediatamente antes da adição das riquetsias. Estes frascos foram incubados sob agitação suave durante uma hora a temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 4mL de MEM (Sigma-Aldrich) contendo sais de Earle, L-glutamina, aminoácidos não essenciais, bicarbonato de sódio e soro de bezerro enriquecido com ferro a 10% e incubou-se a 28°C, sem CO₂. Após 24 horas, o meio foi trocado e os frascos foram mantidos nestas mesmas condições durante 7 dias. A monocamada infectada foi raspada em 3mL de meio e colocada num frasco novo (75cm²) com monocamada de células Vero não infectadas, seguido pela adição de 12mL de meio fresco e incubado a 28°C, sem CO₂. Após 7 dias, a monocamada foi raspada e 250µL da suspensão celular foi usado para análise por microscopia e extração de DNA de modo a normalizar os inóculos iniciais por qPCR. O volume remanescente (~14.750mL) foi incubado nas mesmas condições durante 24 horas, quando a monocamada foi raspada novamente, e uma purificação parcial das bactérias a partir de células Vero foi realizada utilizando uma agulha de pequeno calibre (calibre 27), conforme descrito por Ammerman et al. (2008). Os inóculos normalizados foram adicionados em frascos (25cm²), contendo uma monocamada confluyente de células Vero não infectadas. Cada frasco foi incubado a 28°C, sem CO₂, durante períodos de 1, 2, 24, 48 ou 72 horas. Antes da utilização, a monocamada foi lavada uma vez com meio fresco, raspada e subsequentemente utilizada para a análise por microscopia e a extração dos ácidos nucléicos.

5.2.2 Microscopia óptica

Na análise microscópica, 20µL da suspensão de células foram secadas em lâminas de vidro e, posteriormente, corados pelo método Giménez (1964), nos períodos de 24, 48 e 72 horas. A análise microscópica foi conduzida utilizando um microscópio óptico (Olympus DP72) com aumento de 1000x em óleo de imersão. As células viáveis que continham bactérias aderidas foram consideradas infectadas, enquanto que as células que não tinham, foram considerados como não infectadas.

5.2.3 Extração do RNA e DNA

A extração do DNA genômico (DNAg) foi realizada a partir de 100µL de suspensão de células infectadas utilizando ilustra RNAspin Mini RNA Isolation (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) de acordo com o Procedimento Operacional Padrão (POP) sem a adição de Dnase, seguindo a rotina do Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Virologia e Riquetsioses, Funed - Minas Gerais – Brasil. Amostras adicionais de DNAg a partir de células Vero infectadas com *R. parkeri* cepa AT#24, *R. rhipicephali* cepa HJ#5 e *Rickettsia amblyommii* cepa Ac37 foram obtidos usando o método de extração descrito acima e também através dos kits QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) e High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Alemanha) de modo a testar a qualidade do DNA extraído por qPCR (Fig. Suplementar S1).

A extração do RNA total também foi realizada a partir de 100µL de suspensão de células infectadas utilizando ilustra RNAspin Mini RNA Isolation (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). A extração do RNA total foi de acordo com as recomendações do fabricante, posteriormente, as amostras de RNA foram tratadas utilizando o Turbo DNA free kit (Ambion, Austin TX) de acordo com as recomendações do fabricante. Aproximadamente 500-600 ng de RNA livre de DNA contaminante, foram usados para a conversão em cDNA utilizando a SuperScrip III reverse transcriptase e random primer (Invitrogen, San Diego, CA), de acordo com as recomendações do fabricante.

As amostras de DNA e RNA foram quantificadas utilizando um espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suécia) e a integridade dos ácidos nucleicos foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1% (Fig. Suplementar S2).

5.2.4 PCR e Sequenciamento de DNA

Os iniciadores CS-78 / CS-323 e Rr190.70p / Rr190.602n que amplificam fragmentos dos genes *gltA* e *ompA*, respectivamente (Tab. 3.1) foram aplicados em reações de PCR e sequenciamento. As condições de PCR convencionais incluiu: 35 ciclos de 94°C durante 30 seg, 55°C durante 30 seg e 72°C durante 1 minuto. Os produtos de PCR foram purificados utilizando NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante.

Os produtos de PCR purificados foram sequenciados através de um sequenciador automático de DNA modelo ABI 3730xl (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA), utilizando o protocolo descrito por Otto et al. (2008). As sequências obtidas para cada gene foram analisadas e editadas no programa SEQMAN® do pacote de programas para Windows Lasergene DNASTAR™.

As sequências de nucleotídeos foram comparadas com as disponíveis no banco de dados do GenBank utilizando o algoritmo blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Para reconstrução filogenética foi feita uma análise por Neighbor-Joining (Tamura et al., 2011), utilizando modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros (K2P) (Kimura, 1980), com 1000 repetições e exclusão dos “gaps”.

5.2.5 Ensaio de qPCR

Reações de PCR quantitativo (qPCR) foram realizados utilizando amostras de DNA e RNA (cDNA) de células Vero infectados por *Rickettsia* com SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA) como recomendado pelo fabricante. Cada ensaio de qPCR continha 30ng de DNA ou cDNA, iniciadores senso e antissenso na concentração final de 0,4mM (Tabela 3.1). Foi utilizado uma desnaturação inicial de 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos: 95°C por 15 seg, 60°C por 1min. A amplificação, aquisição e análise dos dados foram realizados no 7500 fast real-time PCR System (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA).

Análise comparativa das cargas de *Rickettsia* spp. em células Vero foram realizadas utilizando os valores de Ct para cada tipo de amostra (cultura de células Vero e *Rickettsia*, 1, 2, 24, 48 e 72 horas pós-inoculação) usando o cálculo $2^{-\Delta\Delta C_T}$, em que $\Delta\Delta C_T = (C_{T\ ompA} - C_{T\ \beta\ actin})_{tempo\ x} - (C_{T\ ompA} - C_{T\ \beta\ actin})_{tempo\ 0}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Para o cálculo do $\Delta\Delta C_T$ a ser aplicado, as eficiências de

iniciadores foram determinadas com uma curva padrão desenvolvida utilizando DNA molde em concentrações de 5, 10, 30, 50 e 100 ng/μL.

A análise comparativa da expressão relativa dos genes *ompA* e *gltA* de *Rickettsia* spp. foi realizada utilizando os valores de Ct para genes alvo e de referência (cultura de células Vero infectada por *Rickettsia* em 1, 2 e 24 horas pós-inoculação), usando o cálculo $2^{-\Delta\Delta C_T}$, em que $\Delta\Delta C_T = (C_{T\ ompA} - C_{T\ gltA})_{tempo\ x} - (C_{T\ ompA} - C_{T\ gltA})_{tempo\ 0}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Para o cálculo do $\Delta\Delta C_T$, as eficiências de iniciadores foram determinadas com uma curva padrão desenvolvida utilizando cDNA molde em concentrações de 5, 10, 30 e 50 ng/μL.

5.2.6 Análise estatística

Os experimentos realizados neste trabalho foram conduzidas em duas ou três réplicas biológicas que foram analisadas em triplicatas. Utilizou-se o percentual de células infectadas como variável dependente, tempo e as espécies de *Rickettsia* como variáveis independentes. Foram avaliados as medidas de tendência central; distribuição e teste de diferenças significativas e comparações múltiplas (ANOVA); teste de diferença significativa mínima de Fishers (LSD/ least significance difference) entre os tratamentos foram desenvolvidos utilizando o programa Statgraphics Centurion XVI (Statpoint Technologies, 2006). Para todas as diferenças significativas empregou-se o intervalo de confiança de 95% e testado homocedasticidade de variância (Teste Levene's).

Tabela 3.1: Oligonucleotídeos utilizados para a realização dos ensaios de PCR e qPCR

Gene	Designação do iniciador	Sequência Nucleotídica (5' – 3')	Fragmento amplificado (pb)	Referência
<i>gltA</i> (PCR)	CS-78	GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT	401	Labruna et al. (2004b)
	CS-323	GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT		
<i>gltA</i> (qPCR)	CS-5	GAGAGAAAATTATATATCCAAATGTTGAT	147	Labruna et al. (2004b)
	CS-56	AGGGTCTTCGTGCATTTCTT		
<i>gltA</i> (qPCR)	RpCS877F	GGGGACCTGCTCACGGCGG	381	Regnery et al., (1991)
	RpCS1258R	ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA		
<i>ompA</i> (PCR)	Rr190.70p	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA	512	Regnery et al., (1991)
	Rr190.602n	AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT		
<i>ompA</i> (qPCR)	RR190.70F	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA	77	Eremeeva et al., (2003)
	RR147.147R	CTACTCAGCATTATCGCTGCG	97	Eremeeva et al., (2003)
	RR190.70F	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA		
	RR190.167	ACACCTGTAGCAACACCGAGT	154	Eremeeva et al., (2003)
	RR190.547F	CCTGCCGATAATTATACAGGTTTA		
	RR190.701	GTTCCGTTAATGGCAGCAT	113	Eremeeva et al., (2003)
	RR190.588F	GGAGCGAATGCTGCACTAAT		
	RR190.701R	GTTCCGTTAATGGCAGCATCT		
<i>ompB</i> (qPCR)	RF1396F	ACCCAGAACTCGAACTTTGGTG		Blair et al., (2004)
	RF1524R	CACACCCGCAGTATTACCGTT		
<i>β-actina</i> (qPCR)	ACTB-F	CCTGGCACCCAGCACAAAT	144	Ahn et al., (2008)
	ACTB-R	GGGCCGGACTCGTCATAC		
<i>Ribosomal protein L13A</i> (qPCR)	RPL13A-F	CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA	126	Ahn et al., (2008)
	RPL13A-R	TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA		
<i>60S ribosomal protein L32</i> (qPCR)	RPL32-F	CAACATTGGTTATGGAAGCAACA	80	Ahn et al., (2008)
	RPL32-R	TGACGTTGTGGACCAGGAACT		

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Confirmação das espécies

A fim de confirmar a identidade das espécies e estirpes utilizadas neste estudo, sequências parciais de genes *gltA* e *ompA* foram analisados pelo BLASTn. A respectiva porção de CS2 do gene *gltA* (401pb) foi 100% idênticas às sequências disponíveis para *R. rickettsii* cepa Taiacu (DQ115890), *R. parkeri* cepa AT#24

(EF102236) e *R. rhipicephali* cepa HJ#5 (DQ865206) (dados não mostrados). O mesmo aconteceu com o gene *ompA*, em que as sequências de *R. parkeri* cepa AT#24 e *R. rhipicephali* cepa HJ#5 foram 100% idênticos as sequências disponíveis no GenBank (EF102238 e DQ865208, respectivamente) (dados não mostrados). É digno de nota que não havia nenhuma sequência para o gene *ompA* disponível para *R. rickettsii* cepa Taiacu, portanto, a sequência de *ompA* gerada neste estudo foi 100% idêntica à *R. rickettsii* cepa R (Bitterroot) (U43804) e *R. rickettsii* cepa Sheila Smith (CP000848). A sequência parcial gerada do gene *ompA* de *R. rickettsii* cepa Taiacu foi depositada no GenBank com o número de acesso KU321853. Inferências filogenéticas utilizando as sequências para o gene *ompA* incluem claramente estas estirpes nos grupos *R. parkeri*, *R. rickettsii* e *R. rhipicephali*, respectivamente, com valores de bootstrap superiores a 71%, desta forma confirmando a identidade das linhagens bacterianas utilizadas neste estudo (Fig. 3.1).

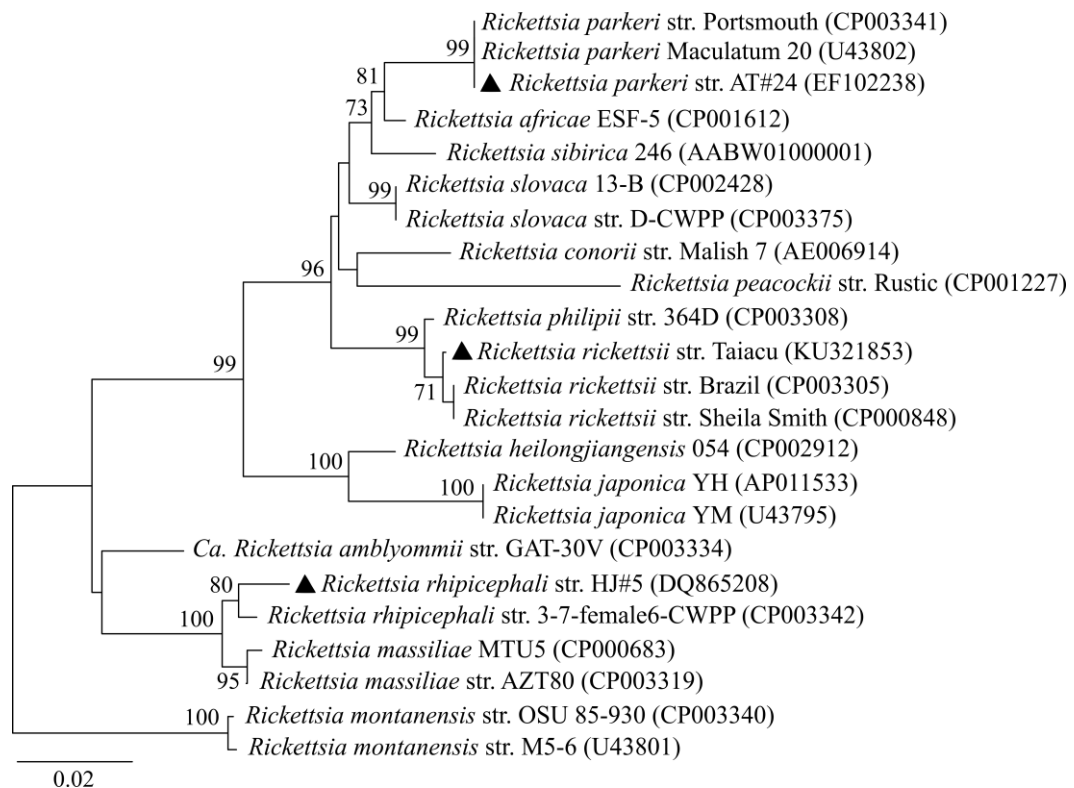


Figura 3.1: Inferência filogenética de *Rickettsia* sp. utilizando sequências do gene *ompA* construída pelo método Neighbor-Joining, utilizando o modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros com o uso do programa MEGA 5.2.2. Os triângulos pretos indicam sequências obtidas no presente trabalho. Os códigos de acesso do GenBank para as sequências são apresentadas entre parêntesis. Os suportes dos nós internos foram calculados usando análise de bootstrap com 1000 réplicas. Os valores de bootstrap inferiores a 70% não estão presentes.

5.3.2 Cinética de crescimento de *Rickettsia* spp.

As taxas de crescimento destas estirpes bacterianas foram inicialmente analisadas por microscopia óptica. Estruturas compatíveis com *Rickettsia* podem ser observadas em células Vero coradas com Gimenez (Fig. 3.2a). Para a contagem de células infectadas, foi considerado como células infectadas, apenas as que apresentavam bactérias internalizadas ou aderidas à célula, nos períodos de 24, 48 e 72 horas após a inoculação (Fig. 3.2). Vale a pena mencionar que as células viáveis foram determinadas pela integridade do núcleo.

Observamos que o número de células Vero infectadas com *R. rhipicephali* cepa HJ#5 foram mais elevados do que aos observados para *R. rickettsii* cepa Taiacu e *R. parkeri* cepa AT#24 nos períodos de 24, 48 e 72 horas após a inoculação (Fig. 3.2b). Nesta análise, observou-se maior diferença em 24 horas pós-inoculação, onde, aproximadamente, 1,3X e 2,3X mais células foram infectadas com *R. rhipicephali* cepa HJ#5 quando comparadas à *R. parkeri* cepa AT#24 e *R. rickettsii* cepa Taiacu, respectivamente. Estas diferenças foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Além disso, o maior percentual de células infectadas foram observados em 72 horas pós-inoculação com taxas de 98,92%, 91,48% e 99,82% referentes à *R. rickettsii* cepa Taiacu, *R. parkeri* cepa AT#24 e *R. rhipicephali* cepa HJ#5, respectivamente (Fig. 3.2b). Em nossas análises, foram observadas diferenças significativas entre as variáveis tempo e espécie ($p < 0,05$). Embora a variável tempo tenha o maior efeito estatisticamente significativo em comparação com variável espécie, o teste de comparação múltipla ANOVA demonstrou um efeito estatisticamente significativo de interação entre as variáveis tempo e espécie em relação ao percentual de infecção ($p < 0,05$) (Fig. 3.2b).

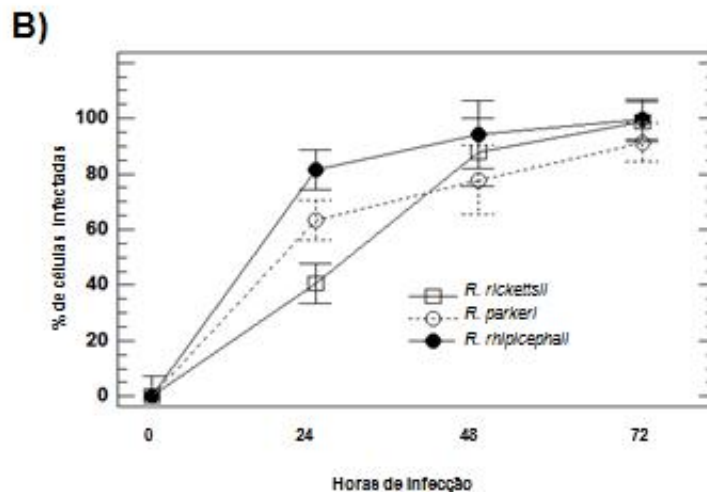
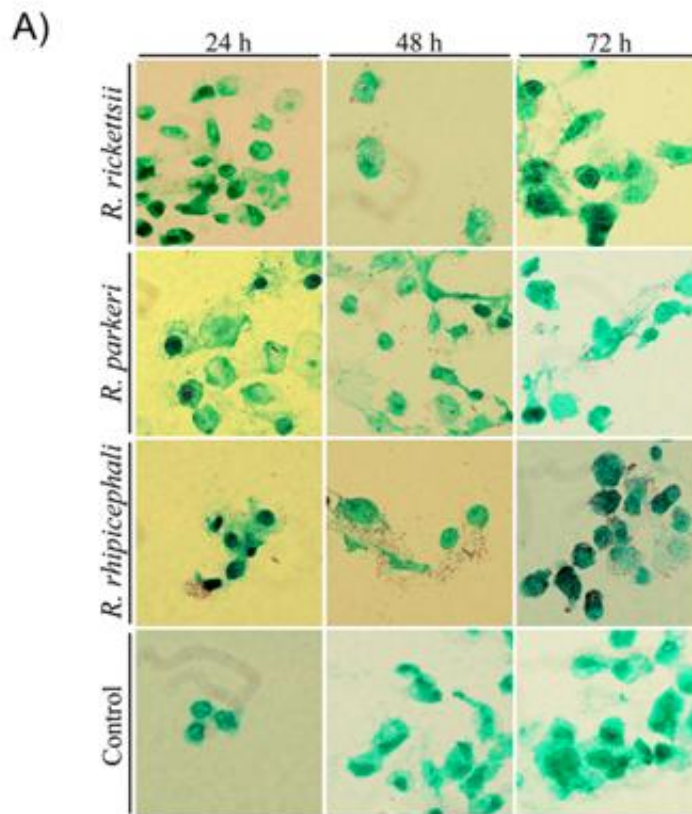


Figura 3.2: Visualização das células Vero infectadas com estirpes de *Rickettsia* sp. do Grupo Febre Maculosa. A) Fotomicrografias ilustram a presença de *Rickettsia* sp. (*Rickettsia rickettsii* cepa Taiacu, *Rickettsia parkeri* cepa AT#24 e *Rickettsia rhipicephali* cepa HJ#5) infectando células Vero e células Vero não infectadas (Control) coradas pelo método Giménez (1964) (aumento 1000x) nos períodos de 24, 48 e 72 horas pós-inoculação bacteriana. B) Percentagem de células Vero infectadas com *R. rickettsii* cepa Taiacu, *R. parkeri* cepa AT#24 e *R. rhipicephali* cepa HJ#5 nos períodos de 24, 48 e 72 horas após a inoculação. Os resultados foram estatisticamente significativos (Tempo $F_{3,18}=223,56$; $p=0,000$; Espécies $F_{2,18}=5,10$; $p=0,018$; Interação, $F_{6,18}=4,43$; $p=0,006$; 95%IC; Levene's = 0,07). O teste de comparação múltipla LSD mostrou que apenas no período de 24 horas a diferença entre as três espécies foram estatisticamente significativas.

Para a amplificação das amostras de DNA por qPCR foram testados quatro pares de iniciadores para o gene *ompA* que amplifica fragmento gênico de *Rickettsia* sp. do GFM e três pares de iniciadores para os genes eucarióticos β -actina e proteína ribossomal (L13a e L32) (Tabela 3.1). Nesta análise, o melhor par de iniciadores para *Rickettsia* (RR190.588F e RR190.701R) e para células eucarióticas (ACTB-F e ACTB-R) foram obtidos através da análise da curva de dissociação (Melt curve) (dados não mostrados). Para esta análise ser válida as eficiências de amplificação do gene alvo (*ompA*) e gene de referência (*β -actin*) devem ser aproximadamente iguais (Livak & Schmittgen, 2001). Para validar este método, preparou-se uma diluição em série de amostras de DNA obtidas a partir de células Vero infectadas e não infectadas por *Rickettsia* sp. As eficiências das reações de cada amostra de DNA e iniciadores foram avaliados através da inclinação da linha de regressão do C_T versus a série de diluição relativa (Fig. 3.3). A inclinação da linha de regressão do ΔC_T versus a diluição do DNA, encontravam-se dentro do intervalo de -0,1 a +0,1, confirmando a validade do método de quantificação relativa (Tabela Suplementar S1).

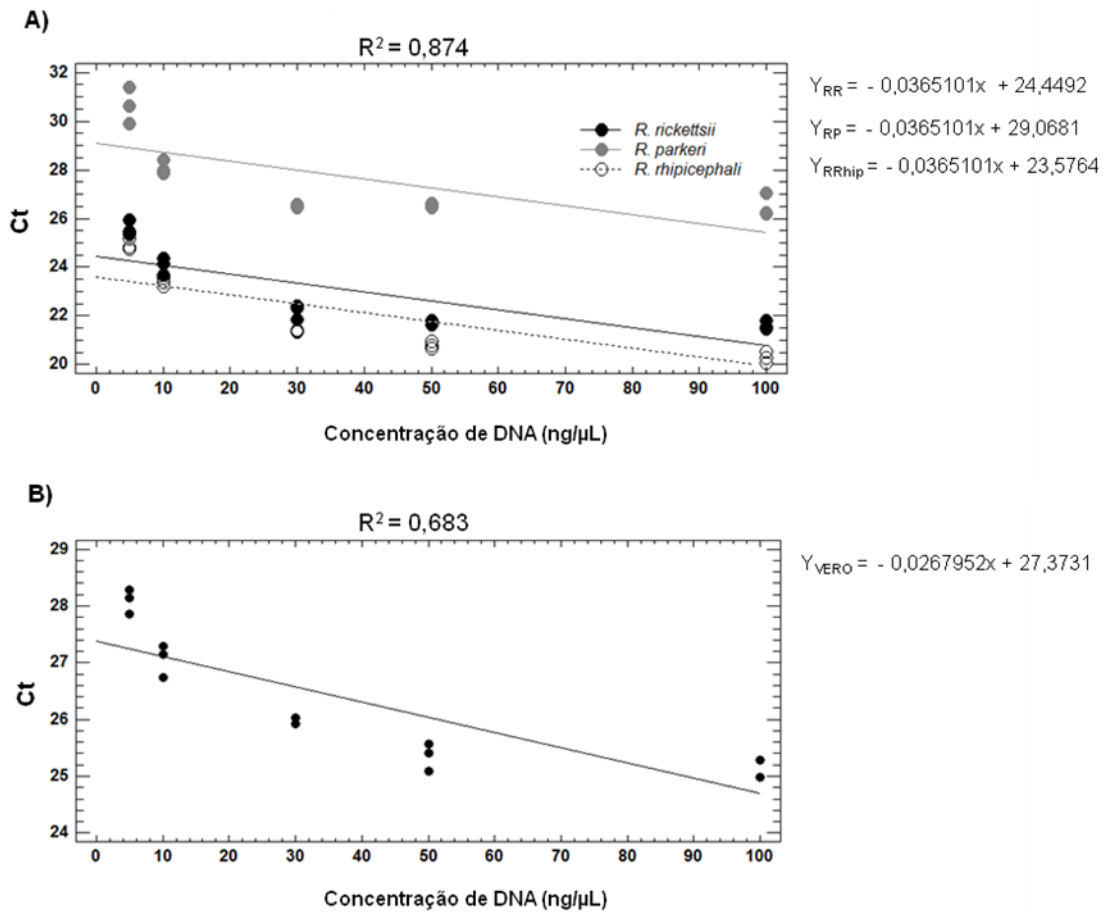


Figura 3.3: Curva padrão para análises de qPCR de diluições seriadas de DNA (5, 10, 30, 50 e 100 ng / μ) utilizando iniciadores para os genes *ompA* de *Rickettsia* sp. e β -actina para a célula Vero. A) oligonucleotídeos (190.588F-190.701R) para o gene *ompA* utilizado em amostras de DNA de *Rickettsia rickettsii* cepa Taiacu, *Rickettsia parkeri* cepa AT#24 e *Rickettsia rhipicephali* cepa HJ#5. B) Oligonucleotídeos (ACTB-F e ACTB-R) para o gene β -actina utilizado em amostras de DNA de células Vero. Cada ensaio de qPCR continha 30ng/ μ l e oligonucleotídeos na concentração final de 0,4mM. Ct: Threshold Cycle; RR: *R. rickettsii*; RP: *R. parkeri*; RRhip: *R. rhipicephali*.

A quantidade relativa de *Rickettsia* em células Vero foi determinada por análises por qPCR de *ompA*/ β -actina ao longo do período de infecção (1 a 72 horas). É evidente que a quantidade de *Rickettsia* infectando células Vero aumenta com decorrer do tempo de infecção alcançando as maiores cargas riquetsiais em 72 horas após a inoculação (Fig. 3.4). Utilizando os valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$, a *R. rickettsii* cepa Taiacu infectando células Vero aumentou aproximadamente 1,3X, 0,5X, 1,6X e 5,8X, já *R. parkeri* cepa AT#24 aumentou 1,6X, 0,8X, 2,3X e 2,5X, enquanto que *R. rhipicephali* cepa HJ#5 aumentou aproximadamente 8X, 4X, 3,8X e 17X ao longo do período de 72 horas (Fig. 3.4a). Nesta análise, *R. rhipicephali* cepa HJ#5 apresentou comportamento distinto, atingindo valores 4,7X, 8,5X, 3,1X e 2,8X maiores que *R.*

rickettsii cepa Taiaçu e 3,4X, 4,8X, 1,6X e 6,5X maiores que *R. parkeri* cepa AT#24 em 2, 24, 48 e 72 horas após a inoculação (Fig. 4b). As amostras de DNA utilizadas nestas análises foram extraídas utilizando o kit illustra RNAspin Mini RNA Isolation (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). Neste cenário, uma análise comparativa baseada no C_T utilizando mais dois outros kits de extração de DNA, não demonstrou nenhuma diferença estatisticamente significativa ($F_{2,51}=0,51$, $p= 0,603$, 95%IC, Levene's $p=0,451$), comprovando assim a qualidade e rendimento do DNA obtido através do kit illustra RNAspin Mini RNA Isolation (Suplementar Fig. S1).

Foram encontradas diferenças significativas ($F_{2,65}= 492,37$; $p=0,000$; 95%IC) na proporção de bactérias/Vero entre as três espécies utilizadas neste estudo, sendo muito mais evidente com 72 horas de infecção (Fig. 3.4a). Os ensaios de qPCR mostraram que *R. rhipicephali* cepa HJ#5 atingiu o ponto mais alto da população bacteriana em 2 a 72 horas após inoculação em comparação com as outras duas espécies ($p<0,05$). Além disto, o teste de comparação múltipla LSD mostrou que apenas no período de 72 horas, a diferença entre as três espécies foi estatisticamente significativa (Fig. 3.4a). A análise estatística identificou que ocorre uma interação entre as variáveis tempo e espécie de *Rickettsia*, com um efeito estatisticamente significativo sobre a proporção de riquetsia por células Vero com os períodos analisados ($p<0,05$) (Fig. 3.4a).

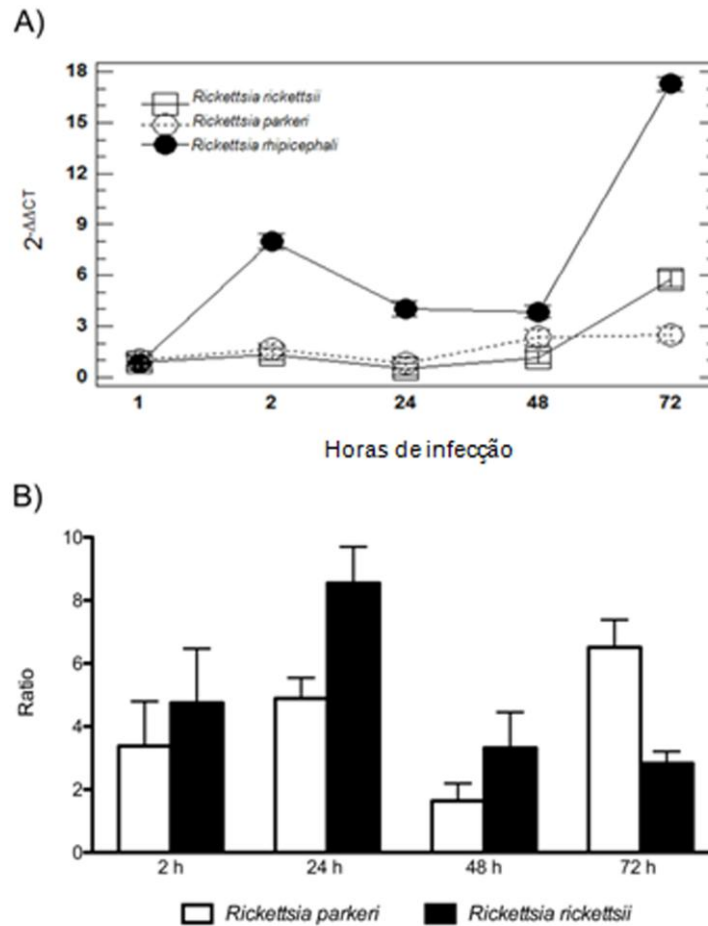


Figura 3.4: Quantificação relativa de estirpes de *Rickettsia* sp. do Grupo Febre Maculosa em células Vero. A) Análise relativa das taxas de crescimento de *Rickettsia rickettsii* cepa Taiacu, *Rickettsia parkeri* cepa AT#24 e *Rickettsia rhipicephali* cepa H#J5 infectando células Vero nos períodos de 1, 2, 24, 48 e 72 horas após a inoculação bacteriana. Existe diferença estatisticamente significativa entre as espécies (espécie *R. rhipicephali*, $F_{4,65} = 304,90$; $p = 0,000$; 95%IC) e ocorre interação entre as variáveis tempo e espécie (interação, $F_{8,65} = 114,50$; $p = 0,000$; 95%IC). B) Razão (ratio) comparativa da abundância de *R. rhipicephali* em células Vero com *R. rickettsii* e *R. parkeri*. As comparações com *R. parkeri* (barras brancas) e *R. rickettsii* (barras pretas) são apresentadas. As abundâncias de *Rickettsia* spp. foram determinadas com a quantidade relativa dos genes *ompA* (bacteriana) / *B-actina* (eucarioto) nos períodos de 2, 24, 48 e 72 horas.

Todos nossos dados em conjunto sugerem que *R. rhipicephali* cepa HJ#5 apresenta um comportamento diferente em cultivo de células Vero, mostrando altas taxas de crescimento e com maior rapidez ao longo do período de 72 horas, quando comparado à *R. rickettsii* cepa Taiacu e *R. parkeri* cepa AT#24, espécies sabidamente patogênicas.

5.3.3 Expressão gênica de *Rickettsia* spp.

Para avaliarmos a expressão gênica de *Rickettsia* spp., foram testados, iniciadores para o gene *ompA*, *ompB* e *gltA* (Tabela 3.1). Os melhores pares de iniciadores foram RR190.588F-RR190.701R e CS5-CS6 para os genes *ompA* e *gltA*, respectivamente, obtidos através da análise da curva de dissociação (Melt curve) (dados não mostrados). Vale ressaltar que os iniciadores utilizados para gene *ompB* apresentaram mais de um pico na análise da curva de dissociação, não sendo utilizados nas nossas análises de qPCR.

Para um método C_T comparativo ser válido as eficiências de amplificação do gene alvo (*ompA*) e gene de referência (*gltA*) devem ser aproximadamente iguais (Livak & Schmittgen, 2001). Para validação deste método, preparou-se uma diluição em série de amostras de RNA (cDNA) nas concentrações de 5, 10, 30 e 50 ng/ μ L, obtidas a partir de células Vero infectadas por *Rickettsia* sp. As eficiências das reações de cada amostra de cDNA e iniciadores foram avaliadas através da inclinação da linha de regressão do C_T versus a série de diluição relativa (Fig. 3.5). A inclinação da linha de regressão do ΔC_T versus a diluição do cDNA, encontravam-se dentro do intervalo de -0,1 a +0,1, confirmando a validade do método de expressão relativa (Tabela Suplementar S2).

A expressão relativa de *ompA* de *Rickettsia* sp. foi determinada por análises de qPCR nos períodos de 1, 2 e 24 horas após a inoculação. Utilizando os valores de $2^{-\Delta\Delta C_T}$, observamos que o nível de expressão de *ompA* de *R. rickettsii* cepa Taiacu infectando células Vero foi 2X maior em 2 horas após a inoculação do que em 1 hora. No entanto, 24 horas após a inoculação, o nível de expressão é similar ao observado para 1 hora. Além disso, a expressão de *ompA* de *R. parkeri* cepa AT#24 foi 0,085X menor em 2 horas em comparação com o período de 1 hora. Entretanto, 24 horas após a inoculação a expressão foi de 0,106X menor que ao observado para o período de 1 hora. Na expressão de *ompA* de *R. rhipicephali* cepa HJ#5 observa-se que foi 0,061X menor que o período de 1 hora, enquanto que, 24 horas após a inoculação, observa-se que a expressão foi 0,034X menor que o período de 1 hora (Fig. 3.6). Além disso, foram encontradas diferenças significativas ($F_{4,45}=13,93$; $P_v=0.0000$, IC95%; Levene's=0,048) na expressão de *ompA* de *R. rickettsii* no período de 2 e 24 horas em comparação com *R. parkeri* e *R. rhipicephali* ($p<0,05$) (Fig. 3.6).

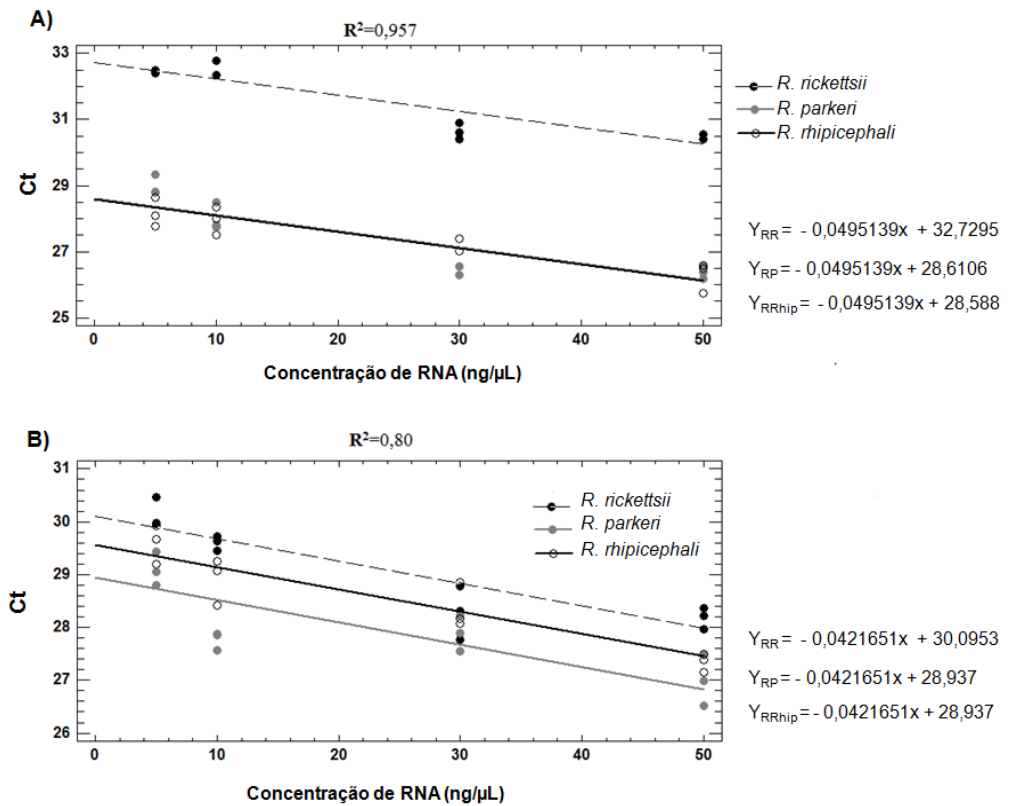


Figura 3.5: Curva padrão para análises de qPCR de diluições em série de RNA (cDNA) (5, 10, 30 e 50 ng/μL) utilizando iniciadores para os genes *gltA* e *ompA* para *Rickettsia* sp. A) oligonucleotídeos (CS5 e CS6) utilizados em amostras de RNA de *Rickettsia rickettsii* cepa Taiaçu, *Rickettsia parkeri* cepa AT#24 e *Rickettsia rhipicephali* cepa HJ#5. B) Oligonucleotídeos (190.588F-190.701R) para o gene *ompA* utilizado em amostras de RNA de *R. rickettsii* cepa Taiaçu, *R. parkeri* cepa AT#24 e *R. rhipicephali* cepa HJ#5. Cada ensaio de qPCR continha 30ng/μl e oligonucleotídeos na concentração final de 0,4mM. Ct: Threshold Cycle; RR: *R. rickettsii*; RP: *R. parkeri*; RRhip: *R. rhipicephali*.

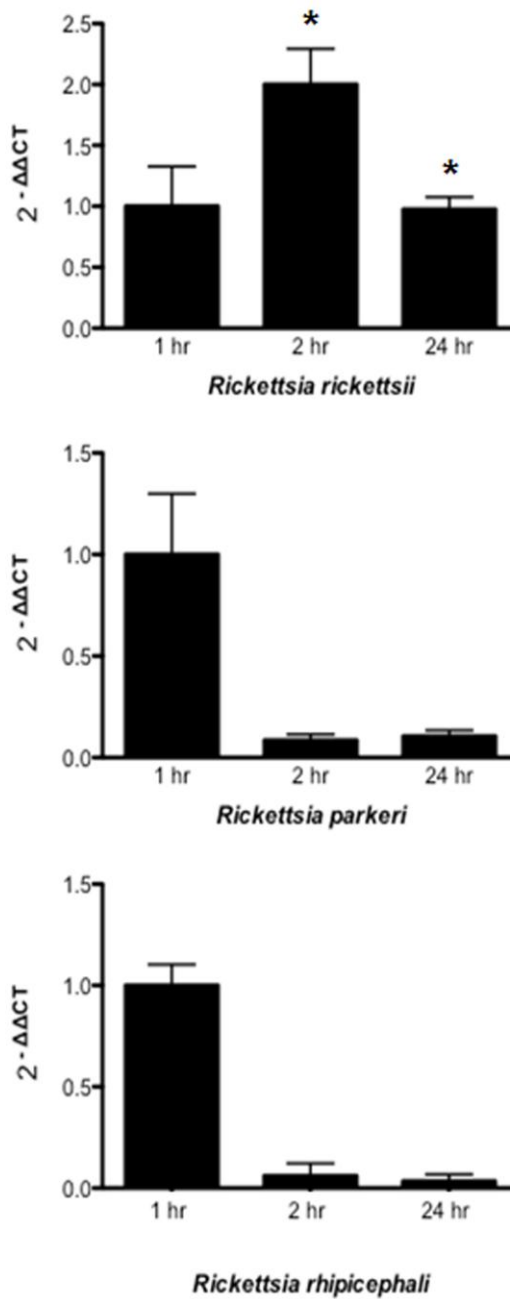


Figura 3.6. Expressão relativa de *Rickettsia rickettsii* cepa Taiaçú, *Rickettsia parkeri* cepa AT#24 e *Rickettsia rhipicephali* cepa H#J5, Grupo Febre Maculosa, infectando células Vero nos períodos de 1, 2, 24 horas após a inoculação bacteriana. * Diferença significativa ($p < 0,05$).

5.4 DISCUSSÃO

As *Rickettsia* spp. são bactérias intracelulares obrigatórias que podem ser cultivadas *in vitro* em uma ampla variedade de linhagens celulares. Neste âmbito, a linhagem de células Vero têm sido amplamente utilizada para o isolamento e propagação intracelular destas bactérias (Psaroulaki et al., 2003; Pinter & Labruna,

2006; Sousa et al., 2006; Silveira et al., 2007; Labruna et al. 2007; Boldis & Spitalska, 2010; Nilsson et al., 2010; Szabó et al., 2013; Monje et al., 2014). No presente estudo, utilizamos células de mamíferos para comparar o crescimento de *R. rhipicephali* com as patogênicas *R. rickettsii* e *R. parkeri*.

O processo de invasão de *Rickettsia conorii*, espécie do GFM, em células Vero ocorre em poucos minutos após a adesão da riquetsia na célula hospedeira, a fagocitose induzida é mediada pela entrada desta bactéria em células Vero, e a sua liberação intracitoplasmática subsequente ocorre por lise da membrana do fagossomo (Teyssiere et al., 1995). Neste trabalho, o processo de contato da *Rickettsia* com as células hospedeiras, bem como, a entrada nas células Vero não foram avaliados. No entanto, os dados quantitativos (relativo) demonstraram que em 2 horas, o número de *Rickettsia* infectando células Vero foi de 1,3X, 1,6X e 8X maior do que o período de 1 hora (após a inoculação) para *R. rickettsii*, *R. parkeri* e *R. rhipicephali*, respectivamente. Estes dados sugerem que o processo de adesão, entrada e escape para o citoplasma foram mais rápidos para *R. rhipicephali* em células Vero, proporcionando mais tempo para a divisão da célula bacteriana (Fig. 3.2b e 3.4a). Interessante que em 72 horas após a inoculação bacteriana, foi observado uma menor diferença da taxa de crescimento da infecção entre *R. rhipicephali* e *R. rickettsii* infectando células Vero (2,8X), enquanto que foi observada uma maior diferença da taxa de crescimento da infecção entre *R. rhipicephali* e *R. parkeri* (6,5X) (Fig. 3.4b).

Noriea et al. (2015) observaram que *R. rickettsii* cepa Sheila Smith atingiu o ponto mais alto de multiplicação bacteriana em células Vero em 72 horas após a inoculação. Enquanto que, Boldis et al. (2009) num estudo realizado com *Rickettsia slovaca*, observaram que esta riquetsia atingiu o ponto mais alto em 96 horas após a inoculação. Para uma melhor avaliação do comportamento de *R. rhipicephali* em comparação com *R. rickettsii* e *R. parkeri*, estudos adicionais usando um período de 14 dias, que compreende as fases de crescimento exponencial, estacionária e declínio, deverão ser realizados.

Neste estudo, todas as espécies de *Rickettsia* tiveram um decréscimo no crescimento no período de 24 horas em comparação com o período de 2 horas (Fig. 3.4a). De acordo com Winkler (1990), a internalização de *Rickettsia prowazekii* é linear durante pelo menos uma hora, no que diz respeito ao número de riquetsias adicionados à monocamada das células hospedeiras. Quando um número muito grande de riquetsias são adicionados às células hospedeiras, o número de riquetsias

internalizados pela monocamada reduz efetivamente, em vez de alcançar um patamar. Esta redução, provavelmente, resultada na destruição de algumas células da monocamada por atividade da fosfolipase (Winkler & Miller, 1982). Altas cargas de *R. prowazekii*, aparentemente, podem sobrecarregar a capacidade da célula hospedeira para internalizar os parasitas direcionando à lise da membrana celular do hospedeiro (Winkler & Miller, 1982). No entanto, estudos sobre o metabolismo de *Rickettsia* sp. do GFM no citoplasma de uma célula hospedeira são necessárias para melhor avaliação do verdadeiro equilíbrio metabólico destas bactérias.

A fim de serem patogênicos para mamíferos, bactérias transmitidas por carrapatos devem ser capazes de: (1) sobreviver no carrapato vetor; (2) ser transmitido durante alimentação do carrapato para mamíferos hospedeiros; (3) evitar ou subverter as respostas imunitárias do hospedeiro; (4) replicar em organismos hospedeiros; e (5) propagar-se a um novo hospedeiro. Neste cenário, *R. rhipicephali* apresenta algumas dessas características, esta bactéria tem sido frequentemente descrita infectando os carrapatos de gêneros diferentes, incluindo: *Rhipicephalus* sp., *Dermacentor* sp. e *Haemaphysalis juxtacocki* (Philip et al., 1981; Herrero et al., 1999; Labruna et al., 2007b; Hsu et al., 2011; Soares et al., 2015). Além disso, a inoculação direta de *R. rhipicephali* em cobaias resultou numa riquetsiose menos grave do que causada por *R. rickettsii* (Burgdorfer et al., 1978; Gage & Jerrells, 1992), indicando que *R. rhipicephali* é capaz de sobreviver dentro de um organismo hospedeiro, utilizando mecanismos para invadir e superar o sistema imune. Neste mesmo sentido, Norment & Burgdorfer (1984) detectaram sinais clínicos em cães quando os mesmos foram expostos a carrapatos infectados com *R. rhipicephali*. Curiosamente, *R. rhipicephali* apresentou um comportamento distinto *in vitro* ao infectar células Vero, alcançando uma taxa de crescimento mais elevada do que a observada para *R. rickettsii* e *R. parkeri* (Fig. 3.2 e 3.4).

É interessante mencionar que *R. rhipicephali* cepa HJ#5 foi isolado em cultura de células Vero em 2005 (Labruna et al., 2007). Neste estudo, a diferença de comportamento no crescimento de *R. rhipicephali* infectando células Vero, pode estar diretamente relacionada com a adaptação à linhagem de células hospedeiras, do que ao potencial patogênico desta bactéria, como observado para *R. prowazekii* ao infectar células de embrião de galinha (Wisseman & Waddell, 1975). Desta forma, a fim de considerar o *R. rhipicephali* como uma nova bactéria patogênica do GFM, estudos adicionais, incluindo diferentes espécies de carrapatos como potenciais vetores, possíveis hospedeiros vertebrados devem ser realizados. A

utilização de ferramentas mais sensíveis são necessárias para a uma melhor detecção de infecção natural de *R. rhipicephali* em tecidos animais e humanos. Visto que, esta espécie mostrou ser moderadamente patogênica para cobaias em condições laboratoriais (Burgdorfer et al., 1978).

Proteínas externas à superfície, como por exemplo OmpA, estão associados a adesão à célula hospedeira e a patogenicidade riquetsial (Blanc et al., 2005). Neste estudo, no período de 2 horas observamos que a expressão de OmpA foi de 2X, 0,085X e 0,061X em relação ao período de 1 hora (após a inoculação) para *R. rickettsii*, *R. parkeri* e *R. rhipicephali*, respectivamente (Fig. 3.6). Sugerindo que nas primeiras horas da infecção, o nível de expressão de ompA foi maior para *R. rickettsii*.

No entanto, baseados nos nossos resultados de expressão de ompA, nós podemos observar que o nível de expressão foi maior para *R. rickettsii*, o que é esperado, visto que, esta espécie é a bactéria mais patogênica transmitida por carrapatos, responsável por causar uma doença multisistêmica (Parola et al., 2005). Entretanto, o mesmo não foi observado para *R. parkeri* e *R. rhipicephali* que apresentaram níveis baixos de ompA. Nos dados de comparação de crescimento, observamos que *R. rhipicephali* apresentou um processo de entrada à célula hospedeira mais rápido do que as outras duas espécies. Interessantemente, riquetsias do GFM entram na célula hospedeira, replicam-se no citoplasma e utilizam a polimerização de actina para atingir as células vizinhas, desta forma, a expressão de ompA não seria tão importante.

Os dados de expressão gênica apresentandos neste trabalho são preliminares, visto que, para uma melhor avaliação da patogenicidade riquetsial em condições *in vitro*, bem como, os fatores determinantes de virulência, outros genes relacionados à infecção riquetsial, *ompB*, *sca2*, e *RickA* deverão ser analisados, abrangendo um período maior de infecção. Visto que, a adesão da riquetsia à célula hospedeira, provavelmente é mediada por várias proteínas (Renesto et al., 2006; Vellaiswamy et al., 2001).

Atualmente, diversos avanços na manipulação genética de *Rickettsia* spp. têm fornecido oportunidades para definir os determinantes de virulência destas bactérias. Sabe-se que alguns fatores são necessários para a virulência, como por exemplo *sca2* (Kleba et al., 2010), que pode ser interrompido sem causar qualquer efeito deletérico na replicação *in vitro*. É interessante a capacidade que cepas não virulentas tem de infectar, sem causar doença aparente. Ao mesmo tempo que pode

conferir a imunidade protetora, pode oferecer a possibilidade de cepas vacinais (Noriea et al., 2015).

Alguns membros do GFM nunca foram associadas causando doença em seres humanos e animais (Parola et al., 2013), no entanto, deve-se notar que algumas espécies patogênicas para os seres humanos foram inicialmente classificadas como não patogênicas ou de patogenicidade desconhecida. Este fato merece atenção, pois denota a possibilidade de acometimento humano. Claramente, vários fatores contribuem para virulência riquetsial. A habilidade contínua das espécies de *Rickettsia* sp. em modificarem-se geneticamente (Blanc et al., 2006; Gillespie et al., 2007), impulsiona a realização de novos estudos, a fim de identificar fatores que possam contribuir para uma melhor compreensão da patogênese das riquetsias.

5.5 ARQUIVOS SUPLEMENTARES

5.5.1 Figuras suplementares

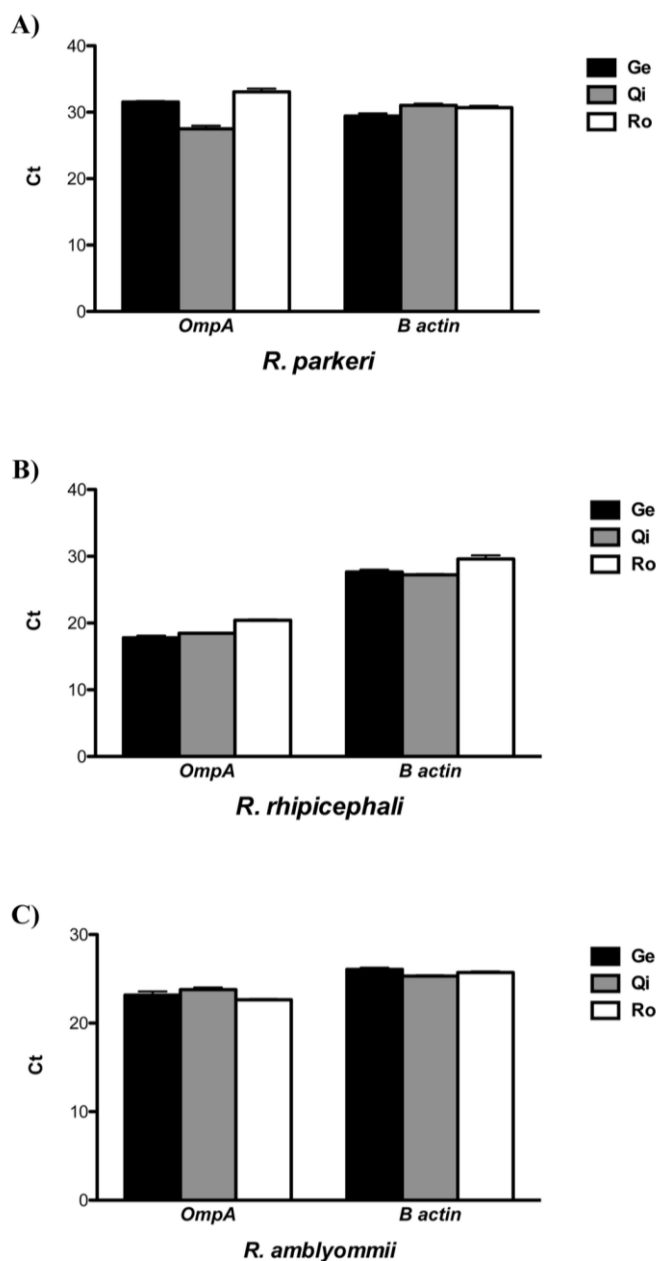


Figura Suplementar S1. Os valores de C_T (Cycle Threshold) para amostras de DNA de células Vero infectadas com (A) *Rickettsia parkeri* cepa AT#24, (B) *Rickettsia rhipicephali* cepa HJ#5 e (C) *Rickettsia amblyommii* cepa Ac37 utilizando oligonucleotídeos para o gene *ompA* para *Rickettsia* sp. e oligonucleotídeos para o gene β -*actina* para célula eucariótica. Todos os ensaios de qPCR continham 30ng/ μ l; os oligonucleotídeos foram utilizados na concentração final de 0,4mM. Ge: ilustra RNAspin Mini RNA Isolation kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) utilizado neste estudo; Qi: QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha); Ro: High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Alemanha). Cada valor representa a média \pm de erro padrão de três réplicas.

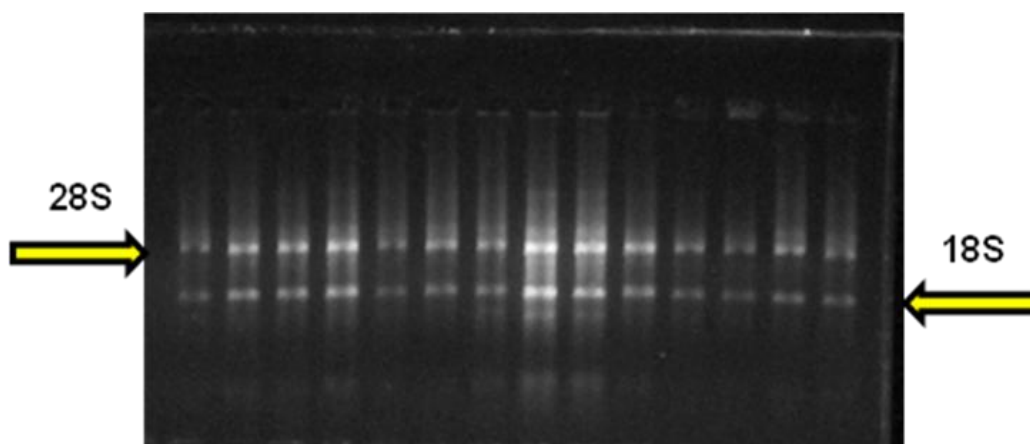


Figura Suplementar S2. Gel de agarose a 1% visando à verificação da viabilidade do RNA extraído das células Vero infectadas com *Rickettsia rickettsii* str. Taiacu, *Rickettsia parkeri* str AT#24e *Rickettsia rhipicephali* str HJ#5 utilizando o kit illustra RNAspin Mini RNA Isolation (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). Observam-se as bandas 28S e 18S, respectivamente.

5.5.2 Tabelas suplementares

Tabela Suplementar S1. Análise da inclinação da linha de regressão por qPCR

Template ^A	Inclinação do ΔC_T versus a diluição do DNA
<i>Rickettsia rickettsii</i> cepa Taiaçu	- 0,0086
<i>Rickettsia parkeri</i> cepa AT#24	- 0,0047
<i>Rickettsia rhipicephali</i> cepa HJ#5	- 0,0158

^ATemplate representa amostra de DNA de células Vero infectadas com *R. rickettsii* cepa Taiaçu, *R. parkeri* cepa AT#24 or *R. rhipicephali* cepa HJ#5.

Tabela Suplementar S2. Análise da inclinação da linha de regressão por qPCR

Template ^A	Inclinação do ΔC_T versus a diluição do cDNA
<i>Rickettsia rickettsii</i> cepa Taiaçu	0,0045
<i>Rickettsia parkeri</i> cepa AT#24	0,0328
<i>Rickettsia rhipicephali</i> cepa HJ#5	-0,0909

^ATemplate representa amostra de cDNA (RNA) de células Vero infectadas com *R. rickettsii* cepa Taiaçu, *R. parkeri* cepa AT#24 or *R. rhipicephali* cepa HJ#5.

6 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo permitem concluir que:

- Não foi possível diferenciar *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica de *R. sibirica*. Entretanto, foi possível diferenciá-la de *R. parkeri*.
- Foi realizado o isolamento de duas riquetsias: um isolado de *Rickettsia* sp. filogeneticamente próximo a *R. rickettsii* que foi obtido a partir de *R. sanguineus* e uma *Rickettsia* sp. pertencente ao grupo FM obtida do carrapato *A. ovale*.
- Os dados da cinética de crescimento mostrou que a estirpe *R. rhipicephali* apresentou um comportamento distinto, mostrando um crescimento mais rápido com elevadas taxas de infecção quando comparado as estirpes patogênicas *R. rickettsii* e *R. parkeri*.
- O nível de expressão de ompA foi maior para *R. rickettsii* em comparação com *R. parkeri* e *R. rhipicephali*, nas primeiras horas de infecção.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams JR, Schmidtman ET, Azad AF. Infection of colonized cat fleas *Ctenocephalides felis* (Bouché) with a *Rickettsia*-like microorganism. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 43: 400–9.

Ahn K, Huh J, Park S, Kim D, Ha H, Kim Y, Lee J, Chang K, Kim H. Selection of internal reference genes for SYBR green qRT-PCR studies of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) tissues. *BMC Mol Biol* 2008; 9 (78): 1–8.

Aljanabi SM, Martinez, I. Universal and rapid salt extraction of high genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acid Res* 1997; 25 (22): 4692–3.

Ammerman NC, Beier-Sexton M, Azad AF. Laboratory Maintenance of *Rickettsia rickettsii*. *Curr Protoc Microbiol* 2008; 3: 1–27.

Angerami RN, Resende MR, Feltrin AFC, Katz G, Nascimento EM, Stucchi RS, Silva LJ. Brazilian spotted fever. A case series from an endemic area in southeastern Brazil: clinical aspects. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1078: 252–4.

Apperson CS, Engber B, Nicholson WL, Mead DG, Engel J, Yabsley MJ, Dail, K, Johnson J, Watson DW. Tick-Borne Diseases in North Carolina: Is “*Rickettsia amblyommi*” a possible cause of Rickettsiosis Reported as Rocky Mountain Spotted Fever. *Vector-Borne and Zoon Dis* 2008; 8 (5): 597–606.

Azad AF, Beard CB. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. *Emerg Infect Dis* 1998; 4 (2): 179–86.

Azad AF, Radulovic S, Higgins JA, Noden BH, Troyer JM. Fleaborne Rickettsioses: ecologic considerations. *Emerg Infect Diseases* 1997; 3(3): 319–27.

Barbieri AR, Filho JM, Nieri-Bastos FA, Souza JC Jr, Szabó MP, Labruna MB. Epidemiology of *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest in a spotted fever-endemic area of southern Brazil. *Ticks Tick Borne Dis* 2014; 5 (6): 848–53.

Barros-Battesti DMB, Arzua M, Bechara GH. Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: um Guia Ilustrado para Identificação de Espécies. São Paulo/Brasil: Vox/ICTTD-3/Butantan; 2006.

Beninati T, Genchi C, Torina A, Caracappa S, Bandi C, Lo Nathan. Rickettsiae in Ixodid Ticks, Sicily. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(3): 509–11.

Bernardini ML, Mounier J, d’Hauteville H, Coquis-Rondon M, Sansonetti PJ. Identification of *icsA*, a plasmid locus of *Shigella flexneri* that governs bacterial intra- and intercellular spread through interaction with F-actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86 (10): 3867–71.

Billeter SA, Blanton HL, Little, S.E, Levy MG, Breitschwerdt EB. Detection of *Rickettsia Amblyommii* in association with a tick bite rash. Vector-Borne Zoo Dis 2007; 7(4): 607–10.

Billings AN, Yu XJ, Teel PD, Walker DH. Detection of a spotted fever group *Rickettsia* in *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in South Texas. J of Med Entomol 1998; 35 (4): 474–8.

Blair PJ, Jiang J, Schoeler GB, Moron C, Anaya E, Cespedes M, Cruz C, Felices V, Guevara C, Mendoza L, Villaseca P, Sumner JW, Richards AL, Olson JG. Characterization of spotted fever group rickettsiae in flea and tick specimens from northern Peru. J Clin Microbiol 2004; 42 (11):4961–7.

Blanc G, Ngwamidiba M, Ogata H, Fournier PE, Claverie JM, Raoult D. Molecular evolution of *Rickettsia* surface antigens: evidence of positive selection. Mol Biol Evol 2005; 22 (10): 2073–83.

Boldis V & Spitalska E. *Dermacentor marginatus* and *Ixodes ricinus* ticks versus L929 and Vero cell lines in *Rickettsia slovaca* life cycle evaluated by quantitative real time PCR. Exp Appl Acarol 2010; 50 (50): 353–9.

Boldis V, Strus J, Kocianová E, Tusek-Znidaric M, Stefanidesová K, Schwarzová K, Kudelová M, Sekeyová Z, Spitalská E. Life cycle of *Rickettsia slovaca* in L929 cell line studied by quantitative real-time PCR and transmission electron microscopy. FEMS Microbiol Lett 2009; 293 (1): 102–6.

Boostrom A, Beier MS, Macaluso JA, Macaluso KR, Sprenger D, Hayes J, Radulovic S, Azad AF. Geographic association of *Rickettsia felis*-infected opossums with human murine typhus, Texas. Emerg Infect Dis, 2002; 8: 549–54.

Brouqui P, Bacellar F, Baranton G, Birtles RJ, Bjoersdorff A, Blanco JR, Caruso G, Cinco M, Fournier PE, Francavilla E, Jensenius M, Kazar J, Laferl H, Lakos A, Lotric Furlan S, Maurin M, Oteo JA, Parola P, Perez-Eid C, Peter O, Postic D, Raoult D, Tellez A, Tselentis Y, Wilske B. Guideline for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. Clin Microbiol Infect, 2004, 10 (12): 1108–32.

Brundage RA, Smith GA, Camilli A, Theriot JA, Portnoy DA. Expression and phosphorylation of the *Listeria monocytogenes* ActA protein in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90 (24):11890–4.

Burgdorfer W, Brinton LP, Krynski WL, Philip RN. *Rickettsia rhipicephali*, a new spotted fever group rickettsia from the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. In: Kazar J, Ormsbee RA and Tarasevich IN. Proceedings of the 2nd

International Symposium on Rickettsiae and Rickettsial Diseases. Public House of Slovak Academy of Sciences. Bratislava: 1978. p. 307–316.

Burgdorfer, W. The hemolinf test. *Am J Trop Med Hyg* 1970; 19 (6): 1010-14.

Caetano RL, Bittencourt K, Voloch CM, Oliveira SV, Amorim M, Gazêta GS. 2015. *Rickettsia rickettsii* em *Rhipicephalus sanguineus* de duas Ecorregiões do Brasil. [Apresentação no I Simpósio Nacional e IV Simpósio Estadual de doenças Transmitidas por Carrapatos; 2015. Indaiatuba, Brasil].

Cardoso LD, Freitas RN, Mafra CL, Neves CV, Figueira FC, Labruna MB, Gennari SM, Walker DH, Galvão MA. Characterization of *Rickettsia* spp. circulating in a silent peri-urban focus for Brazilian spotted fever in Caratinga, Minas Gerais, Brazil. *Cad Saúde Publ* 2006; 22(3):495–501.

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* 2006; 55 (RR-4): 1–27.

Cardwell MM, Martinez JJ. The Sca2 autotransporter protein from *Rickettsia conorii* is sufficient to mediate adherence to and invasion of cultured mammalian cells. *Infect Immun* 2009; 77 (12): 5272-80.

Chan GY, Cardwell MM, Hermanas TM, Uchiyama R, Martinez JJ. Rickettsial outer-membrane protein B (rOmpB) mediates bacterial invasion through Ku70 in an actin, c-Cbl, clathrin and caveolin 2-dependent manner. *Cell Microbiol* 2009; 11 (4): 629–44.

Carlsson F, Brown EJ. Actin-based motility of intracellular bacteria, and polarized surface distribution of the bacterial effector molecules. *J Cell Physiol* 2006; 209 (2): 288–96.

Cohen EB, Auckland LD, Marra PP, Hamer SA. Avian migrants facilitate invasions of neotropical ticks and tick-borne pathogens into the United States. *Appl Environ Microbiol* 2015; 81(24): 8366–78.

Comer, M. K. Rocky mountain spotted fever. *Vet Clin North Am* 1991; 21(1): 27–44.

Conti-Díaz IA, Moraes-Filho J, Pacheco RC, Labruna MB. Serological evidence of *Rickettsia parkeri* as the etiological agent of rickettsiosis in Uruguay. *Rev Inst Med Trop* 2009; 51: 337–9.

Costa CM, Torrens AW, Barbosa PRA, Barrado JCS, Pinheiro MVB, Oliveira e Cruz DM, Máspero RC, Ferreira F, Vieira T, Garcia MHO, Lemos ERS. Investigação de óbitos por febre maculosa brasileira em funcionários de um abrigo para animais, na cidade do Rio de Janeiro-RJ, 2011. In: 12^aExpoepi: Mostra Nacional de Experiências Bem-Sucedidas em Epidemiologia, Prevenção e Controle de Doenç as; 2012; Brasília, Brasil: Anais/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde/MS, 2012. p.94.

Cox HR. Cultivation of rickettsia of Rocky Mountain spotted fever, typhus and Q-fever groups in the embryonic tissues of developing chicks. Science 1941; 94 (2444): 399–403.

Cunha CP, Fonseca AH, Rezende J, Rozental T, Favacho ARM, Barreira JD, Massard CL, Lemos ERS. First identification of natural infection of *Rickettsia rickettsii* in the *Rhipicephalus sanguineus* tick in the State of Rio de Janeiro. Pesq Vet Bras 2009; 29 (2): 105–8.

Dantas-Torres F, Figueredo LA, Brandão-Filho SP. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), o carrapato vermelho do cão, parasitando humanos no Brasil. Rev Soc Bras Med Trop 2006; 39 (1): 64–7.

Dantas-Torres F. Rocky Mountain spotted fever. Lancet Infect Dis 2007 Nov; 7 (11): 724–32.

Demma LJ, Traeger MS, Nicholson WL, Paddock CD, Blau DM, Eremeeva ME, Dasch GA, Levin ML, Singleton J Jr, Zaki SR, Cheek JE, Swerdlow DL, McQuiston JH. Rocky mountain spotted-fever from an unexpected tick vector in Arizona. N Engl J Med 2005 Aug; 353 (6): 587–94

Dias E & Martins AV. Spotted fever in Brazil. Am J Trop Med 1939; 19:103-8.

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: International Conference on Rickettsiae and Rickettsial Disases; 2005; Logro o, Espanha: Anais, 2005. p.123.

Dumler JS, Walker DH. Rocky Mountain spotted fever-changing ecology and persisting virulence. N Engl J Med 2005; 353 (6): 551–3.

Elfving K, Lukinius A, Nilsson K. Life cycle, growth characteristics and host cell response of *Rickettsia helvetica* in a Vero cell line. Exp Appl Acarol 2012; 56 (2):179–87.

Eremeeva M, Dasch GA .Rickettsiae. In: Lederberg J. Encyclopedia of Microbiology. 2^a ed. New York: Academic Press; 2000.p. 140–80.

Eremeeva ME, Dasch GA, Silverman DJ. Evaluation of a PCR Assay for Quantitation of *Rickettsia rickettsii* and Closely Related Spotted Fever Group Rickettsiae. J Clin Microbiol 2003; 41 (12): 5466–72.

Eremeeva ME, Dasch GA, Silverman DJ. Interaction of rickettsiae with eukaryotic cells: Adhesion, entry, intracellular growth, and host cell responses. Sub Cell Bioch 2000; 33: 479–516.

Eremeeva ME, Zambrani ML, Anaya L, Beati L, Karpathy SE, Santos-Silva MM, Salceda B, MacBeth D, Olguin H, Dasch GA, Aranda CA. *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus* Ticks, Mexicali, Mexico. J Med Entomol 2011; 48 (2): 418–21.

Evans DE, Martins JR, Guglielmone AA. 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 2000; 95 (4) 453–70.

Fournier PE, Belghazi L, Robert C, Elkarkouri K, Richards AL, Greub G, Collyn F, Ogawa M, Portillo, Oteo JA, Psaroulaki A, Bitam I, Raoult D. Variations of Plasmid Content in *Rickettsia felis*. PLoS ONE 2008; 3: e2289.

Fournier PE, Dumler JS, Greub G, Zhang J, Wu Y, Raoult D. Gene sequence-based criteria for identification of new rickettsia isolates and description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp. J Clin Microbiol 2003; 41 (12): 5456–65.

Gage KL, Jerrells TR. Demonstration and partial characterization of antigens of *Rickettsia rhipicephali* that induce cross-reactive cellular and humoral immune responses to *Rickettsia rickettsii*. Infect Immun 1992; 60 (12): 5099–106.

Gehrke FS, Gazeta GS, Souza ER, Ribeiro A, Marrelli M T, Schumaker TT. *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 Infec 2009; 15 (Suppl 2): 267–8.

Gillespie JJ, Beier MS, Rahman MS, Ammerman NC, Shallom JM, Purkayastha A, Sobral BS, Azad AF. Plasmids and Rickettsial Evolution: Insight from *Rickettsia felis*. PLoS ONE 2007; 2 (3): e266.

Gillespie JJ, Williams K, Shukla M, Snyder EE, Nordberg EK, et al. Rickettsia Phylogenomics: Unwinding the Intricacies of Obligate Intracellular. PLoS ONE 2008; 3 (4): e2018.

Giménez DF. Staining rickettsiae in yolk-sac cultures. *Stain Technology* 1964; 39: 135–40.

Goddard J. Experimental infection of lone star ticks, *Amblyomma americanum* (L.), with *Rickettsia parkeri* and exposure of guinea pigs to the agent. *J Med Entomol* 2003; 40 (5): 686–9.

Goddard J. Historical and recent evidence for close relationships among *Rickettsia parkeri*, *R. conorii*, *R. africae*, and *R. sibirica*: implications for rickettsial taxonomy. *J Vector Ecol* 2009; 34 (2): 238–42.

Goldberg MA. Actin-based motility of intracellular microbial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001; 65 (4): 595–626.

Gouin E, Egile C, Dehoux P, Villiers V, Adams J, Gertler F, Li R, Cossart P. The RickA protein of *Rickettsia conorii* activates the Arp2/3 complex. *Nature* 2004 Jan; 427 (6973):457–61.

Graves S, Stenos J. *Rickettsia honei* - A spotted fever group rickettsia on three continents. *Ann NY Acad Sci* 2003; 990: 62-6.

Greca H, Langoni H, Souza LC. Brazilian spotted fever: a reemergent zoonosis. *J Venom Anim Tox Includ Trop Dis* 2008; 14 (1): 3–18.

Greene CE, Breitschwerdt EB. Rocky Mountain spotted fever, murine typhus-like disease, rickettsialpox, typhus, and Q Fever. In: Greene, C. E. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 3rd ed., St Louis: Saunders Elsevier, 2006. p. 232–245.

Guedes E, Leite RC, Prata MCA, 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. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100: 841–5.

Guglielmone AA, Beati L, Barros-Battesti DM, Labruna MB, Nava S, Venzal J. M, Mangold AJ, Szabó MP, Martins JR, González-Acuña D, Estrada-Peña A. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. *Exp Appl Acarol* 2006; 40 (2): 83–100.

Guglielmone AA, Estrada-Peña A, Mangold A J, Barros-Battesti DM, Labruna M B, Martins JR, Venzal JM, Arzua M, Keirans JE. *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) and *Amblyomma ovale* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae): hosts, distribution and 16S rDNA sequences. *Vet Parasitol* 2003; 113 (3-4): 273–88.

Herrero C, Pelaz C, Martin-Bourgon C. Isolation of an agent of the spotted fever group rickettsiae from tick eggs in Madrid, Spain. *Epidemiol Infect* 1992 Jun; 108 (3): 555–7.

Horta MC, Labruna MB, Durigon EL, Schumaker TTS. Isolation and Cultivation of *Rickettsia felis* in the mosquito cell line C6/36. *App Environ Microb* 2006; 72 (2):1705–7.

Horta MC, Labruna MB, Pinter A, Linardi PM, Schumaker TTS. *Rickettsia* infection in five areas of the state of São Paulo. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007;102 (7): 793–801.

Horta MC, Labruna MB, SangioniLA, Vianna MCB, Gennari SM, et al. Prevalence of antibodies to Spotted Fever Group Rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian Spotted Fever-Endemic area in the State of São Paulo, Brazil: Serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group *Rickettsia*. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 71 (1): 93–7.

Horta MC, Pinter A, Cortez A, Soares RM, Gennari SM, Schumaker TTS, Labruna MB. *Rickettsia felis* (Rickettsiales:Rickettsiaceae) in *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae) in the State of São Paulo, Brazil. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2005; 57 (3): 321–325.

Horta MC, Scott FB, Correia TR, Fernandes JI, Richtzenhain LJ, Labruna MB. *Rickettsia felis* infection in cat fleas *Ctenocephalides felis felis*. *Brazilian. J Microbiol* 2010; 41 (3): 813–818.

Hsu YM, Lin CC, Chomel BB, Tsai KH, Wu WJ, Huang CG, Chang CC. Identification of *Rickettsia felis* in fleas but not ticks on stray cats and dogs and the evidence of *Rickettsia rhipicephali* only in adult stage of *Rhipicephalus sanguineus* and *Rhipicephalus haemaphysaloides*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2011 Dec; 34 (6): 513–518.

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 Immunol* 2003; 47 (11): 823–32.

Jeng RL, Goley ED, D'Alessio JA, Chaga OY, Svitkina TM, Borisy GG, Heinzen, RA, Welch MD. A *Rickettsia* WASP-like protein activates the Arp2/3 complex and mediates actin-based motility. *Cell Microbiol* 2004; 6 (8):761–9.

Kelly PJ. *Rickettsia africae* in the West Indies. *Emerg Infect Dis* 2006; 12 (2): 224–6.

Kelly PJ, Raoult D, Mason PR. Isolation of spotted fever group rickettsias from triturated ticks using a modification of the centrifugation-shell vial technique. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1991; 85 (3): 397–8.

Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980; 16 (2):111-20.

Kleba B, Clark TR, Lutter EI, Ellison DW, Hackstadt T. Disruption of the *Rickettsia rickettsii* Sca2 Autotransporter Inhibits Actin-Based Motility. *Infect Immun* 2010; 78 (5): 2240–7.

Kocks C, Gouin E, abouret M T, Berche P, Ohayon H, Cossart P. *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein. *Cell* 1992; 68 (3): 521–31.

Krawczak FS, Agostinho WC, Poloa G, Moraes-Filho J, Labruna MB. Comparative evaluation of *Amblyomma ovale* ticks infected and noninfected by *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest, the agent of an emerging rickettsiosis in Brazil. *Ticks Tick-borne Dis* 2016; 7 (3): 502–7.

Krawczak FS, Guztazaky AC, Muñoz-Leal S, Oliveira SV, Santos FCP, Angerami RN, Filho JM, Souza JC de Jr, Labruna MB. Primeira Detecção Molecular de Riquetsia em Humano no Estado de Santa Catarina, Brasil. [Apresentação no I Simpósio Nacional e IV Simpósio Estadual de *doenças Transmitidas por Carrapatos*; 2015. Indaiatuba, Brasil].

Labruna MB. Ecology of *Rickettsia* in South America. *Rickettsiology and Rickettsial Diseases-Fifth International Conference*. *Ann NY Acad Sci* 2009; 1166: 156–66.

Labruna MB. Epidemiologia da Febre Maculosa no Brasil e nas Américas. [Apresentação no Simpósio Brasileiro de Acarologia, 2006, Viçosa-MG, Brasil]. p.63-78.

Labruna MB, Camargo LM, Terrassini FA, Ferreira F, Schumaker TS, Camargo EP. Ticks (Acari: Ixodidae) from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. *Syst Appl Acarol* 2005; 10:17–32.

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*. *J Med Entomol* 2008; 45 (6):1156–9.

Labruna MB, Ogrzewalska M, Soares JF, Martins TF, Soares HS, Moraes-Filho J, Nieri-Bastos FA, Almeida AP, Pinter A. Experimental infection of *Amblyomma aureolatum* ticks with *Rickettsia rickettsii*. *Emerg Infect Diseases* 2011; 17 (5): 829–34.

Labruna MB, Pacheco RC, Ataliba AC, Szabó MPJ. Human parasitism by the capybara tick, *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae) in Brazil. *Entomol. News* 2007a; 118 (1): 77–80.

Labruna MB, Pacheco RC, Richtzenhain LJ, Szabo, Matias PJ. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* from *Haemaphysalis juxtakochi* Ticks in the State of São Paulo, Brazil. *Appl Environ Microbiol* 2007b; 73 (3): 869–73.

Labruna MB, Pereira MC. Carrapato em cães no Brasil. *Clin Vet* 2001; 6 (30): 24–32.

Labruna MB, Whitworth T, Bouyer DH, McBride J, Camargo LM, Camargo EP, Popov V, Walker DH. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the State of Rondônia, Western Amazon, Brazil. *J Med Entomol* 2004a; 41: 1073–81.

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. *J Clin Microbiol* 2004b; 42 (1): 90-8.

Lemos ERS. Rickettsial diseases in Brazil. *Virus Rev Res* 2002; 7 (1): 7-16.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method. *Methods* 2001; 25 (4): 402-8.

Londoño AF, Díaz FJ, Valbuena G, Gazi M, Labruna MB, Hidalgo M, Mattar S, Contreras V, Rodas JD. Infection of *Amblyomma ovale* by *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest, Colombia. *Ticks Tick Borne Dis* 2014; 5 (6): 672-5.

Lopes MG, Junior JM, Foster RJ, Harmsen BJ, Sanchez E, Martins TF, Quigley H, Marcili A, Labruna MB. Ticks and rickettsiae from wildlife in Belize, Central America. *Parasit. Vectors* 2016; 9: 62.

Lorusso V, Gruszka KA, Majekodunmi A, Igweh A, Welburn S, Picozzi K. *Rickettsia africae* in *Amblyomma variegatum* ticks, Uganda and Nigeria. *Emerg Infect Dis* 2013; 19 (10): 1705-07.

Márquez FJ, Muniain MA, Pérez JM, Pachón J. Presence of *Rickettsia felis* in the cat flea from southwestern Europe. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 89-91.

Medeiros AP, Souza AP, De Moura AB, Lavina MS, Bellato V, et al. Spotted fever group *Rickettsia* infecting ticks (Acari: Ixodidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011; 106 (8): 926-30.

Mediannikov O, Aubadie-Ladrix M, Raoult D. *Candidatus Rickettsia senegalensis* in cat fleas in Senegal. *NMNI* 2015; 3: 24–8.

Moerbeck L, Vizzoni VF, Duarte NFH, Coelho GCB, Oliveira SV, Amorim M, Gazêta GS. *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica infectando *Amblyomma nodosum* em brejos de altitude do nordeste, área endêmica para Febre Maculosa. [Apresentação no I Simpósio Nacional e IV Simpósio Estadual de doenças Transmitidas por Carrapatos; 2015. Indaiatuba, Brasil].

Monje LD, Nava S, Eberhardt AT, Correa AI, Guglielmone AA, Beldomenico PM. Molecular detection of the human pathogenic *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest in *Amblyomma dubitatum* ticks from Argentina. Vector Borne Zoonotic Dis 2015; 15: 167-9.

Moraes-Filho J, Pinter A, Pacheco RC, Gutmann TB, Barbosa SO, Gonzáles MA, Muraro MA, Cecílio SR, Labruna MB. New epidemiological data on Brazilian spotted fever in an endemic area of the State of Sao Paulo, Brazil. Vector Borne Zoonotic Dis 2009; 9 (1): 73-8.

Moerbeck L, Vizzoni VF, Machado-Ferreira E, Cavalcante RC, Oliveira SV, Soares CA, Amorim M, Gazêta GS. *Rickettsia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Vector Biodiversity in High Altitude Atlantic Forest Fragments Within a Semiarid Climate: A New Endemic Area of Spotted-Fever in Brazil. J Med Entomol 2016.

Moura-Martiniano NO, Machado-Ferreira E, Cardoso KM, Gehrke FS, Amorim M, Fogaça AC, Soares CAG, Gazêta GS, Schumaker TTS. *Rickettsia* and Vector Biodiversity of Spotted Fever Focus, Atlantic Rain Forest Biome, Brazil. Emerg Infect Dis 2014; 20 (3): 498-500.

Nava S, Elshenawy Y, Eremeeva MA, Mastropaolo M, Paddock CD. *Rickettsia parkeri* in Argentina. Emerg Infect Dis 2008; 14 (12): 1894-7.

Nava S, Venzal JM, Labruna MB, Mastropaolo M, Gonzáles EM, Mangold AJ, Guglielmone AA. Hosts, distribution and genetic divergence (16S rDNA) of *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae). Exp Appl Acarol 2010; 51 (4): 335-51.

Niebylski ML, Peacock MG, Schwan TG. Lethal effect of *Rickettsia rickettsii* on its tick vector (*Dermacentor andersoni*). Appl Environ Microbiol 1999; 65 (2): 773-8.

Nilsson K, Elfving K, Pålsson C. *Rickettsia helvetica* in Patient with Meningitis, Sweden, 2006. Emerg Infect Dis 2010 Mar; 16 (3): 490-2.

Noriea NF, Clark TR, Hackstadt T. Targeted knockout of the *Rickettsia rickettsii* OmpA surface antigen does not diminish virulence in a mammalian model system. MBio 2015 Mar; 6 (2): e00323-15.

Norment BR, Burgdorfer W. Susceptibility and reservoir potential of the dog to spotted fever-group rickettsiae. Am J Vet Res 1984 Sep; 45 (9): 1706-10.

Nunes EC, Vizzoni VF, Navarro DL, Iani FC, Durães LS, Daemon E, Soares CA, Gazeta GS. *Rickettsia amblyommii* infecting *Amblyomma sculptum* in endemic spotted fever area from southeastern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2015; 110 (8): 1058-61.

Nunes EC, Vizzoni VF, Navarro DL, Iani FC, Durães LS, Daemon E, Soares CA, Gazeta GS. *Rickettsia amblyommii* infecting *Amblyomma sculptum* in endemic spotted fever area from southeastern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2015; 11: 1058-61.

Ogrzewalska M, Saraiva DG, Moraes-Filho J, Martins TF, Costa FB, Pinter A, Labruna MB. Epidemiology of Brazilian spotted fever in the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. Parasitology 2012; 139 (10): 1283–300.

Oliveira RP, Galvão MAM, Mafra CL, Chamone CB, Calic SB, et al. *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides* spp. fleas, Brazil. Emerg Infect Dis 2002; 8 (3): 317-9.

Oteo JA, Portillo A, Portero F, Zavala-Castro J, Venzal JM, Labruna MB. *Candidatus Rickettsia aseboensis* and *Wolbachia* spp. in *Ctenocephalides felis* and *Pulex irritans* fleas removed from dogs in Ecuador. Parasit Vectors 2014; 30 (7):455.

Otto TD, Vasconcellos EA, Gomes LHF, Moreira AS, Degrave WM, Mendonça-Lima L, Alves-Ferreira M. ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. Genet Mol Res 2008; 7: 861-71.

Pachas P, Moron C, Hoyos A. *Rickettsia felis* indentified in *Ctenocephalides canis* fleas from the Peruvian Andes. In: American Society for Rickettsiology - *Bartonella* as an emerging pathogen group – 2001, Joint Conference, Big Sky, Montana, USA, 2001.

Pacheco RC, Horta MC, Pinter A, Moraes-Filho J, Martins TF, Nardi MS, Souza SSAL, Souza CE, Szabó MPJ, Richtzenhain LJ, Labruna MB. Pesquisa de *Rickettsia* spp em carrapatos *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* no Estado de São Paulo. Ver Soc Bras Med Trop 2009; 42 (3): 351-3.

Pacheco RC, Moraes-Filho J, Guedes E, Silveira I, Richtzenhain LJ, Leite RC, Labruna MB. Rickettsial infection of dogs, horses and ticks in Juiz de Fora, southeastern Brazil, and isolation of *Rickettsia rickettsii* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks. Med Vet Entomol 2011; 25 (2): 148–55.

Pacheco RC, Venzal JM, Richtzenhain LJ, Labruna MB. *Rickettsia parkeri* in Uruguay. Emerg Infect Dis 2006; 12 (11): 1804–5.

Paddock CD. *Rickettsia parkeri* as a paradigm for multiple causes of tick-borne spotted fever in the western hemisphere. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1063: 315–26.

Paddock CD, Brenner O, Vaid C, Boyd DB, Berg JM, et al. Short report: concurrent Rocky Mountain spotted fever in a dog and its owner. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66 (2): 197–9.

Paddock CD, Fernandez S, Echenique GA, Sumner JW, Reeves WK, Zaki SR, Remondegui CE. Rocky mountain spotted fever in Argentina. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 78 (4): 687–92.

Paddock CD, Sumner JW, Comer JA, Zaki SR, Goldsmith CS, Goddard J, McLellan SL, Tamminga CL, Ohi CA. *Rickettsia parkeri*: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. *Clin. Infect Dis* 2004; 38 (6): 805–11.

Parker RR, Kohls GM, Cox GW, Davis GE. Observations on an infectious agent from *Amblyomma maculatum*. *Public Health Rep* 1939; 54: 1482–4.

Parola P, Davoust B, Raoult D. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. *Vet Res* 2005; 36 (3): 469–92.

Parola P, Labruna MB, Raoult D. Tick-Borne Rickettsioses in America: Unanswered Questions and Emerging Diseases. *Curr Infect Dis Rep* 2009; 11 (1): 40–50.

Parola P, Paddock CD, Raoult D. Tickborne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin Microbiol Ver* 2005; 18 (4): 719–56.

Parola P, Paddock CD, Socolovschi C, Labruna MB, Mediannikov O, Kernif T, Abdad MY, Stenos J, Bitam I, Fournier PE, Raoult D. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin Microbiol Rev* 2013; 26 (4): 657–702.

Parola P, Sanogo OY, Lerdthusnee K, Zeaiter Z, Chauvancy G, Gonzalez JP, Miller RS, Telford III SR, Wongsrichanalai C, Raoult D. Identification of *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. in fleas from the Thai-Myanmar border. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 990:173–81.

Pereira MC, Szabó MPJ, Bechara GH, Matushima ER, Duarte JMB, Rechav Y, Fielden L, Keirans JE. Ticks on wild animals from the Pantanal region of Brazil. *J Med Entomol* 2000; 37 (6): 979–83.

Perez CA, Almeida AF, Almeida A, Carvalho VHB, Balestrin DC, Guimarães M S, Costa JC, Ramos LA, Arruda-Santos AD, Máximo-Espíndola CP, Barros-Battesti

DM. Carrapatos do gênero *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) e suas relações com hospedeiros em área endêmica para febre maculosa no Estado de São Paulo. Rev Bras Parasit Vet 2008; 17 (4): 210–7.

Philip RN, Casper EA, Burgdorfer W, Gerloff RK, Hugues LE, Bell EJ. Serologic typing of rickettsiae of the spotted fever group by micro-immunofluorescence. J Immunol 1978; 121: 1961–8.

Philip RN, Casper EA. Serotypes of spotted fever group rickettsiae isolated from *Dermacentor andersoni* (Stiles) ticks in western Montana. Am J Trop Med Hyg 1981 Jan; 30 (1): 230–8.

Pinter A, Dias RA, Gennari SM, Labruna MB. Study of the seasonal dynamics, life cycle, and host specificity of *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae). J Med Entomol 2004; 41 (3): 324–332.

Pinter A, Labruna MB. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. Ann NY Acad Sci 2006; 1078: 523–9.

Piranda EM, Faccini JLH, Pinter A, Pacheco RC, Cançado PHD, Labruna MB. Experimental infection of *Rhipicephalus sanguineus* ticks with the bacterium *Rickettsia rickettsii*, using experimentally infected dogs. Vector Borne Zoonotic Dis 2011; 11(1): 29–36.

Plank SJ, Teixeira RS, Milanesi ML. Febre maculosa em Salvador: descrição de um caso. Rev Med 1979; 25: 330–4.

Psaroulaki A, Spyridaki I, Ioannidis A, Babalis T, Gikas A and Tselentis Y. First Isolation and Identification of *Rickettsia conorii* from Ticks Collected in the Region of Fokida in Central Greece. J Clin Microbiol 2003; 41 (7): 3317–9.

Raoult D. A New Rickettsial Disease in the United States. Clin Infect Dis 2004; 38 (6): 812–3.

Raoult D, Fournier PE, Abboud P, Caron F. First documented human *Rickettsia aeschlimannii* infection. Emerg Infect Dis 2002; 8 (7): 748-749.

Raoult D, La-Scola B, Enea M, Fournier PE, Roux V, Fenollar F, Galvão MA M, Lamballerie XD. A flea-associated *Rickettsia* pathogenic for humans. Emerg Infect Dis 2001; 7 (1): 73–81.

Raoult D, Paddock CD. *Rickettsia parkeri* infection and other spotted fevers in the United States. N Engl J Med 2005; 353 (6): 626–7.

Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. Clin Microbiol Rev 1997; 10 (4): 694–719.

Regnery RL, Spruill CL, Plikaytis BD. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *J Bacteriol* 1991; 173 (5): 1576–89.

Renesto P, Samson L, Ogata H, Azza S, Fourquet P, Gorvel JP, Heinzen RA, Raoult D. Identification of two putative rickettsial adhesins by proteomic analysis. *Res Microbiol* 2006; 157 (7):605–12.

Richter J, Fournier PE, Petridou J, Haussinger D, Raoult D. *Rickettsia felis* infection acquired in Europe and documented by Polymerase Chain Reaction. *Emerg Infect Dis* 2002; 8 (2): 207–8.

Rolain JM, Bourry O, Davoust B, Raoult D. *Bartonella Quintana* and *Rickettsia felis* in Gabon. *Emerg Infect Dis* 2005; 11 (11): 1742–4.

Rolain J-M, Stuhl L, Maurin M, D. Raoult. Evaluation of antibiotic susceptibilities of three rickettsial species including *Rickettsia felis* by a quantitative PCR DNA assay. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46 (9): 2747–51.

Romer Y, Nava S, Govedic F, Cicuttin G, Denison AM, Singleton J, Kelly AJ, Kato CY, Paddock CD. *Rickettsia parkeri* rickettsiosis in different ecological regions of Argentina and its association with *Amblyomma tigrinum* as a potential vector. *Am J Trop Med Hyg* 2014; 91 (6): 1156–60.

Romer Y, Seijo A, Crudo F, Nicholson WL, Varela-Stokes A, Lash RR, Paddock C. *Rickettsia parkeri* rickettsiosis, Argentina. *Emerg. Infect Dis* 2011; 17 (7): 1169–73.

Romer Y, Seijo AC, Crudo F, Nicholson WL, Varela-Stokes A, Lash RR, Paddock CD, 2011. *Rickettsia parkeri* rickettsiosis, Argentina. *Emerg Infect Dis* 17: 1169–73.

Roux V & Raoult D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (OmpB). *Int J Syst Evol Microbiol* 2000 50 (4): 1449–55.

Roux V, Rydkina E, Ereemeeva M, Raoult D. Citrate Synthase Gene Comparison, a New Tool for Phylogenetic analysis, and its application for the *Rickettsiae*. *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47 (2): 252–61.

Rudakov NV, Shpynov SN, Samoilenko IE, Tankibae MA. Ecology and epidemiology of spotted fever group rickettsia and new data from their study in Russia and Kazakhstan. *Ann NY Acad Sci* 2003; 990: 12–24.

Sabatini GS, Pinter A, Nieri-Bastos FA, Marcili A, Labruna MB, Survey of ticks (Acari: Ixodidae) and their rickettsia in an Atlantic rain forest reserve in the State of São Paulo, Brazil. *J Med Entomol* 2010; 47 (5): 913–6.

Sangioni LA, Horta MC, Vianna MCB, Gennari SM, Soares RM, Galvão MAM, Schumaker TTS, Ferreira F, Vidotto O, Labruna MB. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. *Emerg Infect Dis* 2005; 11 (2): 265–70.

Saito TB, Cunha-Filho NA, Pacheco RC. Canine infection by Rickettsiae and Ehrlichiae in southern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 79 (1): 102–8.

Schriefer ME, Sacchi-Jr JB, Dumler JS, Bullen MG, Azad AF. Identification of a novel Rickettsial infection in a patient diagnosed with murine typhus. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 949–54.

Sekeyova Z, Roux V, Raoult D. Phylogeny of *Rickettsia* spp. inferred by comparing sequences of 'geneD', which encodes an intracytoplasmic protein. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51(4):1353–60.

Serra-Freire NM, Sena LMM, Borsoi ABP. Parasitismo Humano por Carrapatos na Mata Atlântica, Rio de Janeiro, Brasil. *EntomoBrasilis* 2011; 4 (2): 67–72.

Silva LJ, Galvão MAM. Epidemiologia das rickettsioses do gênero *Rickettsia* no Brasil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2004; 13 (1): 197–8.

Silva N, Eremeeva ME, Rozental T, Ribeiro GS, Paddock CD, Ramos EAG, Favacho ARM, Reis MG, Dasch GA, Lemos ERS, Ko AI. Eschar-associated Spotted Fever Rickettsiosis, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2011 (2); 17: 27–8.

Silveira I, Pacheco RC, Szabó MPJ, Ramos HGC, Labruna MB. First report of *Rickettsia parkeri* in Brazil. *Emerg Infect Dis* 2007; 13 (7): 1111–3.

Soares HS, Barbieri AR, Martins TF, Minervino AH, de Lima JT, Marcili A, Gennari SM, Labruna MB. Ticks and rickettsial infection in the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. *Exp App Acarol* 2015; 65 (1): 125–40.

Soares JF, Soares HS, Barbieri AM, Labruna MB. Experimental infection of the tick *Amblyomma cajennense* with the bacterium *Rickettsia rickettsii*, the agent of Rocky Mountain Spotted Fever. *Med Vet Entomol* 2012; 26 (2): 139–51.

Sousa R, Barata C, Vitorino L, Santos-Silva M, Carrapato Carlos, Torgal J, Walker D, Bacellar F. *Rickettsia sibirica* Isolation from a Patient and Detection in Ticks, Portugal. *Emerg Infect Dis* 2006; 12 (7): 1103–8.

Sousa R, Santos-Silva M, Santos AS, Barros SC, Torgal J, Walker DH, Bacellar F. *Rickettsia conorii* Israeli Tick Typhus Strain Isolated from *Rhipicephalus sanguineus* Ticks in Portugal. Vector Borne Zoonotic Dis. 2007; 7 (3):444-7.

Souza SSAL, Souza CE, Neto EJ, Prado AP. Dinâmica sazonal de carrapatos (Acari: Ixodidae) na mata ciliar de uma região endêmica para febre maculosa na região de Campinas, São Paulo, Brasil. Ciência Rural 2006 May; 36 (3): 887–91

Spolidorio MG, Labruna MB, Mantovani E, Brandao PE, Richtzenhain LJ, Yoshinari NH. Novel spotted Fever group rickettsiosis, Brazil. Emerg Infect Dis 2010;16 (3): 521–3.

Statpoint Technologies. I. STATGRAPHICS® Centurion. 2006. [Acesso em 15 nov 2015]. Disponível em: <http://www.statgraphics.com/>.

Stothard DR, Clark JB, Fuerst PA. Ancestral divergence of *Rickettsia bellii* from the spotted fever and typhus groups of Rickettsia and antiquity of the genus *Rickettsia*. Internat. J Syst Bacteriol 1994; 44 (4): 798–804.

Szabó MP, Nieri-Bastos FA, Spolidorio MG, Martins TF, Barbieri AM, Labruna MB. In vitro isolation from *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) and ecological aspects of the Atlantic rainforest Rickettsia, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. Parasitol 2013; 140 (6): 719–28.

Szabó MPJ, Cunha TM, Pinter A, Vicentini F. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. Exp Appl Acarol 2001; 25 (10-11): 909–16.

Szabó MPJ, Labruna MB, Castagnolli KC, Garcia MV, Pinter A, Veronez VA, Magalhães GM, Castro MB, Vogliotti A . Ticks (Acari: Ixodidae) parasitizing humans in an Atlantic rainforest reserve of Southeastern Brazil with notes on host suitability. Exp Appl Acarol 2006; 39: 339–46.

Szabó MPJ, Labruna MB, Garcia MV, Pinter A, Castagnolli KC, Pacheco RC, Castro MB, Veronez VA, Magalhães GM, Vogliotti A, Duarte JM. Ecological aspects of free-living ticks (Acari: Ixodidae) on animal trails in an Atlantic rainforest of Southeastern Brazil. Ann Trop Med Parasit 2009; 103 (1) 57–72.

Szabó MPJ, Mangold AJ, Carolina JF, Bechara GH, Guglielmone AA. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. Vet Parasitol 2005; 130 (1-2): 131–40.

Szabó MPJ, Nieri-Bastos FA, Spolidorio MG, Martins TF, Barbieri AM, Labruna MB. *In vitro* isolation from *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) and ecological aspects of the Atlantic rainforest *Rickettsia*, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. *Parasitology* 2013; 140 (6): 719–728.

Szabó MPJ, Olegário MMM, Santos ALQ. Tick fauna from two locations in the Brazilian savannah. *Exp Appl Acarol* 2007a; 43 (1): 73–84.

Szabó MPJ, Olegário MMM, Santos ALQ. Tick fauna from two locations in the Brazilian savannah. *Exp Appl Acarol* 2007; 43 (1): 73–84.

Szabó MPJ, Pinter A, Labruna MB. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013; 3 (27):1–9.

Szabó MPJ, Souza LGA, Olegário MMM, Ferreira FA, Pajuaba Neto AA. Ticks (Acari: Ixodidae) on dogs from Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Transbound Emerg Dis* 2010; 57 (1-2): 72–4.

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. *Mol Biol Evol* 2011; 28 (10): 2731–9.

Teyssere N, Boudier JA, Raoult D. *Rickettsia conorii* entry into Vero cells. *Infect Immun* 1995; 63 (1): 366–74.

Tomassone L, Conte V, Parrilla G, De Meneghi D. *Rickettsia* infection in dogs and *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma tigrinum* ticks, Cochabamba Department, Bolivia. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2010; 10 (10): 953–8.

Uchiyama R. Adherence to and invasion of Vero cells by recombinant *Escherichia coli* expressing the outer membrane protein rOmpB of *Rickettsia japonica*. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 900: 585–90.

Vellaiswamy M, Kowalczywska M, Merhej V, Nappez C, Vincentelli R, Renesto P, Raoult D. Characterization of rickettsial adhesin Adr2 belonging to a new group of adhesins in alpha-proteobacteria. *Microb Pathog* 2011; 50 (5):233–42.

Veronez VA, Freitas BZ, Olegário MMM, Carvalho WM, Pascoli GVT, Thorga K, Garcia MV, Szabó MPJ. Ticks (Acari: Ixodidae) within various phytogeographies of a cerrado reserve in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Exp Appl Acarol* 2010; 50: 169–79.

Vitale G, Mansueto S, Rolain JM, Raoult D. *Rickettsia massiliae* Human Isolation. *Emerg Infect Diseases* 2006; 12 (1):174–5.

Vizzoni, VF, Silva AB, Cardoso KM, Santos FB, Stenzel B, Amorim, M, Oliveira SV, Gazeta, GS. Genetic identification of *Rickettsia* sp. strain Atlantic

rainforest in an endemic area of a mild spotted fever in Rio Grande do Sul State, Southern Brazil. *Acta Trop* 2016; 162: 142-145.

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 (3): 530–34.

Wedincamp J, Foil LD. Vertical Transmission of *Rickettsia felis* in the cat flea (*Ctenocephalides felis* Bouché). *J Vector Ecol* 2002; 27 (1): 96–101.

Weinert LA, Werren JH, Aebi A, Stone GN, Jiggins FM. Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria. *BMC Biology* 2009; 7 (6): 1–15.

Winkler HH & Miller ET. Phospholipase A and the interaction of *Rickettsia prowazekii* and mouse fibroblasts (L-929 cells). *Infect Immun* 1982; 38 (1): 109–13.

Winkler HH. *Rickettsia* Species (As Organisms). *Annu Rev Microbiol* 1990; 44: 131–153.

Wissemann CL, Waddell AD. *In Vitro* Studies on *Rickettsia*-Host Cell Interactions: Intracellular Growth Cycle of Virulent and Attenuated *Rickettsia prowazekii* in Chicken Embryo Cells in Slide Chamber Cultures. *Infect Immun* 1975; 11: 1391-404.

Witter R, Martins TF, Campos AK, Melo AL, Corrêa SH, Morgado TO, Wolf RW, May-Júnior JA, Sinkoc AL, Strüssmann C, Aguiar DM, Rossi RV, Smedo TB, Campos Z, Desbiez AL, Labruna MB, Pacheco RC. Rickettsial infection in ticks (Acari: Ixodidae) of wild animals in midwestern Brazil. *Ticks Tick Borne Dis* 2016; 7 (3): 415–423.

Yu XJ, Walker DH. The Order Rickettsiales. In: Dworkin M. (Ed.) *The Prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiology community* 3rd ed. New York: Springer-Verlag; 2003.

Yu XJ, Walker DH. Family I. Rickettsiaceae. In: Brenner DJ, Kreig NR, Staley JT, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Proteobacteria v.2 2^a edn* New York: Springer-Verlag; 2005. p.96-116.

Zavala-Castro JE, Zavala-Velázquez JE, Walker DH, Ruiz-Arcila EE, Laviada-Molina H, Olano JP, Ruiz-Sosa JA, Small MA, Dzul-Rosado KR. Fatal human infection with *Rickettsia rickettsii*, Yucatán, México. *Emerg Infect Diseases* 2006; 12 (4): 672–4.

8 ANEXO

8.1 Artigo como primeiro autor

Silva AB, Duarte MM, Vizzoni VF, Duré AÍL, Lopez DM, Nogueira RMS, Soares C AG, Machado-Ferreira E, Gazêta GS. Comparative growth of spotted fever group *Rickettsia* spp. strains in Vero cells. Mem Inst Oswaldo Cruz 2016; 111(8): 528-31.

Disponível em:

http://memorias.ioc.fiocruz.br/issues/current-issue/item/6165-0093_comparative-growth-of-spotted-fever-group-rickettsia-spp-strains-in-vero-cells

8.2 Artigo em colaboração

Vizzoni FV, Silva BA, Cardoso MK, Santos BF, Stenzel B, Amorim M, Oliveira VS, Gazeta SG. Genetic identification of *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest in an endemic area of a mild spotted fever in Rio Grande do Sul State, Southern Brazil.. Acta Trop 2016; 162:142-5.

Disponível em:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X16302236>

Comparative growth of spotted fever group *Rickettsia* spp. strains in Vero cells

Arannadia Barbosa Silva^{1,2}, Myrian Morato Duarte³, Vinicius Figueiredo Vizzoni^{2,4}, Ana Íris de Lima Duré³, Diego Montenegro Lopéz^{2,5}, Rita de Maria Seabra Nogueira⁶, Carlos Augusto Gomes Soares⁴, Erik Machado-Ferreira⁴, Gilberto Salles Gazêta^{1,2/+}

¹Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

²Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

³Fundação Ezequiel Dias, Serviço de Virologia e Riquetsioses, Belo Horizonte, MG, Brasil ⁴Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia, Laboratório de Genética Molecular de Eucariontes e Simbiontes, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁵Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Doenças Parasitárias, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁶Universidade Estadual do Maranhão, Curso de Medicina Veterinária, Laboratório de Parasitologia, São Luís, MA, Brasil

In Brazil, the spotted fever group (SFG) Rickettsia rickettsii and Rickettsia parkeri related species are the etiological agents of spotted fever rickettsiosis. However, the SFG, Rickettsia rhipicephali, that infects humans, has never been reported. The study of growth dynamics can be useful for understanding the infective and invasive capacity of these pathogens. Here, the growth rates of the Brazilian isolates R. rickettsii str. Taiaçu, R. parkeri str. At#24, and R. rhipicephali HJ#5, were evaluated in Vero cells by quantitative polymerase chain reaction. R. rhipicephali showed different kinetic growth compared to R. rickettsii and R. parkeri.

Key words: tick-borne disease - rickettsial biology - growth kinetics

In Brazil, the spotted fever group (SFG) *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia parkeri* related species are the etiological agents of spotted fever rickettsiosis. *R. rickettsii* is the causative agent of Rocky Mountain spotted fever (RMSF) and Brazilian spotted fever (BSF), which is considered the most severe of all tick-borne rickettsioses (Parola et al. 2005). *R. parkeri* was recently reclassified as a pathogenic bacterium that causes an eschar-associated rash illness, considered less severe than BSF (Paddock et al. 2004). *Rickettsia rhipicephali* of the SFG that infects humans has never been reported; however, in vitro experiments have shown this bacterium to be moderately pathogenic in guinea pigs (Burgdorfer et al. 1978, Gage & Jerrells 1992).

Until now, very few studies have characterised the growth dynamics of different species or strains of *Rickettsia* in culture media and provided parameters to advance the knowledge on this pathogen (Eremeeva et al. 2003, Boldis et al. 2009). In this context, comparative analyses of *R. rhipicephali* and pathogenic SFG rickettsiae could be useful to provide new information about the pathogenic potential of this species. Thus, in the present study, we evaluated and compared the growth rate of the Brazilian isolates *R. rickettsii* str. Taiaçu (Pinter & Labruna 2006), *R. parkeri* str. At#24 (Silveira et al. 2007), and *R. rhipicephali* str. HJ#5 (Labruna et al. 2007) after infection of Vero cells.

Experiments were performed in the biosafety level 3 laboratory of Divisão de Epidemiologia e Controle de Doenças (DECD) of Fundação Ezequiel Dias - FUNED, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. The *Rickettsia ompA* and *gltA* genes were amplified using the primer sets Rr190.70p/Rr190.602 and CS-78/CS323 (Regnery et al. 1991, Labruna et al. 2004) and sequenced to confirm the identity of these *Rickettsia* strains (Data not shown). In brief, cryogenic tubes containing *Rickettsia*-infected Vero cells were rapidly thawed, and their contents were added to flasks with an uninfected Vero cell monolayer, and incubated at 28°C without CO₂. After two passages, the confluent monolayer was scraped, and the infection rate was measured by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) normalising to initial inoculums. At this point, Vero cells with bacteria were partially 10 purified with syringes (Ammerman et al. 2008) and added to bottles containing an equal 11 amount of uninfected Vero cells in a confluent monolayer. The flasks were incubated at 28°C without CO₂ for 1, 2, 24, 48 and 72 h. Cell infection was monitored by Giménez (1964) staining at 24, 48 and 72 h. Genomic DNA extraction from 100 µL of cells in suspension was performed using an Illustra RNAspin Mini RNA Isolation kit (GE Healthcare®) without RNase addition, according to the standard operating procedure (FUNED). Additional DNA samples from Vero cells infected with *R. parkeri*, *R. rhipicephali* and *Rickettsia amblyommii* were obtained using the extraction method described previously, using a QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen®) and a High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Applied Science®), to test quality by qPCR. DNA samples were quantified using a NanoVue Plus spectrophotometer (GE Healthcare Bio-Sciences AB®), and DNA integrity was analysed by 1% agarose gel electrophoresis (Data not shown).

doi: 10.1590/0074-02760160093

Financial support: FAPEMA (Edital N° 030/2012-BD-01849/12).

EM-F and GSG contributed equally to this work.

+ Corresponding author: gsgazeta@ioc.fiocruz.br

Received 8 March 2016

Accepted 21 June 2016

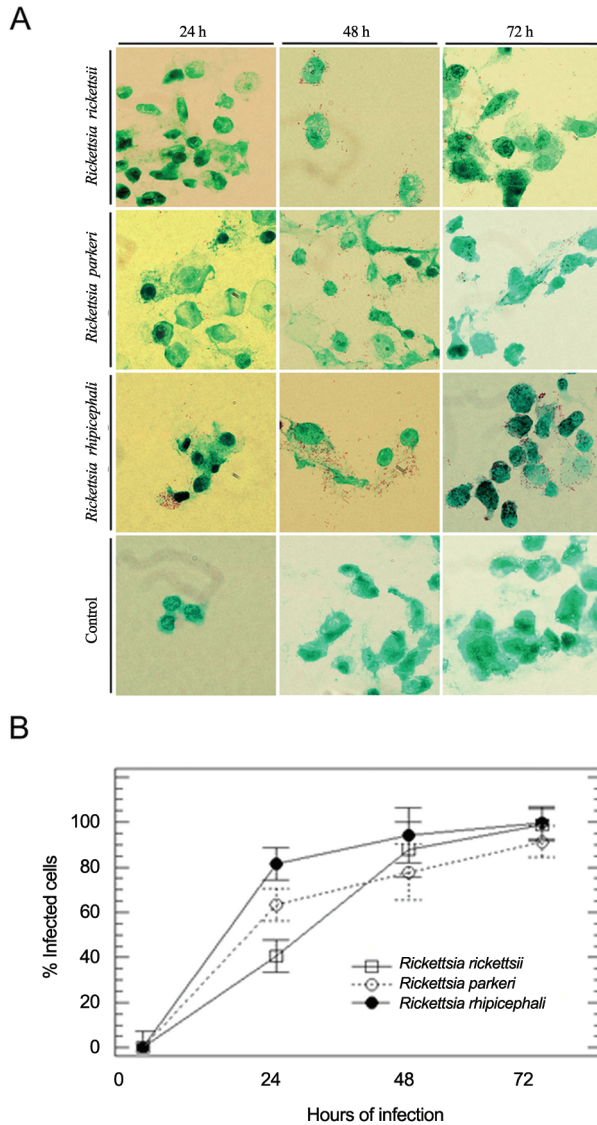


Fig. 1: visualization of Vero cells infected with spotted fever group *Rickettsia* spp. strains. (A) Photomicrographs illustrating the presence of *Rickettsia* spp. in Vero cells and uninfected Vero cells (Control) stained according to the Giménez method (Giménez 1964) (1000 \times magnification, optical microscope Olympus DP72) at 24, 48 and 72 h post bacterial inoculation; (B) percentage of Vero cells infected with *R. rickettsii* str. Taiaçu, *R. parkeri* str. AT#24, and *R. rhipicephali* str. H#15 at the same time points. The results were statistically significant (Time course $F_{3,18} = 223,56$; $p = 0.000$; Species $F_{2,18} = 5,10$; $p = 0.018$; interaction, $F_{6,18} = 4,43$; $p = 0,006$; 95% CI; Levene's = 0.07).

qPCR reactions were performed using DNA samples from *Rickettsia*-infected Vero cells and a SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®) as recommended by the manufacturer. Each qPCR assay contained 30 ng of template DNA and primers for *ompA* (RR190.588F/RR190.701R) and reference (ACTB-F/ACTB-R) genes at a final concentration of 0.4 mM (Eremeeva et al. 2003, Ahn et al. 2008). PCR conditions were as follows: 95°C for 10 min (hot-start), 40 cycles (95°C for 15 s and 60°C for 1 min). Amplification, data acquisition and data

analysis were performed with a 7500 fast real-time PCR System (Applied Biosystems®). Comparative analysis of the *Rickettsia* spp. load in Vero cells was performed using C_T values for each sample (culture of Vero cells and *Rickettsia*, 1, 2, 24, 48 and 72 h post-inoculation), using the equation for $2^{-\Delta\Delta C_T}$, in which $\Delta\Delta C_T = (C_{T\ ompA} - C_{T\ \beta\ actin})_{time\ x} - (C_{T\ ompA} - C_{T\ \beta\ actin})_{time\ 0}$ (Livak & Schmittgen 2001). For the applied $\Delta\Delta C_T$ calculation, primer efficiencies were determined using a standard curve developed from template DNA at concentrations of 5, 10, 30, 50 and 100 ng/ μ L (Supplementary Figure).

The experiments presented here were conducted using two or three biological replicates, which were analysed in triplicate. We used the percentage of infected cells as the dependent variable, and time and *Rickettsia* species as independent variables. Central tendency measures and distribution were calculated and significant differences were assessed (ANOVA) for multiple comparisons; Fisher's least significant difference (LSD) tests between treatments were developed with Statgraphics Centurion XVI (Statpoint Technologies 2006). For all significant differences, the 95% confidence interval (CI) and homoscedasticity of the variance were tested (Levene's test).

The growth rate of these bacterial strains was initially analysed by optical microscopy. *Rickettsia*-like structures were observed in Giménez-stained Vero cells (Fig. 1A). Considering viable Vero cells (based on nucleus integrity), the number of infected cells (or those with attached *Rickettsia*) was counted after 24, 48 and 72 h after bacterial inoculation (Fig. 1). Interestingly, Vero cell infectivity was higher for *R. rhipicephali* than for the other two species at 24 (higher difference), 48 and 72 h post-inoculation. Moreover, at 72 h post-inoculation, the highest percentage of infected cells, 98.92%, 91.48% and 99.82%, was observed for *R. rickettsii*, *R. parkeri* and *R. rhipicephali*, respectively (Fig. 1B).

Four primer pairs for the rickettsial *ompA* gene and three primer pairs for eukaryotic genes of β -actin and ribosomal protein L13A and L32 were tested by qPCR amplification (Eremeeva et al. 2003, Ahn et al. 2008). The best primer pairs for *Rickettsia* (RR190.588F/RR190.701R) and eukaryotic cells (ACTB-F/ACTB-R) were obtained through melt curve analysis (data not shown). For the comparative C_T method to be valid, the amplification efficiencies of the target rickettsial *ompA* gene and the reference eukaryotic β -actin gene must be approximately equal (Livak & Schmittgen 2001). To validate this method, we prepared a dilution series of DNA template obtained from uninfected and *Rickettsia*-infected Vero cells. The reaction efficiencies for each DNA sample/primer set were evaluated based on slopes of the regression lines for C_T versus the relative dilution series (Supplementary Figure). The slopes of the regression lines for ΔC_T versus DNA template dilution were within the range of -0.1 to +0.1, confirming the validity of the relative quantification method (Supplementary Table).

The relative amount of *Rickettsia* in eukaryotic cells was determined by *ompA*/ β -actin qPCR analysis over a 72 h time course of infection in Vero cells. It was evident that the amount of Vero cell-infecting *Rickettsia* increased with time, reaching the highest loads at 72 h post-

inoculation (Fig. 2). Utilising the computed $2^{-\Delta\Delta CT}$ values, *R. rhipicephali* numbers increased by approximately 8-, 4-, 3.8- and 17-fold during the 72 h time course, as shown in Fig. 2A. Based on comparative analysis, *R. rhipicephali* presented a distinct behaviour, with infectivity approximately 4.7-, 8.5-, 3.1- and 2.8-fold greater than that of pathogenic *R. rickettsii* at 2, 24, 48 and 72 h post-inoculation, respectively (Fig. 2B). Significant differences ($F_{2,65} = 492,37$; $p = 0.000$; 95% CI) were identified based on the bacteria/Vero cell proportion when the three species used in this study were compared; these differences were more evident at 72 h of infection (Fig. 2). DNA samples utilised in these analyses were predominantly purified using the RNA isolation kit (GE Healthcare). Comparative C_T analysis utilising two additional DNA isolation kits demonstrated no statistically significant difference ($F_{2,51} = 0,51$, $p = 0.603$, 95% CI, Levene's $p = 0.451$) between the yield and quality of DNA obtained by these kits. Taken together, these data suggest that *R. rhipicephali* exhibited faster growth in cell culture over 72 h, when compared to *R. rickettsii* and *R. parkeri* strains.

The invasion process of SFG *Rickettsia conorii* in Vero cells occurs only a few minutes after *Rickettsia*-host cell adhesion, and proceeds via induced phagocytosis and subsequent intracytoplasmic release through the lysis of phagosomal membranes (Teyssie et al. 1995). In this work, the processes of *Rickettsia*-host cell contact and entry into Vero cells were not assessed; however, the quantitative (relative) data demonstrated that after 2 h, the number of *Rickettsia*-infected Vero cells was 1.3-, 1.6- and 8-fold higher than that 1 h post-inoculation with *R. rickettsii*, *R. parkeri* and *R. rhipicephali*, respectively. Thus, it suggested that the processes of adhesion, entry and escape to the cytoplasm were faster with *R. rhipicephali* inoculation, which would provide additional time for bacterial cell division (Figs 1B, 2A). Interestingly, *Rickettsia rickettsii* str. Sheila Smith was shown to reach its highest level of multiplication at 72 h post-inoculation in Vero cells (Noriea et al. 2015). Meanwhile, *Rickettsia slovaca* reached its highest level after 96 h post-inoculation (Boldis et al. 2009). To better evaluate the kinetic growth of *R. rhipicephali* compared to that of *R. rickettsii* and *R. parkeri*, additional studies using a time course of 14 days, which covers exponential, stationary and decline growth phases, should be performed.

To be pathogenic in mammals, tick-borne bacteria must be able to survive in the tick vector, be transmitted during tick feeding, avoid or subvert the host immune responses, replicate in host organisms; and spread to new hosts. In this scenario, *R. rhipicephali* has some of these characteristics; this species has been frequently described to infect ticks of different genera including *Rhipicephalus* spp., *Dermacentor* spp., and *Haemaphysalis juxtacochi* (Philip et al. 1981, Labruna et al. 2007, Hsu et al. 2011). Moreover, direct inoculation of *R. rhipicephali* into guinea pigs and voles resulted in a less severe rickettsiosis than that caused by *R. rickettsii* (Burgdorfer et al. 1978, Gage & Jerrells 1992), indicating that *R. rhipicephali* are able to survive inside the host organism, using mechanisms to evade or overcome the host immune system. Nonetheless, to consider *R. rhipicephali* as a new SFG

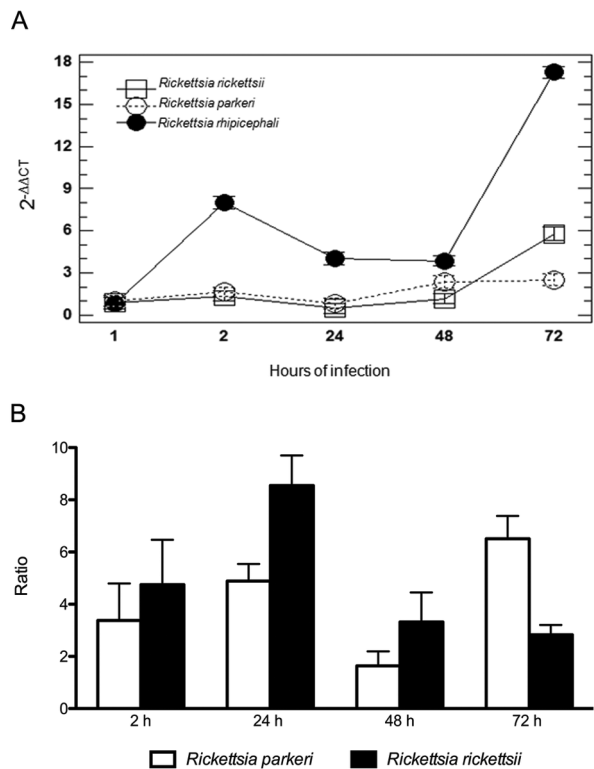


Fig. 2: relative quantification of spotted fever group *Rickettsia* spp. strains in Vero cells. (A) Relative growth curves of *R. rickettsii* str. Taiaçu, *R. parkeri* str. AT#24, and *R. rhipicephali* str. HJ#5 in Vero cells at 1, 2, 24, 48 and 72 h post bacterial inoculation. There was a statistically significant difference between species [$F_{4,65} = 304,90$; $p = 0.000$; 95% confidence interval (CI)], an interaction between time and species ($F_{8,65} = 114,50$; $p = 0.000$; 95% CI). (B) Comparative ratio of *R. rhipicephali* abundance to those of *R. rickettsii* and *R. parkeri*, after infection. Comparisons with *R. parkeri* (white bars) and *R. rickettsii* (black bars) are presented. *Rickettsia* sp. abundances were determined as the relative amount of bacterial *ompA* / eukaryotic β -actin at 2, 24, 48 and 72 h.

pathogen, additional studies including those using different tick vector species, different vertebrate hosts and more sensitive molecular tools are needed. In contrast, Normont and Burgdorfer (1984) detected no clinical signs in dogs that were exposed to ticks infected with *R. rhipicephali*. It should be noted that *R. rhipicephali* str. HJ#5 was isolated from Vero cell culture in 2005 (Labruna et al. 2007). Thus, the differential growth of *R. rhipicephali* in Vero cells could be more related to its ability to adapt to this host cell line than its pathogenic potential, as was previously observed for *Rickettsia prowazekii* infection of chicken embryo cells (Wissemann & Waddell 1975).

Some members of the SFG have never been associated with human and animal diseases (Parola et al. 2013); however, it should be noted that some current human pathogenic species were first classified as non-pathogenic or of unknown pathogenicity. This fact deserves attention because it denotes the possibility of human infection in the future. Thus, studies on the growth dynamics of *Rickettsia* sp. are useful for understanding the infective and invasive capacity of these pathogens.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Prof Marcelo Bahia Labruna, from Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade de São Paulo (USP), for providing the isolates, and especially Felipe Campos de Melo Iani, from Serviço de Virologia e Riquetsioses from Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Belo Horizonte, MG, Brazil, and other professionals from this institution for collaboration in this study.

REFERENCES

- Ahn K, Huh J, Park S, Kim D, Ha H, Kim Y, et al. Selection of internal reference genes for SYBR green qRT-PCR studies of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) tissues. *BMC Mol Biol.* 2008; 9(78): 1-8.
- Ammerman NC, Beier-Sexton M, Azad AF. Laboratory maintenance of *Rickettsia rickettsii*. *Curr Protoc Microbiol.* 2008; 3: 1-27.
- Boldis V, Strus J, Kocianová E, Tusek-Znidaric M, Stefanidesová K, Schwarzová K, et al. Life cycle of *Rickettsia slovacica* in L929 cell line studied by quantitative real-time PCR and transmission electron microscopy. *FEMS Microbiol Lett.* 2009; 293(1): 102-6.
- Burgdorfer W, Brinton LP, Krynski WL, Philip RN. *Rickettsia rhipicephali*, a new spotted fever group rickettsia from the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. In: Kazar J, Ormsbee RA, Tarasovich IN, eds. Proceedings of the 2nd International Symposium on rickettsiae and rickettsial diseases. Bratislava: Public House of Slovak Academy of Sciences; 1978. p. 307-16.
- Eremeeva ME, Dasch GA, Silverman DJ. Evaluation of a PCR assay for quantitation of *Rickettsia rickettsii* and closely related spotted fever group rickettsiae. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(12): 5466-72.
- Gage KL, Jerrells TR. Demonstration and partial characterization of antigens of *Rickettsia rhipicephali* that induce cross-reactive cellular and humoral immune responses to *Rickettsia rickettsii*. *Infect Immun.* 1992; 60(12): 5099-106.
- Giménez DF. Staining rickettsiae in yolk-sac cultures. *Stain technology.* 1964; 39: 135-40.
- Hsu YM, Lin CC, Chomel BB, Tsai KH, Wu WJ, Huang CG, et al. Identification of *Rickettsia felis* in fleas but not ticks on stray cats and dogs and the evidence of *Rickettsia rhipicephali* only in adult stage of *Rhipicephalus sanguineus* and *Rhipicephalus haemaphysaloides*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2011; 34(6): 513-8.
- Labruna MB, Pacheco RC, Richtzenhain LJ, Szabo, Matias PJ. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* from *Haemaphysalis juxtakochi* ticks in the state of São Paulo, Brazil. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73(3): 869-73.
- Labruna MB, Whitworth T, Horta MC, Bouyer DH, McBride JW, Pinter A, et al. *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.* 2004; 42(1): 90-8.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods.* 2001; 25(4): 402-8.
- Noriea NF, Clark TR, Hackstadt T. Targeted knockout of the *Rickettsia rickettsii* *OmpA* surface antigen does not diminish virulence in a mammalian model system. *MBio.* 2015; 6(2): e00323-15.
- Normant BR, Burgdorfer W. Susceptibility and reservoir potential of the dog to spotted fever-group rickettsiae. *Am J Vet Res.* 1984; 45(9): 1706-10.
- Paddock CD, Sumner JW, Comer JA, Zaki SR, Goldsmith CS, Goddard J, et al. *Rickettsia parkeri*: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. *Clin Infect Dis.* 2004; 38(6): 805-11.
- Parola P, Davoust B, Raoult D. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. *Vet Res.* 2005; 36(3): 469-92.
- Parola P, Paddock CD, Socolovschi C, Labruna MB, Mediannikov O, Kernif T, et al. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin Microbiol Rev.* 2013; 26(4): 657-702.
- Philip RN, Casper EA. Serotypes of spotted fever group rickettsiae isolated from *Dermacentor andersoni* (Stiles) ticks in western Montana. *Am J Trop Med Hyg.* 1981; 30(1): 230-8.
- Pinter A, Labruna MB. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. *Ann NY Acad Sci.* 2006; 1078: 523-9.
- Regnery RL, Spruill CL, Plikaytis BD. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *J Bacteriol.* 1991; 173(5): 1576-89.
- Silveira I, Pacheco RC, Szabó MPJ, Ramos HGC, Labruna MB. First report of *Rickettsia parkeri* in Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13(7): 1111-3.
- Statpoint Technologies. I. Statgraphics® Centurion XVI [software]. 2006 [cited 2015 Nov 15]. Available from: <http://www.statgraphics.com>.
- Teyssie N, Boudier JA, Raoult D. *Rickettsia conorii* entry into Vero cells. *Infect Immun.* 1995; 63(1): 366-74.
- Wisseman CL, Waddell AD. *In vitro* studies on *Rickettsia*-host cell interactions: intracellular growth cycle of virulent and attenuated *Rickettsia prowazekii* in chicken embryo cells in slide chamber cultures. *Infect Immun.* 1975; 11(6): 1391-404.